

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA
LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA VETERINÁRIA**

**Avaliação de animais silvestres como
portadores de patótipos de *Escherichia coli* patogênicas aos seres humanos**

Autora: Luiza de Campos Menetrier

PORTO ALEGRE

2021/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA
LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA VETERINÁRIA**

**Avaliação de animais silvestres como
portadores de patótipos de *Escherichia coli* patogênicas aos seres humanos**

Autora: Luiza de Campos Menetrier

**Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para
a obtenção da graduação em Medicina
Veterinária**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Franciele
Maboni Siqueira**

**Coorientadora: Mv. Msc. Larissa Caló
Zitelli**

PORTO ALEGRE

2021/2

CIP - Catalogação na Publicação

Menetrier, Luiza de Campos
Avaliação de animais silvestres como portadores de
patotipos de Escherichia coli patogênicas aos seres
humanos / Luiza de Campos Menetrier. -- 2022.
37 f.
Orientadora: Franciele Maboni Siqueira.

Coorientador: Larissa Caló Zitelli.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Porto
Alegre, BR-RS, 2022.

1. Zoonose. 2. Microbiologia. 3. Sentinelas. 4.
Bactérias entéricas. 5. Saúde única. I. Siqueira,
Franciele Maboni, orient. II. Zitelli, Larissa Caló,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Luiza de Campos Menetrier

AVALIAÇÃO DE ANIMAIS SILVESTRES COMO PORTADORES DE PATOTIPOS DE
ESCHERICHIA COLI PATOGÊNICAS AOS SERES HUMANOS

Aprovado em 11 ABR 2022

APROVADO POR:

Prof^a. Dr^a. Franciele Maboni Siqueira

Orientadora e membro da banca examinadora

Mv. Msc. Larissa Caló Zitelli

Coorientadora

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

Membro da banca examinadora

Msc. Gabriela Merker Breyer

Membro da banca examinadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a maravilhosa equipe do LaBacVet, por toda a ajuda durante os experimentos para a conclusão deste trabalho, mas também por cada vibração diante de um resultado empolgante e cada palavra de conforto quando as coisas não saiam conforme o esperado. É um prazer e um orgulho fazer parte desta equipe que tem pessoas tão dedicadas.

Agradeço imensamente a Professora Franciele por ser minha orientadora e por ter me ensinado tanto nestes últimos dois anos. Obrigada por acreditar no potencial das suas ICs e por nos mostrar que a biologia é linda. Agradeço a Larissa, minha coorientadora, por todos os ensinamentos, ajuda e apoio durante a confecção deste trabalho.

Agradeço a todos outros Médicos Veterinários que de alguma forma impactaram minha formação, em especial a Dr. Sandra por ter me ensinado tanto e por todas as oportunidades que me deu.

Agradeço também a minha família, principalmente a minha mãe Denise, por ter sempre me incentivado e por ter me proporcionado um ótimo ambiente de aprendizado. Agradeço meu namorado, Anderson, por ter me dado forças nos momentos difíceis da graduação e por ter sempre me lembrado do quanto sou capaz. E às minhas amigas por terem sido ótimas parceiras de estudo e por terem tornado este caminho mais leve.

Agradeço também ao Preservas- UFRGS, por todas as coletas de amostras, indispensáveis para a realização deste trabalho.

RESUMO

Escherichia coli fazem parte da microbiota entérica de humanos e animais saudáveis, porém algumas cepas são responsáveis por infecções intestinais. Os patótipos *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* shigatoxigênica (STEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) são importantes agentes zoonóticos, causando infecções assintomáticas, diarreia aguda e até morte em humanos. Bovinos são considerados o principal reservatório destes patógenos, porém já foram identificados em uma variedade de animais domésticos e silvestres. Entretanto, a atuação destes últimos como disseminadores ambientais de *E. coli* zoonóticas ainda não foi estabelecida na literatura. Com o intuito de identificar animais silvestres como portadores destes patótipos e apontar quais foram mais frequentemente encontrados, foi realizada coleta de suabe retal ou cloacal de 110 animais silvestres, sendo 71 aves, 29 mamíferos e 10 répteis. O material foi cultivado em Ágar MacConkey Sorbitol, e os isolados de interesse foram submetidos à extração de DNA total. Os isolados foram avaliados quanto a presença de quatro genes de virulência de interesse (*tir* EPEC, *stx1*, *stx2* e *tir* EHEC) através de PCR convencional para identificação de patótipos. Dos 110 animais coletados, 71 apresentaram crescimento de enterobactérias no cultivo em Ágar MacConkey Sorbitol e a análise de 63 animais foi concluída, configurando o grupo de estudo do presente trabalho. Dos 63 animais analisados, foi detectado pelo menos um dos genes testados em 28. A maior identificação dos genes ocorreu no grupo das aves, sendo identificados em 40,5% dos animais, o gene de virulência mais frequentemente identificado nos animais silvestres foi *stx2* estando presente em 19 amostras. O patótipo STEC foi identificado em 23 amostras (36,5%), o patótipo EPEC foi identificado em oito amostras e o patótipo EHEC foi identificado apenas em duas amostras, de Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*) e Graxaim-do-mato (*Cerdocyon thous*). Em conclusão, a identificação dos patótipos de interesse em animais silvestres foi alta, e novas pesquisas são necessárias para esclarecer o papel destes animais enquanto disseminadores ambientais e possível risco desta disseminação para a saúde humana.

Palavras-chave: Zoonose. Microbiologia. Sentinela. Bactéria entérica. Saúde única.

ABSTRACT

Escherichia coli are part of the gut microbiota of humans and animals, but some strains are responsible for intestinal infections. The enteropathogenic *E. coli* (EPEC), shigatoxigenic *E. coli* (STEC) and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathotypes are important zoonotic agents, causing asymptomatic infections, acute diarrhea and even death in humans. Cattle are considered the main reservoir of these pathogens, which have already been identified in a variety of domestic and wild animals, but the role of wild animals as environmental disseminators has not yet been established. In order to identify wild animals as carriers of these pathotypes and point out which are the most frequently found, rectal or cloacal swabs were collected from 110 wild animals (71 birds, 29 mammals, and 10 reptiles) and cultured on MacConkey Sorbitol Agar. Isolates were then submitted to DNA isolation and PCR analyses for the detection of four virulence genes (*tir* EPEC, *stx1*, *stx2*, and *tir* EHEC) for pathotypic identification. Of the 110 animals collected, 71 showed growth of enterobacteria in MacConkey Sorbitol Agar culture and the analysis of 63 animals was completed, configuring the study group of the present work. Of the 63 analyzed animals, at least one of the tested genes was detected in 28. Most of the target genes were identified in bird samples, being detected in 40.5% (15/37) of the analyzed birds. *Stx2* gene was the most frequently identified, being detected in 19/63 samples. The STEC pathotype was identified in 23 samples (36.5%), the EPEC pathotype was identified in eight samples and the EHEC pathotype was identified only in samples of Tropical Screech-Owl (*Megascops choliba*) and Crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). In conclusion, the identification of pathotypes of interest in wild animals was high, and further research is needed to clarify the role of these animals as environmental disseminators and possible risk of this dissemination to human health.

Key-words: Zoonosis. Microbiology. Sentinel. Enteric bacteria. One health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Lesão AE clássica em área de cólon.....	12
Figura 2 –	Processamento de suabe retal através de plaqueamento direto do suabe e plaqueamento da diluição do lavado do suabe de cada animal coletado.....	22
Figura 3 –	Recuperação dos crescimentos microbianos em Ágar MacConkey Sorbitol, a partir dos plaqueamentos dos suabes retais.....	23
Figura 4 -	Gráficos de setores representativos acerca da detecção de genes dos patótipos de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica, <i>Escherichia coli</i> shigatoxigênica e <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica referentes a cada grupo de animais testados.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Sequências de <i>primers</i> empregados neste projeto	25
Tabela 2 –	Identificação de patotipos de <i>E. coli</i> em diferentes grupos animais através da análise de genes de virulência	25
Tabela 3 –	Identificação de diferentes patotipos de <i>E. coli</i> em espécies de aves através da análise de genes de virulência	27
Tabela 4 –	Identificação de diferentes patotipos de <i>E. coli</i> em espécies de mamíferos através da análise de genes de virulência.....	28
Tabela 5 –	Identificação de diferentes patotipos de <i>E. coli</i> em espécies de répteis através da análise de genes de virulência.....	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	<i>Escherichia coli</i>	11
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	11
2.1.1.1	A patogenia das <i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas.....	13
2.1.2	<i>Escherichia coli</i> shigatoxigênicas (STEC).....	14
2.1.2.1	A patogenia das <i>Escherichia coli</i> shigatoxigênicas.....	15
3	ARTIGO CIENTÍFICO	18
4	CONCLUSÕES	33
5	PERSPECTIVAS	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Escherichia coli pode causar uma grande diversidade de patologias, podendo causar infecções intestinais e extraintestinais, locais e sistêmicas, em humanos e animais (GOMES; HERNANDES, 2015). Seu modo de transmissão é oro-fecal e a disseminação ocorre através de água, alimentos e indivíduos contaminados (ESPINOSA *et al.*, 2018).

E. coli responsáveis por causar infecções intestinais são denominadas diarreicogênicas (DEC) e, dentre estas, as que se destacam por sua importância na saúde pública são as *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* shigatoxigênica (STEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (CHEN; FRANKEL, 2005). EPECs são definidas pela capacidade de induzir a lesão histopatológica no epitélio intestinal, denominada *attaching and effacing* (lesão AE), e por não possuir genes que codificam a toxina Shiga (*stx1* e *stx2*), sendo frequentemente associadas a surtos de diarreia infantil, tendo como principal sintoma a diarreia secretora abundante (GOMES; HERNANDES, 2015). STECs são definidas pela produção de toxinas Shiga (Stx) e sorotipos de STEC capazes de induzir a lesão AE são classificados como EHEC (GUTH, 2015). Em humanos, a manifestação clínica de infecções por STEC é extremamente variável, podendo ser assintomática, causar diarreia branda, colite hemorrágica ou até evoluir para Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), que pode levar o paciente a morte (NEWELL; LA RAGIONE, 2017). A cepa *E. coli* O157:H7 é uma EHEC de alta importância, pois é responsável pela maioria dos casos de SHU bacteriana no mundo e possui baixa dose infectante (< 100 UFC) (GUTH, 2015; FERENS; HOVDE, 2011; GYLES *et al.*, 2010).

Bovinos são considerados importantes reservatórios de EPECs e STECs e diversos estudos já foram realizados relacionando animais domésticos com surtos de doenças causadas por estes patógenos em humanos. Poucos estudos, porém, pesquisam a influência de animais silvestres no ciclo de infecção destas bactérias. Sabendo-se que animais silvestres podem ter acesso a locais urbanos e periurbanos e que o contato direto e indireto entre diferentes espécies animais pode levar a contaminações, o objetivo deste trabalho foi identificar animais silvestres como portadores de cepas de EPEC, STEC e EHEC, apontando quais patótipos são mais frequentemente encontrados, além de fornecer informações para futuros trabalhos sobre a atuação destes animais como disseminadores ambientais e os possíveis riscos desta disseminação aos seres humanos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

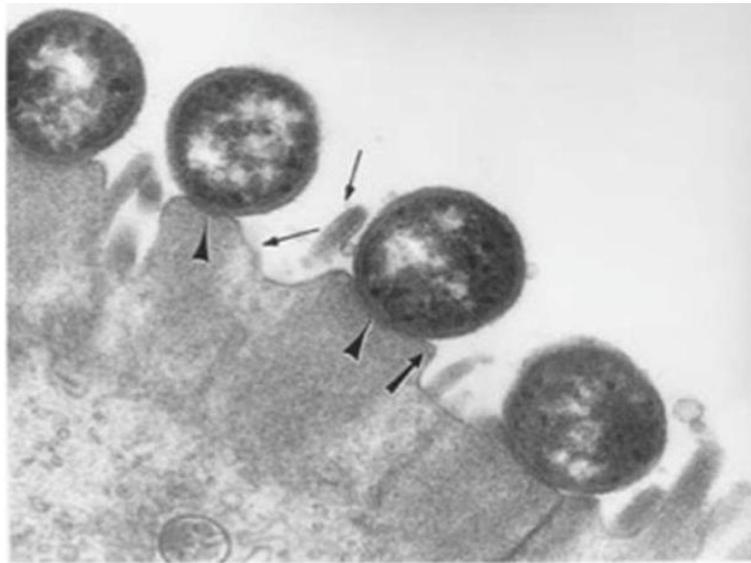
Bactérias da espécie *Escherichia coli* são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, pertencentes à família Enterobacteriaceae (MARTINEZ; TADDEI, 2015). Essas bactérias fazem parte da microbiota entérica de humanos e animais e podem ser transmitidas entre diferentes espécies, pela rota oro-fecal (ESPINOSA *et al.*, 2018). Por 125 anos *E. coli* foi caracterizada como um grupo de bactérias comensais, já que a maioria das cepas não são patogênicas, porém a capacidade de receber e transmitir genes permite que uma cepa se torne um patógeno altamente diversificado e adaptado, através da captação de genes de virulência, por exemplo (CROXEN *et al.*, 2013; ESPINOSA *et al.*, 2018).

Devido à grande diversidade patogênica, essa espécie é dividida em duas categorias, a de *E. coli* diarreicogênicas, que compreendem as cepas que causam infecções intestinais e a de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC), que corresponde às cepas associadas a infecções extraintestinais (MARTINEZ; TADDEI, 2015). As ExPEC são associadas a infecção do trato urinário, a meningite neonatal, septicemias, pneumonias, entre outras afecções e são denominadas conforme seu sítio de isolamento (SILVA; SANTOS, 2015). Já as *E. coli* diarreicogênicas são divididas, atualmente, em seis grupos, com base em seus fatores de virulência, são eles: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* shigatoxigênica (STEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (CHEN; FRANKEL, 2005). Dentre as *E. coli* diarreicogênicas as STEC, EPEC e EHEC se destacam por sua importância para saúde humana e animal (KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015; MILTON *et al.*, 2018), sendo estes patótipos estudados e analisados dentro de um contexto de Saúde Única.

2.1.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

No ano de 1945, uma cepa de *E. coli* enteropatogênica foi, pela primeira vez, associada à doença em humanos em decorrência de surtos de diarreia em crianças na Inglaterra. Ainda assim, o potencial patogênico de EPEC foi confirmado apenas no final da década de 80. Hoje, a definição deste grupo tem como base a capacidade da cepa de induzir a lesão histopatológica no epitélio intestinal, denominada *attaching and effacing* (lesão AE), ilustrada na Figura 1, e a ausência de genes que codificam a toxina Shiga (*stx1* e *stx2*) (GOMES; HERNANDES, 2015).

Figura 1 - Lesão AE clássica em área de cólon



Pontas de seta indicam a formação de pedestal e estreita associação das bactérias com as células epiteliais do cólon, setas no lúmen indicam a destruição das microvilosidades. Fonte: Gyles *et al.*, (2010).

Cepas de EPEC podem ser categorizadas como típicas ou atípicas, com base na presença do plasmídeo *E. coli adherence factor* (EAF). A presença deste plasmídeo caracteriza cepas típicas (tEPEC), enquanto que, a ausência caracteriza cepas atípicas (aEPEC) (CHEN; FRANKEL, 2005). Uma importante diferença entre os grupos se dá ao fato de o único reservatório conhecido de tEPEC ser o humano, enquanto que aEPEC já foram identificadas em humanos e em animais. Outra característica é que tEPEC afeta principalmente crianças de até dois anos, enquanto cepas de aEPEC são responsáveis por quadros de diarreia em crianças e adultos (GOMES; HERNANDES, 2015).

Nas últimas décadas, houve um decréscimo de casos de diarreia em humanos relacionados a cepas de tEPEC, e um aumento de casos relacionados a aEPEC, o que se relaciona a sua alta frequência em diversas espécies animais (CHEN; FRANKEL, 2005). Moura *et al.* (2009) demonstraram como diversos isolados de EPEC de humanos e animais apresentam similaridade nos fatores de virulência e estão clonalmente relacionados, através de análise realizada em amostras de humanos, bovinos, ovelhas, coelhos, cães, gatos e macacos. Seus resultados sugerem que animais atuam como reservatório e fonte de infecção de aEPEC para humanos, assim, podendo caracterizar diarreia causada por aEPEC como uma zoonose (Moura *et al.*, 2009).

Em humanos, EPECs são responsáveis por infecções subclínicas a fatais, sendo que o principal sintoma é diarreia secretora abundante, podendo haver considerável perda de fluidos

e eletrólitos nas fezes, além de febre baixa e vômito. Infecções severas também podem causar destruição do epitélio absorptivo intestinal, com marcante atrofia das vilosidades e afinamento da mucosa (GOMES; HERNANDES, 2015).

EPECs são frequentemente associadas à diarreia infantil, mas diversos surtos já foram relatados em adultos saudáveis (provavelmente devido a ingestão de grande quantidade de inóculo de fonte comum) e em adultos com comorbidades e idosos (NATARO; KAPER, 1998). Surtos de aEPEC já foram identificados em crianças e adultos em países como Finlândia (VILJANEN *et al.*, 1990), Japão (YATSUYANAGI *et al.*, 2003), Reino Unido (JENKINS *et al.*, 2003), Brasil (VIEIRA *et al.*, 2016) e um surto de aEPEC multirresistente em adultos foi identificado na China (HAO *et al.*, 2012). No Brasil, aEPEC é o patotipo de *E. coli* mais frequentemente isolado em pacientes com diarreia, tendo sido implicada em, pelo menos, cinco diferentes surtos no estado de São Paulo entre os anos de 2012 e 2013 (VIEIRA *et al.*, 2016).

2.1.1.1 A patogenia das *Escherichia coli* enteropatogênicas

A lesão AE, que caracteriza uma EPEC, é responsável por eliminar as microvilosidades do enterócito e causar uma aderência íntima da bactéria com a membrana da célula (GYLES *et al.*, 2010). Abaixo da bactéria aderente ocorre uma intensa polimerização de elementos do citoesqueleto, incluindo actina. Esta polimerização é responsável por formar uma estrutura elevada, semelhante a um pedestal, o que faz com que a capacidade absorptiva das células intestinais seja reduzida (GOMES; HERNANDES, 2015). Os genes cromossômicos que são responsáveis pela expressão desta lesão estão localizados em uma ilha de patogenicidade denominada *locus of enterocyte effacement* (região LEE), que é organizada em cinco regiões: LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5 (NATARO; KAPER, 1998). Na região de LEE5, está localizado o gene *tir*, responsável por codificar a proteína denominada Receptor Translocado de Intimina (Tir) (GOMES; HERNANDES, 2015). A detecção do gene *tir* através de métodos moleculares pode ser utilizada para a identificação e caracterização de EPECs (BARBIERI *et al.*, 2012).

Em tEPECs, o plasmídeo EAF contém o grupo de genes que codificam a fímbria denominada *bundle-forming pilus* (BFP), que concede o fenótipo de adesão localizada (AL) em células epiteliais (HeLa/HEp-2). Embora não seja capaz de produzir padrão AL, por não apresentar plasmídeo EAF, cepas de aEPECs também podem ser capazes de se aderir em células epiteliais em cultura, através de um padrão AL-like (GOMES; HERNANDES, 2015).

2.1.2 *Escherichia coli* shigatoxigênicas (STEC)

As STECs são caracterizadas pela produção de toxinas Shiga (Stx), que são potentes citotoxinas com propriedade de inibição da síntese proteica de células eucarióticas (GUTH, 2015). As toxinas Shiga são o fator crítico de virulência em doenças causadas por STEC (GYLES *et al.*, 2010).

Em humanos, a apresentação clínica em casos de infecção por STECs é extremamente variável, podendo ser assintomática, causar diarreia branda, colite hemorrágica (CH) ou até evoluir para Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) (NEWELL; LA RAGIONE, 2017). A SHU é uma evolução extraintestinal da CH, definida pela tríade anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal aguda que pode se estender ainda para um caso de púrpura trombocitopênica trombótica com sintomas neurológicos e febre, podendo levar o paciente a morte (GUTH, 2015).

Cepas de STEC que são especificamente associadas a causa de SHU em humanos são categorizadas em um subgrupo de *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC) (NEWELL; LA RAGIONE, 2017). A cepa *E. coli* O157:H7 foi a primeira identificada como responsável por casos de SHU e CH, sendo uma cepa de grande importância por ser responsável pela maioria dos casos de SHU bacteriana no mundo e por possuir baixa dose infectante (< 100 UFC) (GUTH, 2015; FERENS; HOVDE, 2011; GYLES *et al.*, 2010). Segundo Guth (2015), *E. coli* O157:H7 é o principal sorotipo associado a surtos em países como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido e Japão, enquanto sorotipos não-O157 são mais comuns na Europa, Austrália e América Latina, incluindo o Brasil, onde são igualmente associados a casos de diarreia, CH e SHU.

Em animais, o papel das Stx é claramente estabelecido apenas na doença do edema, que acomete os suínos, contudo, cepas de STEC já foram relacionadas a diarreia e disenteria em bezerros e cordeiros, e a vasculopatia cutânea e glomerular renal (CRGV) em cães (GYLES *et al.*, 2010). Bovinos e ovinos são importantes hospedeiros de STECs, visto que um grande número desses animais é portador assintomático de cepas patogênicas para humanos, incluindo o sorotipo O157, o que torna os animais importantes hospedeiros com relevância para saúde pública (GUTH, 2015). Este fato é reforçado por pesquisas realizadas na província de Ontário, no Canadá, em que Valcour *et al.* (2002) e Michel *et al.* (1999) demonstraram uma incidência maior de infecções por STEC em humanos nas áreas rurais da província, sendo que a densidade de bovinos na área também apresentou associação com a ocorrência de infecções.

A principal forma de infecção de humanos por STEC se dá através da ingestão de alimento ou água contaminados (GUTH, 2015). Surtos de STECs, também são frequentemente relacionados a transmissão por carne mal cozida (BARRETT *et al.*, 1994; ROBERTS *et al.*, 1995; SHEFER *et al.*, 1996). Estudos no Brasil indicam uma ocorrência de até 20% de presença de STEC em produtos cárneos, porém, há poucos relatos relacionados à doença em humanos no país (GONZALEZ; CERQUEIRA, 2020). Outras formas de contaminação já registradas são: vegetais, suco de frutas, água contaminada (tanto na dieta quanto na recreação), contato direto com animais e pessoas infectadas (SLAYTON *et al.*, 2013; HILBORN *et al.*, 2000; HEUVELINK *et al.*, 2002; GUTH, 2015).

Apesar de menos frequente, animais silvestres já foram identificados como fontes principais de surtos de STEC, incluindo EHECs, assim como carreadores assintomáticos deste patotipo. No estado de Missouri, Estados Unidos, cinco pessoas foram infectadas por uma cepa de *E. coli* O157:H7 proveniente de salsicha de carne de cervo contaminada (AHN *et al.*, 2009). No estado do Oregon, Estados Unidos, dezesseis pessoas foram contaminadas por *E. coli* O157:H7 através de morangos frescos, sendo que quatro pessoas desenvolveram SHU e duas foram a óbito. Após investigação, fezes de cervo foram identificadas como fonte da infecção (LAIDLER *et al.*, 2013). Na Espanha, foi identificada ocorrência de 3,3% (7/212) de STECs em fezes de javalis, sendo que um dos isolados analisados por eletroforese em gel de campo pulsado era idêntico ao isolado de um paciente humano na mesma área geográfica (SÁNCHEZ *et al.*, 2009). No Reino Unido, foi identificada, em uma gralha-calva (*Corvus frugilegus*), uma cepa de *E. coli* O157:H7 idêntica à isolada de três casos humanos (EJIDOKUN *et al.*, 2006). Alonso *et al.* (2017) identificaram, na Espanha, um perfil multirresistente a antimicrobianos em dois isolados de STEC geneticamente relacionados, recuperados de muflões (*Ovis musimon*). Essa cepa apresentou resistência a ampicilina, tetraciclina e sulfametoxazol/trimetoprima antibióticos que são amplamente utilizados na produção de animais. A identificação de cepas com este padrão de resistência pode sugerir a produção animal como possível fonte destas cepas disseminadas no ambiente, bem como possível causa desta multirresistência (ALONSO *et al.*, 2017). As STECs podem ser ainda carreadas por anfíbios e peixes, bem como por invertebrados, como insetos e moluscos (FERENS; HOVDE, 2011).

2.1.2.1 A patogenia das *Escherichia coli* shigatoxigênicas

As principais Stx de *E. coli* são Stx1, que é idêntica a Stx de *Shigella dysenteriae*, e Stx2 que é 56% homóloga a Stx1 (GYLES *et al.*, 2010). Stx1 constitui um grupo mais

homogêneo de toxinas, apresentando pequenas variações em sua sequência de aminoácidos, já Stx2 apresenta diversas variantes: Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g (GUTH, 2015). Isolados de STEC podem apresentar apenas um dos genes, ou uma combinação deles, sendo que a capacidade de causar doença e gravidade desta, está relacionada com a variante de Stx identificada (GUTH, 2015).

O grupo de Stx1 é associado a infecções assintomáticas ou leves em humanos, já variantes Stx2 estão frequentemente implicadas em doenças graves (GYLES *et al.*, 2010). Stx2e é identificada, quase exclusivamente, em cepas causadoras de doença do edema em suínos e Stx2f parece estar relacionada a amostras de origem aviária (GUTH, 2015).

Alguns sorotipos de STEC são capazes de colonizar a mucosa intestinal e induzir a lesão histopatológica denominada Lesão AE, (já descrita anteriormente em: 2.1.1.1- A patogenia das EPECs), estes sorotipos são classificados como EHEC; Amostras não portadoras da região LEE podem apresentar outros mecanismos de aderência para a colonização da mucosa intestinal (GUTH, 2015).

3. OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo identificar as diferentes espécies de animais silvestres híbridas, que possam ser portadores e carreadores de *E. coli* dos patótipos STEC, EHEC e EPEC, bem como determinar quais são os patótipos de *E. coli* mais frequentemente encontrados. Os resultados obtidos fornecerão subsídios para uma futura avaliação sobre a atuação de animais silvestres como disseminadores ambientais destes patótipos e os possíveis riscos desta disseminação aos seres humanos.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Neste item é apresentado o manuscrito intitulado “Avaliação de animais silvestres como portadores de patotipos de *Escherichia coli* patogênicas aos seres humanos”, o qual apresenta os resultados obtidos no projeto.

Avaliação de animais silvestres como portadores de patotipos de *Escherichia coli* patogênicas aos seres humanos

RESUMO

Escherichia coli podem ser transmitidas entre diferentes espécies e, a depender dos seus fatores de virulência, são divididas em diferentes patotipos. Os patotipos de *E. coli* diarreicogênicas com maior relevância zoonótica são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* shigatoxigênica (STEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) sendo responsáveis por causar infecções assintomáticas, diarreia aguda e até morte em humanos. Com o intuito de identificar animais silvestres como portadores e potenciais transmissores destes patotipos, amostras de suabe retal ou cloacal de animais silvestres foram cultivadas em Ágar MacConkey Sorbitol, as enterobactérias presentes no cultivo foram recuperadas e o DNA total foi extraído para a análise de quatro genes de virulência de interesse (*tir* EPEC, *stx1*, *stx2* e *tir* EHEC) através de PCR convencional. Dos 110 animais coletados, 71 apresentaram crescimento de enterobactérias no cultivo em Ágar MacConkey Sorbitol e a análise de 63 animais foi concluída, configurando o grupo de estudo do presente trabalho. Dos 63 animais analisados, em 28 foram detectados pelo menos um dos genes analisados. A maior ocorrência destes genes de virulência se deu nas amostras de aves, em que em 40,5% dos animais foram detectados pelo menos um dos genes testados. O gene de virulência mais frequentemente identificado foi *stx2*, estando presente em 19 animais silvestres. O patotipo STEC foi identificado em 23 animais (36,5%), o patotipo EPEC foi identificado em oito animais (12,7%), enquanto o patotipo EHEC foi identificado apenas em dois animais (3,2%). Em conclusão, a identificação dos patotipos de interesse em saúde única foi frequente em animais silvestres e a continuidade desta pesquisa é necessária para esclarecer o papel destes animais como disseminadores ambientais e possível risco desta disseminação para humanos.

Palavras chave: Zoonose. Microbiologia. Sentinela. Bactéria entérica. Saúde única.

ABSTRACT

Escherichia coli can be transmitted between different species and are divided into different pathotypes, based on their virulence factors. Diarrheicogenic *E. coli* pathotypes with zoonotic relevance are: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), shigatoxigenic *E. coli* (STEC) and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). These pathotypes are responsible for causing asymptomatic infections, acute diarrhea, and even death in humans. In order to identify zoonotic *E. coli* pathotypes in wild animals, suggesting their role as pathogen carriers, samples of rectal or cloacal swabs were cultured on MacConkey Sorbitol Agar. Enterobacteria isolates in the culture were recovered, and total DNA was extracted for PCR reactions screening four virulence factors (*tir* EPEC, *stx1*, *stx2* and *tir* EHEC). Of the 110 animals collected, 71 showed growth of enterobacteria in MacConkey Sorbitol Agar culture and the analysis of 63 animals was completed, configuring the study group of the present work. Of the 63 analyzed animals, in 28 at least one of the target genes was detected. The highest occurrence of these virulence factors was in the bird samples, in which at least one of the target genes was detected in 40.5% of the animals. The most frequently identified virulence gene was *stx2* being present in 19 wild animals. The STEC pathotype was identified in 23 animals (36.5%), the EPEC pathotype was identified in eight animals (12,7%), while the EHEC pathotype was identified in only two animals (3,2%). In conclusion, the identification of pathotypes of One Health interest was high in the wild animals analyzed in this study, however, further research is necessary to clarify the role of these animals as environmental disseminators and possible risk of this dissemination to humans.

Keywords: Zoonosis. Microbiology. Sentinel. Enteric bacteria. One health.

Introdução

Escherichia coli responsáveis por causar infecções intestinais são denominadas diarreicogênicas (DEC), e dentre estas as que se destacam por sua importância na saúde pública são as *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* shigatoxigênica (STEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (CHEN; FRANKEL, 2005). EPECs podem causar infecções de subclínicas a fatais e são relacionadas a surtos de diarreia infantil, embora já tenham sido identificadas também causando doença em adultos (NATARO; KAPER, 1998). Através de indução a lesão denominada *attaching and effacing* (lesão AE), característica deste grupo, são capazes de destruir as microvilosidades de enterócitos, levando a diminuição da capacidade absorptiva destas células (GOMES; HERNANDES, 2015). STECs podem causar quadros de infecções assintomáticas, diarreia branda, colite hemorrágica ou até evoluir para Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), que pode levar o paciente a morte (NEWELL; LA RAGIONE, 2017). STECs são caracterizadas pela produção de toxinas Shiga (Stx), principal fator de virulência neste grupo (GYLES *et al.*, 2010). EHECs fazem parte de um subgrupo das STEC, que, além de possuir produção de Stx, também é capaz de produzir lesão AE (GUTH, 2015). Este patotipo é estudado separadamente devido a sua importância para a saúde humana, e dentre as bactérias que compõem este patotipo, há destaque para a cepa *E. coli* O157:H7, por ser responsável pela maioria dos casos de SHU bacteriana no mundo e por possuir baixa dose infectante (menos de 100 micro-organismos) (GUTH, 2015; FERENS; HOVDE, 2011; GYLES *et al.*, 2010).

Bovinos são considerados importantes reservatórios de EPECs e STECs, e diversos estudos já foram realizados relacionando animais domésticos com surtos de doenças causadas por estes patógenos em humanos. Embora o papel dos animais silvestres enquanto disseminadores não tenha ainda sido estabelecido, patotipos de interesse para a saúde humana já foram identificados em diversas espécies. Salsichas de carne de cervo já foram relacionadas a surtos de STEC em humanos (AHN *et al.*, 2009). Cepas de STEC idêntica a isolada em paciente humano foi detectada em fezes de Javali (SÁNCHEZ *et al.*, 2009). Além disso, no Brasil, estudos prévios identificaram cepas de STEC e EHEC em capivaras (BREYER *et al.*, 2022) e cepas de STEC e EPEC foram identificadas em Graxains-do-mato (RIBOLDI *et al.*, 2018).

Sabendo-se que animais silvestres podem ter acesso a locais urbanos e periurbanos, e que o contato direto e indireto entre diferentes espécies animais pode levar a contaminações, o objetivo deste trabalho foi identificar animais silvestres como portadores de cepas de EPEC,

STEC e EHEC, apontando quais patótipos foram mais frequentemente encontrados, além de fornecer informações para futuros trabalhos sobre a atuação destes animais como disseminadores ambientais e os possíveis riscos desta disseminação aos seres humanos.

Materiais e métodos

Autorizações

A coleta de amostras fecais de animais de vida livre realizadas neste projeto tem autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS) nº. 34681 e no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO do IBAMA nº. 62474-1.

Obtenção de amostras

Entre agosto de 2018 e abril de 2022, foram coletadas 110 amostras de suabe retal ou cloacal de animais silvestres, provenientes do Setor de Animais Silvestres do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PRESERVAS-HCV-UFRGS). Foram incluídas no estudo amostras de animais silvestres de quaisquer espécies que atendessem a todos os seguintes critérios: i) animais adultos; ii) animais que não apresentavam intercorrência infecciosa, alterações ou lesões no trato gastrointestinal; iii) animais que não foram submetidos a antibioticoterapia prévia à coleta.

Foram excluídos da pesquisa membros da ordem passeriforme, devido à conhecimento prévio de que as cargas bacterianas são indetectáveis por coleta com suabe e filhotes lactentes, devido a sua microbiota intestinal ainda não estar devidamente formada.

Dentre as amostras coletadas, 71 pertencem a aves, 29 a mamíferos e 10 a répteis. Ao todo, 50 espécies animais foram coletadas ao longo do trabalho. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em refrigeração até a chegada no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRGS (LaBacVet), sendo processadas em menos de 16 h após coleta.

Isolamento Microbiano Seletivo

Os cultivos foram realizados em placas de Ágar MacConkey Sorbitol, através do método do espalhamento. O meio utilizado é diferencial para EHEC, devido ao fato de que a maioria dos isolados não fermenta o açúcar sorbitol rapidamente (GUTH, 2015). Cada suabe foi plaqueado diretamente em uma placa (denominada plaqueamento direto) e, subsequentemente, foi realizada lavagem deste suabe, e posterior diluição do lavado em água destilada estéril, em uma proporção de 10:500, que foi também plaqueada em uma segunda placa de Ágar MacConkey Sorbitol. Ambas as placas foram incubadas por 24 h a 37°C e tiveram o

crescimento de unidades formadoras de colônia (UFCs) registrado. Os procedimentos são ilustrados na Figura 2.

Figura 2- Processamento de suabe retal através de plaqueamento direto do suabe e plaqueamento da diluição do lavado do suabe de cada animal coletado.

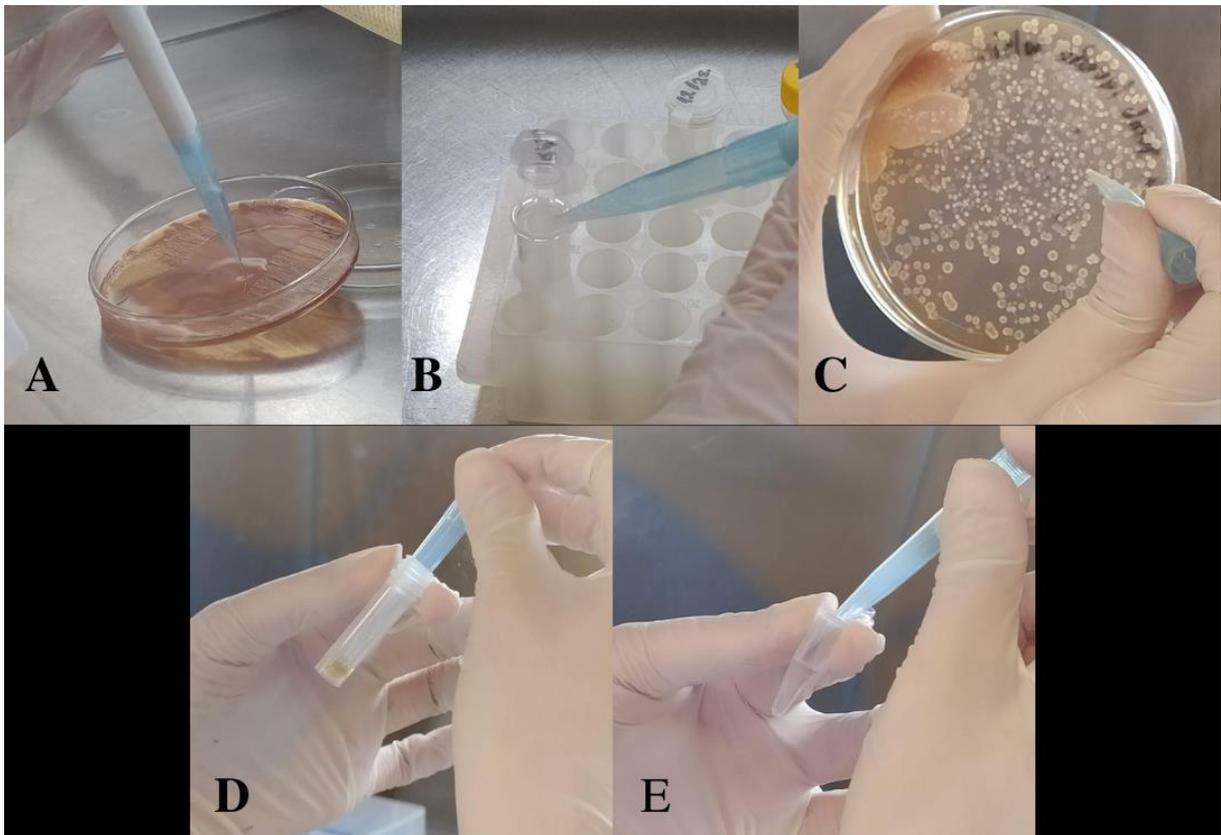


A- Plaqueamento direto do suabe em placa de Ágar MacConkey Sorbitol. B- Corte do suabe, com tesoura estéril em tubo com água destilada para a realização da lavagem. C- Diluição 10:500 do lavado do suabe em água destilada estéril. D- Plaqueamento da diluição, por espalhamento, em uma segunda placa de Ágar MacConkey Sorbitol. Fonte: Próprio autor

Todas as UFCs obtidas através do plaqueamento direto do suabe foram recuperadas através de lavagem da placa realizada com 3 mL de água ultrapura estéril por meio de ponteiros estéreis. Foi recuperado 1,5 mL deste lavado em um microtubo novo, que foi armazenado a - 20°C, para posterior extração de DNA. Também foi armazenado 500 µL do lavado em microtubo estéril contendo 500 µL de glicerol a - 20°C, a fim de manter as bactérias viáveis para posterior cultivo.

Colônias não fermentadoras de sorbitol, quando detectadas, foram selecionadas a partir do plaqueamento da diluição da amostra. As colônias foram divididas em um microtubo com 100 μ L de caldo BHI e 50 μ L de glicerol (para futuros cultivos), e um microtubo com 30 μ L de água ultrapura (para extração de DNA genômico). Ambos foram armazenados a - 20°C. O processo de recuperação e armazenamento das UFCs obtidas é ilustrado na Figura 3.

Figura 3- Recuperação dos crescimentos microbianos em Ágar MacConkey Sorbitol, a partir dos plaqueamentos dos suabes retais.



A- Lavagem do plaqueamento direto do suabe com 3 mL de água ultrapura estéril. B- Recuperação de 1,5 mL do lavado em um microtubo. C- Seleção de colônias não fermentadoras de sorbitol a partir do plaqueamento da diluição do lavado do suabe. D- Recuperação das colônias suspeitas em 100 μ L de caldo BHI e 50 μ L de glicerol. E- Recuperação das colônias suspeitas em microtubo com 30 μ L de água ultrapura. Fonte: Próprio autor

Extração de DNA genômico total do lavado das placas com crescimento microbiano

O lavado foi mantido a -20°C e descongelado lentamente na geladeira antes da extração. Foram utilizados 200 μ L para extração total do DNA bacteriano e o restante foi novamente armazenado a -20°C. O DNA genômico foi extraído a partir do método orgânico por fenol/clorofórmio, padronizado no presente estudo. A etapa de digestão celular foi realizada a partir do acréscimo de 1 mL de Set Buffer (50 mM Tris HCl pH 8,0, 50 mM EDTA e sacarose 20%) e 10 μ L de lisozima (50 mg/mL), com incubação a 55°C por 1 h sob agitação leve. Após,

foi acrescentado 10 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 200 µL de SDS 10%, e incubado a 55°C por 1 h, com agitação leve. A desnaturação de contaminantes proteicos e separação entre as fases orgânica e aquosa foi realizada através da utilização de fenol/clorofórmio em proporção 1:1, com posterior centrifugação por 9 min a 13.800 g. O sobrenadante foi recuperado e foi realizada nova lavagem com clorofórmio, em proporção 1:1, sendo centrifugado por 7 min a 13.800 g. O sobrenadante foi recuperado e foi utilizado etanol absoluto, 2,5 volumes, para a precipitação dos ácidos nucleicos a -20°C, *overnight*. Após centrifugação por 10 min a 16.000 g, o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% e foi feita centrifugação por 2 min a 16.000 g. O precipitado foi seco e ressuspendido em 30 µL de água ultrapura. Os DNAs foram posteriormente tratados com 2 µL de RNase (10 ng/µL) com incubação de 1 h a 37°C. A integridade dos DNAs foi analisada em gel de agarose 0,8%, corados com Unisafe Dye (Uniscience, Miami Lakes, FL, USA) e observados sob luz ultravioleta. Os DNAs obtidos foram armazenados a -20°C.

Caracterização dos genes de virulência

As amostras foram analisadas através de método de reação em cadeia da polimerase (PCR), quanto à presença ou ausência de quatro genes de virulência, a fim de caracterizar a presença dos patótipos EPEC, STEC e EHEC de *E. coli*. Os genes investigados foram: *tir* EPEC, *stx1*, *stx2* e *tir* EHEC. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 1 e as reações foram realizadas seguindo a metodologia presente em Breyer *et al.*, 2022. Para o gene *tir* EPEC, o controle positivo utilizado foi DNA de uma cepa de campo de controle interno (*E. coli* Ag20). Para os genes *stx1*, *stx2* e *tir* EHEC o controle positivo utilizado foi DNA de *E. coli* O157:H7 SASAKI. O controle negativo foi realizado em paralelo, mas livre de DNA genômico. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose, na concentração 0,9% para identificação dos genes *stx1*, *stx2* e *tir* EPEC e na concentração 2% para identificação do gene *tir* EHEC, corados com Unisafe Dye (Uniscience, Miami Lakes, FL, USA) e observados sob luz ultravioleta.

Tabela 1– Sequências de *primers* empregados neste projeto

Gene	Identificação do primer	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto
<i>stx1</i>	Stx1-F	TGG TTG CGA AGG AAT TTA CC	176pb
	Stx1-R	CTG ACA TCA ACT GCA AAC AAA	
<i>stx2</i>	Stx2-F	TCC CGG GAG TTT ACG ATA GA	194pb
	Stx2-R	AAA CGC GCC TGA TAG ACA TC	
<i>tir</i> EHEC	TirEHEC-F	ACC TGC ACA GGG CAA TGT AG	132pb
	TirEHEC-R	TCA GCA TAC GGA TTC TGC AC	
<i>tir</i> EPEC	TirEPEC-F	GAA CTT CAA ATC CTC CAA GCA	133pb
	TirEPEC-R	TCA TTG TTT TCT CCC CTG AG	

Fonte: próprio autor.

Resultados

Ao todo 110 animais foram coletados, sendo que 71 apresentaram crescimento de entorobactérias no cultivo em Ágar MacConkey Sorbitol, e destes, 63 tiveram as análises moleculares concluídas, configurando o grupo de estudo do presente trabalho. Dos 63 animais analisados, 28 foram detectados com, pelo menos, um dos genes testados, sendo assim os animais categorizados como carreadores de pelo menos um patotipo de *E. coli*.

Como pode ser observado na Tabela 2, a maior identificação dos genes testados ocorreu no grupo das aves, em que 15 animais foram positivos (40,5%). O gene de virulência mais frequentemente identificado foi *stx2*, estando presente em 19 amostras (30,1%), sendo que em cinco destas foi identificado em conjunto com outros genes. Os genes *tir* EPEC e *stx1* foram identificados em nove amostras (14,3%), enquanto que, o gene *tir* EHEC foi o menos frequente, identificado em duas amostras (3,2%).

Tabela 2- Identificação de patotipos de *E. coli* em diferentes grupos animais através da análise molecular da presença de genes de virulência

Genes de virulência	Aves	Mamíferos	Répteis	Patotipo <i>E. coli</i>
tir EPEC	2	1	0	EPEC
stx1	1	0	1	STEC
stx2	9	5	0	STEC
tir EPEC+ stx1	2	0	2	EPEC/STEC
tir EPEC+ stx2	0	1	0	EPEC/STEC

tir EPEC+ stx1 + stx2	0	1	0	EPEC/STEC
stx1 + stx2	0	1	0	STEC
tir EHEC + stx2	1	0	0	EHEC
tir EHEC + stx1 + stx2	0	1	0	EHEC
Total	15/37	10/17	3/9	28/63

Fonte: Próprio autor

O patotipo STEC foi identificado em 23 amostras (36,5%), e sua ocorrência foi mais observada entre mamíferos (47%). O patotipo EPEC foi identificado em oito amostras (12,7%), sendo que sua ocorrência foi maior em répteis (22,2%) e o patotipo EHEC foi identificado em duas amostras, tendo ocorrência de 6% em mamíferos, 2,7% em aves e não sendo identificado em répteis (Figura 4).

Figura 4- Gráficos de setores representativos acerca da detecção de genes dos patotipos de *Escherichia coli* enteropatogênica, *Escherichia coli* shigatoxigênica e *Escherichia coli* enterohemorrágica referentes a cada grupo de animais testados

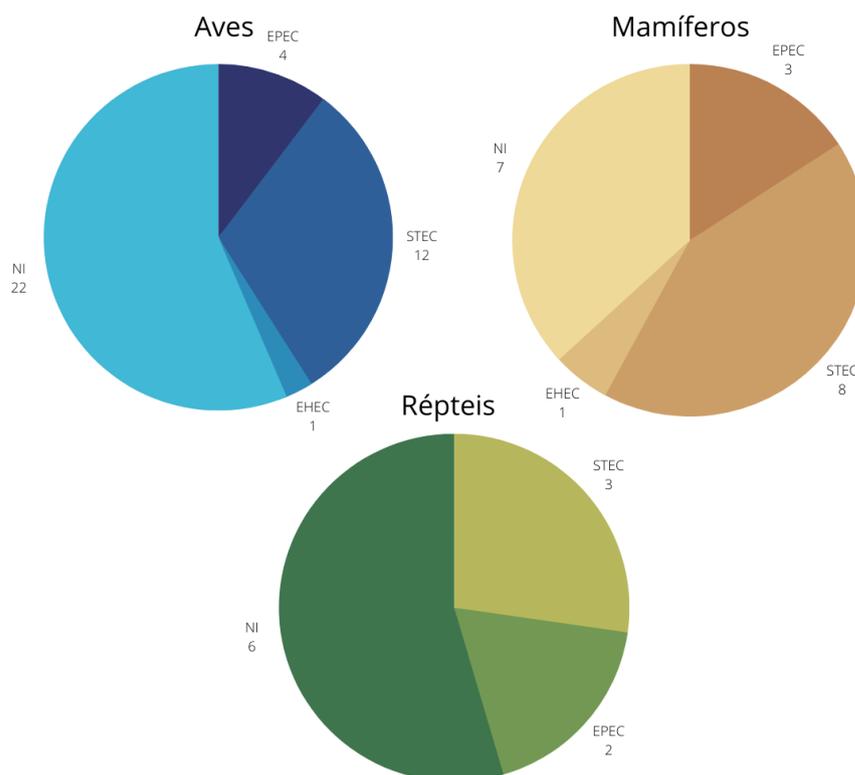


Gráfico de setores de coloração azul representativo de aves, gráfico de setores de coloração amarela representativo de mamíferos, gráfico de setores de coloração verde representativo de répteis; NI: Animais que não tiveram a detecção de nenhum patotipo. Fonte: próprio autor.

Foram analisadas 38 amostras de aves e, nestas, detectamos o patotipo STEC em 12 animais, o patotipo EPEC em quatro e o patotipo EHEC em um. O gene mais identificado foi *stx2*, que estava presente em 10 animais (Tabela 3).

Tabela 3- Identificação de diferentes patotipos de *E. coli* em espécies de aves através da análise de genes de virulência

Id. animal	Espécie*	<i>tir</i> EPEC	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>tir</i> EHEC	Patotipo <i>E. coli</i>
002/18	Aracua-escamoso	-	-	-	-	NI
009/22	Caraúna	-	-	-	-	NI
019/18	Carcará	-	-	+	-	STEC
025/19	Caturrita	-	-	+	-	STEC
020/21	Caturrita	-	-	-	-	NI
001/22	Caturrita	+	+	-	-	EPEC + STEC
043/18	Colhereiro	-	-	-	-	NI
005/18	Coruja-orelhuda	-	-	-	-	NI
008/18	Corujinha-do-mato	-	-	+	+	EHEC
006/22	Corujinha-do-mato	-	-	-	-	NI
010/22	Corujinha-do-mato	-	-	+	-	STEC
004/18	Curicaca	-	-	-	-	NI
005/22	Curicaca	+	+	-	-	EPEC + STEC
023/18	Cutia	-	-	-	-	NI
041/18	Frango-d'água	-	-	-	-	NI
001/18	Gavião-carijó	-	-	-	-	NI
020/19	Gavião-carijó	-	-	+	-	STEC
016/18	Gavião-cabloco	-	-	+	-	STEC
045/18	Jacurutu	-	+	-	-	STEC
010/21	Mocho-diabo	-	-	+	-	STEC
006/18	Mocho-diabo	-	-	-	-	NI
026/18	Mocho-diabo	-	-	-	-	NI
035/18	Mocho-diabo	-	-	-	-	NI

037/18	Mocho-orelhuda	-	-	-	-	NI
039/18	Papagaio-verdadeiro	-	-	-	-	NI
038/18	Pica-pau	-	-	+	-	STEC
003/18	Pomba-de-bando	-	-	-	-	NI
046/18	Quero-quero	-	-	-	-	NI
004/22	Quero-quero	-	-	+	-	STEC
022/18	Saracura	-	-	-	-	NI
014/19	Saracura	-	-	-	-	NI
012/21	Suindara	-	-	+	-	STEC
002/22	Suindara	-	-	-	-	NI
025/18	Tapicuru	+	-	-	-	EPEC
028/18	Tucano	+	-	-	-	EPEC
004/19	Tucano	-	-	-	-	NI
012/19	Urubu	-	-	-	-	NI
Total		4/38	3/38	10/38	1/38	

* Utilizada nomenclatura não científica; Id: identificação; +: presença do gene; -: ausência do gene; NI: não identificado.

Fonte: Próprio autor

Foi realizada análise de 17 amostras de mamíferos e 10 apresentaram a identificação de pelo menos um gene testado (Tabela 4). Oito amostras foram identificadas como pertencentes ao patotipo STEC, três ao patotipo EPEC e uma ao patotipo EHEC. Assim como nas aves, o gene mais identificado foi *stx2*, presente em nove amostras.

Tabela 4- Identificação de diferentes patotipos de *E. coli* em espécies de mamíferos através da análise de genes de virulência

Id. animal	Espécie*	<i>tir EPEC</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>tir EHEC</i>	Patotipo <i>E. coli</i>
018/18	Bugio-ruivo	-	-	-	-	NI
012/22	Bugio-ruivo	+	-	-	-	EPEC
010/18	Gambá-de-orelha-branca	-	-	-	-	NI
016/19	Gambá-de-orelha-branca	+	+	+	-	EPEC/STEC

005/21	Gambá-de-orelha-branca	-	-	-	-	NI
006/21	Gambá-de-orelha-branca	-	-	-	-	NI
001/20	Graxaim-do-campo	-	-	+	-	STEC
027/18	Graxaim-do-mato	-	+	+	+	EHEC
004/21	Graxaim-do-mato	+	-	+	-	EPEC/ STEC
017/21	Graxaim-do-mato	-	-	+	-	STEC
021/21	Macaco-prego	-	+	+	-	STEC
022/21	Macaco-prego	-	-	-	-	NI
022/19	Mão-pelada	-	-	+	-	STEC
011/22	Ouriço	-	-	-	-	NI
033/18	Tatu	-	-	-	-	NI
002/21	Veado-catingueiro	-	-	+	-	STEC
003/21	Veado-catingueiro	-	-	+	-	STEC
Total		3/17	3/17	9/17	1/17	

* Utilizada nomenclatura não científica; Id: identificação; +: presença do gene; -: ausência do gene; NI: não identificado

Fonte: Próprio autor

Como pode ser observado na Tabela 5, o patotipo STEC foi o mais identificado em répteis, estando presente em três amostras, e o gene mais identificado nesse grupo foi o *stx1*. O patotipo EPEC foi identificado em duas amostras. Vale ressaltar que os genes *tir EHEC* e *stx2* não foram identificados em nenhum dos répteis analisados no presente estudo.

Tabela 5- Identificação de diferentes patotipos de *E. coli* em espécies de répteis através da análise de genes de virulência

Id. animal	Espécie*	<i>tir EPEC</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>tir EHEC</i>	Patotipo <i>E. coli</i>
011/18	Cobra-dormideira	-	-	-	-	NI
001/21	Jararaca-pintada	-	-	-	-	NI

015/19	Tartaruga-verde	-	-	-	-	NI
024/18	Teiú	-	+	-	-	STEC
013/19	Teiú	+	+	-	-	EPEC/ STEC
023/19	Teiú	-	-	-	-	NI
029/18	Tigre-d'água	-	-	-	-	NI
042/18	Tigre-d'água	-	-	-	-	NI
007/22	Tigre-d'água	+	+	-	-	EPEC/ STEC
Total		2/9	3/9	0/9	0/9	

* Utilizada nomenclatura não científica; Id: identificação; +: presença do gene; -: ausência do gene; NI: não identificado

Fonte: Próprio autor

Discussão

Diversos estudos investigaram a influência de ruminantes e outros animais domésticos como fator de risco para a transmissão de EPECs, STECs e EHECs. Porém, há poucos estudos que relacionam a influência de animais silvestres na transmissão destas bactérias para humanos, animais domésticos e dentro da cadeia alimentar (ESPINOSA *et al.*, 2018), o que pode ter relação com a dificuldade de obtenção de amostras (MILTON *et al.*, 2019).

O presente estudo identificou 28/63 animais positivos para pelo menos um gene analisado, registrando assim uma alta ocorrência dos patótipos EPEC, STEC e EHEC (44,4%). Também foi possível analisar a presença dos patótipos em diferentes grupos animais, sendo que o único patótipo que não foi presente em todos os grupos foi EHEC (ausente nas amostras de répteis analisadas).

A identificação de uma cepa de EHEC em um Graxaim-do-mato (*Cerdocyon thous*) demonstra a presença deste patótipo em animais que transitam desde áreas nativas até zonas rurais e em áreas suburbanas, podendo buscar alimento perto de habitações humanas, entrando em contato com alimentos cultivados, animais domésticos, e fontes de água (FACURE; GIARETTA; MONTEIRO-FILHO, 2003). Essa proximidade possibilita que animais desta espécie sejam potenciais fontes de infecção para humanos e outros animais, podendo contribuir para o ciclo de contaminação entre animais silvestres, animais domésticos e humanos (RIBOLDI *et al.*, 2018). Em estudo anterior, no Brasil, uma cepa de STEC foi identificada em Graxaim-do-mato (RIBOLDI *et al.*, 2018). Porém, até o momento nenhum trabalho havia identificado o patótipo EHEC em graxains do mato.

O patotipo EHEC também foi identificado em uma Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*), espécie caracterizada por habitar áreas com cobertura arbórea e predação de animais como insetos, pequenos vertebrados, anfíbios e serpentes (BARROS, 2011). O hábito alimentar desta espécie pode ter relação com a fonte para sua infecção, por se tratar de um animal predador. Não foram encontrados relatos anteriores de identificação do patotipo EHEC nesta espécie animal, apenas em outras espécies de aves silvestres. No Reino Unido, foi identificada, em uma gralha-calva (*Corvus frugilegus*), uma cepa de *E. coli* O157:H7 idêntica à isolada de três casos humanos (EJIDOKUN *et al.*, 2006). Além disso, algumas espécies de aves silvestres são descritas como carreadoras do patotipo STEC. A saber, na Itália, uma espécie de coruja (*Athene noctua*) foi identificada como portadora de STEC (BERTELLONI *et al.*, 2019). No Brasil, um estudo identificou a presença de STECs multirresistentes à ação de antibióticos em diversas espécies de aves silvestres e pombos (BORGES *et al.*, 2017).

O patotipo mais identificado no presente estudo foi de STEC e, em concordância com outros estudos que analisaram a presença de STECs em animais silvestres, o gene que codifica a toxina Shiga mais identificado foi *stx2*, sozinho ou em associação a *stx1* (ASAKURA *et al.*, 1998; MORA *et al.*, 2012; ALONSO *et al.*, 2017). Ruminantes silvestres são o grupo de animais mais comumente analisados para a presença de STECs, sendo que os cervídeos são os animais mais pesquisados (ESPINOSA *et al.*, 2018). No presente estudo, nós identificamos dois veados-catingueiros como carreadores do patotipo STEC (com a presença do gene *stx2*). Comparativamente, na Espanha, 7,6% dos cervos analisados em um estudo foram positivos para STEC (ALONSO *et al.*, 2017). Um resultado semelhante ocorreu na Índia, em que 9,37% dos cervos analisados foi positivo para STECs (MISHRA; JAIN; SINGH, 2016).

Dentre o grupo de répteis, analisados no presente estudo, os patotipos EPEC e STEC foram identificados concomitantemente em quelônios Tigre-d'água (*Trachemys dorbignii*) e lagartos Teiús (*Tupinambis merianae*), espécies bem adaptadas a ambientes naturais e antrópicos (SILVEIRA *et al.*, 2019; SCHAUMBURG *et al.*, 2014). Os resultados obtidos nesse trabalho são corroborados pelo trabalho de Bautista-Trujillo *et al.* (2020) que também identificaram cepas de STEC em répteis, tendo identificado o patotipo em Iguanas Verdes criadas em cativeiro.

Destacamos que, a proximidade das espécies silvestres com áreas habitadas por humanos pode sugerir uma possível fonte de infecção dos patotipos de *E. coli* para outros animais e humanos, pois as espécies silvestres parecem atuar significativamente como carreadores assintomáticos destas bactérias. Além da contaminação de fontes de água, animais domésticos e plantações, a identificação destas bactérias em espécies silvestres como Veado-

catingueiro e lagartos Teiús também apresenta o risco de contaminação direta por diversos patótipos de *E. coli*, através da caça e consumo de carne.

Conclusão

A pesquisa evidenciou frequente presença dos genes de virulência pesquisados em variadas espécies de animais silvestres, o que sugere a possibilidade destes animais atuarem como disseminadores dos patótipos EPEC, STEC e EHEC. Os patótipos estudados foram identificados em espécies com habitat periurbano, o que sugere uma implicação maior de risco para saúde humana, mas também foram identificados em espécies com habitat natural, o que pode indicar o quanto ações humanas impactam o meio ambiente representando um risco também a animais silvestres. É importante que a interface epidemiológica entre seres humanos e animais silvestres seja melhor estabelecida para que medidas possam ser tomadas a fim de resguardar a saúde humana e a saúde animal.

Agradecimentos

À Pró-reitoria de Pesquisa da UFRGS – Edital 001/19- Apoio à Pesquisa de Docentes Recém-Contratados pela UFRGS.

4. CONCLUSÕES

- Animais silvestres são potenciais portadores de patótipos de *E. coli* patogênicas para os seres humanos.
- O patótipo mais identificado, dentre os estudados, foi o STEC.
- O gene *stx2* foi o gene mais identificado dentre os analisados neste estudo.
- Os patótipos EPECs e STECs foram identificados em aves, répteis e mamíferos.
- EHECs foram identificadas em Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*) e Graxaim-do-mato (*Cerdocyon thous*).

5. PERSPECTIVAS

- Realização de mais análises das amostras positivas neste estudo, a fim de determinar outros fatores de virulência e resistência das cepas identificadas e isoladas;

- Análise de mais amostras, de diferentes espécies animais, para esclarecer quais animais são capazes de atuarem como portadores de STEC, EPEC e EHEC.

REFERÊNCIAS

- AHN, C. K. *et al.* Deer Sausage: a newly identified vehicle of transmission of *Escherichia coli* O157. **The Journal of Pediatrics**, [S.l.], v. 155, n. 4, p. 587-589, Oct. 2009.
- ALONSO, C. A. *et al.* Occurrence and characterization of *stx* and/or *eae* -positive *Escherichia coli* isolated from wildlife, including a typical EPEC strain from a wild boar. **Veterinary Microbiology**, [S.l.], v. 207, p. 69-73, Aug. 2017.
- ASAKURA, H. *et al.* Detection and genetical characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from wild deer. **Microbiology and Immunology**, [S.l.], v. 42, n. 12, p. 815-822, Dec. 1998.
- BARBIERI, N. L. *et al.* Characterization of extraintestinal *Escherichia coli* isolated from a peacock (*Pavo cristatus*) with colisepticemia. **Avian Diseases**, [S.l.], v. 56, n. 2, p. 436-440, June 2012.
- BARRETT, T. J. *et al.* Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 32, n. 12, p. 3013-3017, Dec. 1994.
- BARROS, F. M. **Área de vida, uso e seleção de habitat pela corujinha-do-mato *Megascops choliba* (Strigiformes-Strigidae) em uma área de cerrado na região central do estado de São Paulo**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- BAUTISTA-TRUJILLO, G. U. *et al.* Captive green iguana carries diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. **Frontiers In Veterinary Science**, [S.l.], v. 7, n. 99, p. 1-9, Feb. 2020.
- BERTELLONI, F. *et al.* Occurrence of *Escherichia coli* virulence genes in feces of wild birds from Central Italy. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 142-146, Mar. 2019.
- BORGES, C. A. *et al.* Wild birds and urban pigeons as reservoirs for diarrheagenic *Escherichia coli* with zoonotic potential. **Journal of Microbiology**, [S.l.], v. 55, n. 5, p. 344-348, Mar. 2017.
- BREYER, G. M. *et al.* Wild capybaras as reservoir of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in urban Amazonian Region. **Letters in Applied Microbiology**, [S.l.], Mar. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/lam.13694>. Acesso em: 4 abr. 2022.
- CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 83-98, Jan. 2005.
- CROXEN, M. A. *et al.* Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, [S.l.], v. 26, n. 4, p. 822-880, Oct. 2013.
- EJIDOKUN, O. O. *et al.* Human Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) O157 infection linked to birds. **Epidemiology and Infection**, [S.l.], v. 134, n. 2, p. 421-423, Sept. 2005.

- ESPINOSA, L. *et al.* A scoping review on the prevalence of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* in wild animal species. **Zoonoses and Public Health**, [S.l.], v. 65, n. 8, p. 911-920, Aug. 2018.
- FACURE, K. G.; GIARETTA, A. A.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Food habits of the crab-eating-fox, *Cerdocyon thous*, in an altitudinal forest of the Mantiqueira Range, southeastern Brazil. **Mammalia**, [S.l.], v. 67, n. 4, p. 503-511, Jan. 2003.
- FERENS, W. A.; HOVDE C. J. *Escherichia coli* O157: H7. **Foodborn Pathogens and Disease**, [S.l.], v. 8, n. 4, p. 465-487, Apr. 2011.
- GOMES, T. A. T. G.; HERNANDES, R. T. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). In: ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. cap. 36, p. 303-309.
- GONZALEZ, A.; CERQUEIRA, A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, [S.l.], v. 128, n. 6, p. 1568-1582, Dec. 2019.
- GUTH, B. E. C. *et al.* *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC). In: ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. cap. 37, p. 311-315.
- HAO, R. *et al.* Quinolone-Resistant *Escherichia coli* O127a: K63 serotype with an extended-spectrum-beta-lactamase phenotype from a food poisoning outbreak in china. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 50, n. 7, p. 2450-2451, July 2012
- HEUVELINK, A. E. *et al.* *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. **Epidemiology and Infection**, [S.l.], v. 129, n. 2, p. 295-302, Oct. 2002.
- HILBORN, E. D. *et al.* An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and haemolytic uraemic syndrome associated with consumption of unpasteurized apple cider. **Epidemiology and Infection**, [S.l.], v. 124, n. 1, p. 31-36, Feb. 2000.
- JENKINS, C. *et al.* Subtyping intimin genes from enteropathogenic *Escherichia coli* associated with outbreaks and sporadic cases in the United Kingdom and Eire. **Molecular and Cellular Probes**, [S.l.], v. 17, n. 4, p. 149-156, Aug. 2003.
- KOLENDA, R.; BURDUKIEWICZ, M.; SCHIERACK, P. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S.l.], v. 5, n. 23, p. 1-12, Mar. 2015.
- LAIDLER, M. R. *et al.* *Escherichia coli* O157: H7 infections associated with consumption of locally grown strawberries contaminated by deer. **Clinical Infectious Diseases**, [S.l.], v. 57, n. 8, p. 1129-1134, July 2013.
- MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R. Enterobacteriaceae. In: ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. cap. 35, p. 293-301.

- MICHEL, P. *et al.* Temporal and geographical distributions of reported cases of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Ontario. **Epidemiology and Infection**, [S.l.], v. 122, n. 2, p. 193-200, Apr. 1999.
- MILTON, A. A. P. *et al.* Captive wildlife from India as carriers of Shiga toxin-producing, enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Veterinary Medical Science**, [S.l.], v. 81, n. 2, p. 321-327, Feb. 2019.
- MISHRA, R. P.; JAIN, U.; SINGH, R. K. Genotypic study of verocytotoxic *Escherichia coli* isolates from deer by multiplex polymerase chain reaction. **Veterinary World**, [S.l.], v. 9, n. 8, p. 919-921, Aug. 2016.
- MORA, A. *et al.* Seropathotypes, phylogroups, Stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 78, n. 8, p. 2578-2585, Apr. 2012.
- MOURA, R. A. *et al.* Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 75, n. 23, p. 7399-7408, Dec. 2009.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan. 1998.
- NEWELL, D. G.; LA RAGIONE, R. M. Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): where are we now regarding diagnostics and control strategies?. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S.l.], v. 65, p. 49-71, Jan. 2018.
- RIBOLDI, C. I. *et al.* Genes encoding Shiga toxin and the intimin receptor detected in faecal samples collected from wild canids. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S.l.], v. 46, n. 1620, p. 1-4, Dec. 2018.
- ROBERTS C. L. *et al.* The role of heightened surveillance in an outbreak of *Escherichia coli* O157: H7. **Epidemiology & Infection**, [S.l.], v. 115, n. 3, p. 447-454, May 2009.
- SÁNCHEZ, S. *et al.* Detection and characterisation of O157: H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. **Veterinary Microbiology**, [S.l.], v. 143, n. 2-4, p. 420-423, July 2010.
- SCHAUMBURG, L. G. *et al.* Spontaneous genetic damage in the tegu lizard (*Tupinambis merrianae*): the effect of age. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [S.l.], v. 766, p. 5-9, May 2014.
- SHEFER, A. M. *et al.* A cluster of *Escherichia coli* O157:H7 infections with the hemolytic-uremic syndrome and death in California. A mandate for improved surveillance. **Western Journal of Medicine**, [S.l.], v. 165, n. 1-2, p. 15-19, July-Aug. 1996.
- SILVA, R. M.; SANTOS, A. C. M. *Escherichia coli* patogênica extraintestinal (ExPEC). In: ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. cap. 41, p. 333-341.

SILVEIRA, E. C. *et al.* Diet of *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) (*Testudines: Emydidae*) in anthropic environments from southern Brazil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, [S.l.], v. 14, n. 1, p. 42-50, 2019.

VIEIRA, M. A. *et al.* Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiologic agents of sporadic and outbreak-associated diarrhoea in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, [S.l.], v. 65, n. 9, p. 998-1006, Sept. 2016.

VILJANEN, M. K. *et al.* Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* 0111: B4 in schoolchildren and adults. **The Lancet**, [S.l.], v. 336, n. 8719, p. 831-834, Oct. 1990.

YATSUYANAGI, J. *et al.* Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 41, n. 5, p. 2033-2039, May 2003.

VALCOUR, J. E. *et al.* Associations between indicators of livestock farming intensity and incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. **Emerging Infectious Diseases**, [S.l.], v. 8, n. 3, p. 252-257, Mar. 2002.