

ANÁLISE GENÔMICA DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) ISOLADA DE PSITACÍDEO CATIVO

Genomic analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from a captive psittacine Bird

Terezinha Knöbl^{1*}, André Becker Simões Saidenberg¹, Rosely Martins Gioia-Di Chiacchio¹, Marcos Paulo Cunha Vieira¹.

1. Universidade de São Paulo (USP) - Patologia, Brasil.

*Contato principal: veterinaria.tk@gmail.com

Palavras-chave: *Escherichia coli* diarreio gênica, Enterobacteriaceae, medicina aviária.

Keywords: Diarrheagenic *Escherichia coli*, Enterobacteriaceae, avian medicine.

Escherichia coli diarreio gênica representa uma categoria de patógenos que agrupa seis patotipos diferentes, associados à ocorrência de diarreias em humanos e animais, com notável potencial zoonótico (1). Na medicina aviária, o patotipo mais prevalente é *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), que afeta com psitacídeos cativos, mantidos em condições precárias de biossegurança (2). No Brasil, existem relatos de EPEC em psitacídeos (2,3), mas os dados de caracterização molecular das estirpes são inexistentes. O objetivo deste trabalho foi realizar a análise genômica de uma estirpe de *Escherichia coli* diarreio gênica isolada de um psitacídeo cativo. Material e Métodos: Uma arara-vermelha (*Ara chloroptera*), adulta e de sexo indeterminado, mantida em ambiente domiciliar como ave de estimação foi identificada como portadora de uma estirpe de *Escherichia coli* diarreio gênica. Após o isolamento, a estirpe foi caracterizada como EPEC, positiva na Reação em Cadeia pela ação da Polimerase (PCR) para o gene *eae*, que codifica a intimina responsável pelo processo de aderência íntima ao epitélio intestinal e formação da lesão em pedestal (4) (Figura 1). Para a caracterização molecular do isolado, o DNA genômico foi extraído com o Kit PureLink Genomic DNA (Life Technologies) e encaminhado para a CEFAP-ICB-USP, onde foram realizados o preparo da biblioteca genômica e o sequenciamento *paired-end* com fragmentos de 150 pares de base pela plataforma IlluminaTM NextSeq. Após a avaliação da qualidade e trimagem das reads, foi realizada a análise in silico do sorotipo, filogrupo, determinantes de resistência antimicrobiana, fatores de virulência e a tipagem por sequenciamento de Multilocus (MLST), utilizando as ferramentas do banco de dados ABRicate e MLST (<https://github.com/tseemann>) na plataforma do BioLinux. Resultados Os resultados da análise in silico confirmaram a existência do gene *eae* e do operon *bfp*, classificando a estirpe como EPEC típica. A estirpe pertence ao sorotipo O109:H21, ST40, filogrupo B1. Os determinantes de virulência encontrados, além de *eae* e *bfp* foram: *perA*, *cif*, *esp*, *iss*, *nleA*, *ompA*. A estirpe apresentou determinantes genéticos de resistência apenas para a tetraciclina. Discussão EPEC é um patógeno humano não toxigênico, que causa diarreia devido a uma lesão intestinal em forma de pedestal, denominada AE (attaching and effacing). Estirpes de EPEC típicas possuem um grande plasmídeo de virulência denominado EAF, que codifica uma fímbria do Tipo IV, denominada *bfp* (*bundle-forming pilus*). A expressão do gene *bfp* permite uma aderência frouxa no intestino, que ocorre em até 3 horas após a infecção, seguida da aderência íntima e formação do pedestal, devido à expressão da intimina codificada pelo gene *eae*. Estes dois genes (*eae* e *bfp*) são considerados marcadores moleculares de EPEC típica (1). A caracterização molecular desta estirpe confirmou a sua classificação como EPEC típica, que raramente é reportada em animais, uma vez que estes são reconhecidos apenas como portadores de EPEC atípicas

(negativas para *bfp*) (1). A análise de bioinformática revelou que a estirpe pertence ao filogrupo B1 e sorotipo O109:H21. Este sorotipo nunca foi descrito em aves e também não é considerado um sorotipo clássico de EPEC de origem humana (1). Os dados de MLST revelaram que a estirpe pertencente ao ST40. Na medicina veterinária, este ST foi identificado apenas em um pombo urbano na cidade de Jaboticabal – SP. No entanto, a estirpe do pombo foi classificada como EPEC atípica, não tipável e pertencente ao filogrupo A, diferindo do nosso isolado. Além dos marcadores de virulência *eae* e *bfp* a análise in silico identificou a presença de um regulador transcricional *perA* e dos genes *esp*, que codificam as proteínas efetoras do Sistema de Secreção Tipo III. Dois outros genes relacionados às proteínas efetoras foram identificados: *cif* e *nleA*. As proteínas codificadas por estes genes não têm uma participação direta na formação da lesão AE, mas elas são moduladoras da resposta inflamatória e participam do processo de ruptura do citoesqueleto dos enterócitos, sendo consideradas responsáveis pelo aumento da virulência bacteriana (1). Como fatores adicionais de virulência foram detectados também os genes de resistência sérica *iss* e a proteína de membrana externa *ompA*. Em teoria, estes genes poderiam aumentar a chances de infecções sistêmicas, uma vez que eles facilitam a evasão bacteriana do sistema imunológico do hospedeiro (1). A estirpe isolada não apresentou determinantes genéticos relacionados à multirresistência. A interpretação dos dados da análise de bioinformática revelou potencial de virulência, além de sugerir risco zoonótico. Novos estudos epidemiológicos devem ser realizados para obtenção de dados de prevalência e monitoramento das estirpes de *E. coli* diarreiogênicas pertencentes ao ST40 em aves. Conclusão Este é o primeiro relato de EPEC O109:H21 ST40 em aves. O sequenciamento de DNA total mostrou ser uma ferramenta útil para a busca dos determinantes de resistência e virulência de EPEC, permitindo ainda a determinação do sorotipo, grupo filogenético e ST. Esta ferramenta ainda é pouco utilizada na medicina veterinária, mas trará informações importantes para o estudo da patogenia e da epidemiologia das infecções causadas por enterobactérias em aves, permitindo uma correta interpretação do risco zoonótico implicado na manutenção de animais selvagens como pets. O melhor entendimento sobre a colibacilose aviária também contribuirá para a abordagem clínica e de preservação de espécies, servindo como critério nos processos de manutenção em cativeiro, reabilitação e soltura dos animais.

Referências Bibliográficas: 1. Gomes TAT, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Braz J Microbiol 2016; 47(1):3-30. 2. Sanches LA, et al. Captive wild birds as reservoirs of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC). Braz J Microbiol 2017; 48:760–763. 3. Saidenberg, AB, et al. Molecular detection of enteropathogenic *Escherichia coli* in asymptomatic captive psittacines. Pesq Vet Bras. 2012; 32(9), 922-926. 4. Gioia-Di Chiacchio RM, et al. Shiga Toxin producing *Escherichia coli* (STEC): Zoonotic risks associated with psittacine pet birds in home environments. Vet Microbiol. 2016; 184:27-30. 5. Borges CA, et al. Wild birds and urban pigeons as reservoirs for diarrheagenic *Escherichia coli* with zoonotic potential. J Microbiol. 2017; 55:344-48.