

# Caracterização molecular de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica em animais silvestres capturados na Região Amazônica

## Molecular characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in wild animals captured in the Amazon Region

Daniela Cristiane da Cruz Rocha, Anderson Nonato do Rosario Marinho, Schirley Dias dos Santos, Edvaldo Carlos Brito Loureiro

Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

### RESUMO

**OBJETIVO:** Identificar animais silvestres como reservatórios de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica (aEPEC). **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram pesquisados os fatores de virulência de aEPEC (*eae* e *bfp*) em 263 amostras de *E. coli* isoladas de 260 animais silvestres capturados em três municípios do estado do Pará (Marabá, Parauapebas e Canaã dos Carajás), de março de 2008 a dezembro de 2009. Os métodos de pesquisa aplicados foram a reação em cadeia da polimerase, utilizando *primers* específicos, seguida do sequenciamento do gene *eae*. **RESULTADOS:** Dentre as 263 amostras de *E. coli* avaliadas, foram observadas 3,04% (8/263) como aEPEC, com 2,66% (7/263) em roedores e 0,4% (1/263) em marsupiais. Dentre as amostras analisadas, observou-se a presença de quatro variantes de intimina:  $\beta 1$  (amostras 574, 812 e 813),  $\beta 2$  (amostra 630),  $\zeta$  (amostras 445 e 447) e  $\epsilon$  (amostras 611 e 856). Após análise filogenética pelo método de agrupamento de pares não ponderados com base na média aritmética, foi obtida a árvore consenso que apresentou a formação de dois grupos: o primeiro composto por KT591282.1,  $\epsilon 1$  intimina (611 e 856) com KT591233.1,  $\beta 1$  intimina (574, 812 e 813); e o segundo por KT591325.1,  $\zeta$  intimina (445 e 447) com KT591333.1,  $\beta 2$  intimina (630). **CONCLUSÃO:** Os dados demonstraram que as aEPEC isoladas dos animais silvestres possuíam características genéticas semelhantes às observadas em humanos, podendo os animais analisados estarem servindo de reservatório para as aEPEC circulantes.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli* Enteropatogênica Atípica (aEPEC); Animais Silvestres; Reservatórios; Diversidade Genética.

### ABSTRACT

**OBJECTIVE:** Identifying wild animals as reservoirs of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC). **MATERIALS AND METHODS:** aEPEC virulence factors (*eae* and *bfp*) were investigated in 263 *E. coli* samples isolated from 260 wild animals captured in three municipalities of Pará State, Brazil (Marabá, Parauapebas and Canaã dos Carajás), from March 2008 to December 2009. The applied research methods were polymerase chain reaction, using specific primers, followed by the *eae* gene sequencing. **RESULTS:** Among the 263 *E. coli* samples evaluated, 3.04% (8/263) as aEPEC were observed, with 2.66% (7/263) in rodents and 0.4% (1/263) in marsupials. In the analyzed samples were observed four intimin variants:  $\beta 1$  (samples 574, 812, and 813),  $\beta 2$  (sample 630),  $\zeta$  (445 and 447 samples), and  $\epsilon$  (samples 611 and 856). After the phylogenetic analysis by the unweighted pair group method with arithmetic mean, the consensus tree was obtained presenting the formation of two groups: the first one composed by KT591282.1, intimin  $\epsilon 1$  (611 and 856) with KT591233.1, intimin  $\beta 1$  (574, 812, and 813); and the second one by KT591325.1, intimin  $\zeta$  (445 and 447) with KT591333.1, intimin  $\beta 2$  (630). **CONCLUSION:** Data showed that aEPEC isolated from wild animals had genetic characteristics similar to those observed in humans, and the animals analyzed may serve as reservoirs for circulating aEPEC.

**Keywords:** Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC); Wild Animals; Reservoirs; Genetical Diversity.

### Correspondência / Correspondence:

Daniela Cristiane da Cruz Rocha

Instituto Evandro Chagas, Seção de Bacteriologia e Micologia, Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas

Rodovia BR-316 km 7, s/n. Bairro: Levilândia – CEP: 67030-000 – Ananindeua, Pará, Brasil – Tel.: +55 (91) 3214-2297 / Fax: +55 (91) 3214-2113

E-mail: danielarochoa@iec.pa.gov.br / danielaufpa@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

Cepas de *Escherichia coli* colonizam o trato gastrointestinal de seres humanos e animais poucas horas após o nascimento e constituem o principal membro anaeróbio facultativo da microbiota intestinal desses organismos<sup>1</sup>. Essa espécie, pertencente à família Enterobacteriaceae, raramente causa doença em seus hospedeiros. Apesar de seu papel como comensal, algumas cepas de *E. coli* são capazes de causar uma grande variedade de doenças, devido à aquisição de fatores de virulência por transferência horizontal<sup>1</sup>. Dentre essas doenças, a diarreia é uma das principais, sendo as *E. coli* diarreio gênicas (ECD) responsáveis por inúmeros surtos de diarreia registrados no mundo<sup>2</sup>.

Atualmente são conhecidos seis patotipos de ECD: *E. coli* enteroinvasora (EIEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteropatogênica (EPEC), subdividida em EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC); *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); e *E. coli* que adere difusamente (DAEC)<sup>1</sup>. Dentre esses patotipos, cepas EPEC destacam-se como um importante agente diarreio gênico presente em países em desenvolvimento<sup>2</sup>.

Recentemente, uma nova classificação foi proposta por Clements et al.<sup>3</sup>, na qual as *E. coli* são divididas em oito patotipos: os seis anteriormente descritos, acrescidos de *E. coli* aderente invasiva (AIEC), associada com a doença de Crohn; e *E. coli* enteroagregativa produtora da toxina Shiga (STEAEC), responsável por um grande surto diarreico em 2011 na Europa.

As EPEC podem ser definidas pela presença do gene *eae*, o qual codifica uma proteína denominada intimina, que é requerida para a adesão à mucosa intestinal, produzindo uma lesão do tipo *attaching and effacing* (A/E). Essa lesão é iniciada pela adesão da bactéria nos enterócitos, levando à perda das microvilosidades intestinais. A intimina é altamente variável entre os diferentes sorotipos de EPEC, e algumas variantes antigênicas distintas têm sido identificadas como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$ , entre outras<sup>4</sup>. As EPEC podem ser classificadas em típicas e atípicas. Linhagens que possuem o plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor*) são chamadas de tEPEC e as que não possuem são chamadas de aEPEC. O gene *bfp* contido no plasmídeo EAF codifica um fator de adesão denominado *bundle-forming pili* (BFP), sendo que o plasmídeo EAF também possui genes necessários para a expressão da intimina<sup>2</sup>.

Cepas aEPEC pertencem a um grupo diarreio gênico que aumentou muito sua frequência no Brasil nos últimos anos. Em algumas regiões do país, essas bactérias parecem ter substituído as tEPEC como principal agente diarreio gênico. Isso indica que, no Brasil, assim como ocorreu em países desenvolvidos, está havendo mudança no perfil epidemiológico das EPEC de típicas para atípicas<sup>3,5</sup>.

Cepas tEPEC raramente são isoladas de animais, sendo o homem seu principal reservatório natural<sup>6</sup>.

Em contraste, cepas aEPEC são isoladas de humanos e animais, com ou sem diarreia, em frequências equivalentes, não permitindo a definição de um reservatório para essas bactérias<sup>7,8</sup>.

Diversos estudos associam animais de estimação, de criação e alguns silvestres como possíveis reservatórios e fonte de infecção de aEPEC para humanos<sup>9</sup>. Apesar disso, nenhum comparou, de forma ampla, amostras isoladas de humanos e animais por técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento, para comprovar tais hipóteses.

Origens clonais comuns entre cepas bacterianas isoladas de animais e humanos podem identificar fontes de infecção e reservatórios animais de diferentes patógenos. Amostras de ECD, para os animais e para o homem, na maioria das vezes, possuem fatores de virulência semelhantes, codificados por genes de origem cromossômica ou plasmidial, cujas similaridades ou diferenças podem explicar aspectos filogenéticos e patogenicidade de certos grupos de *E. coli* para humanos.

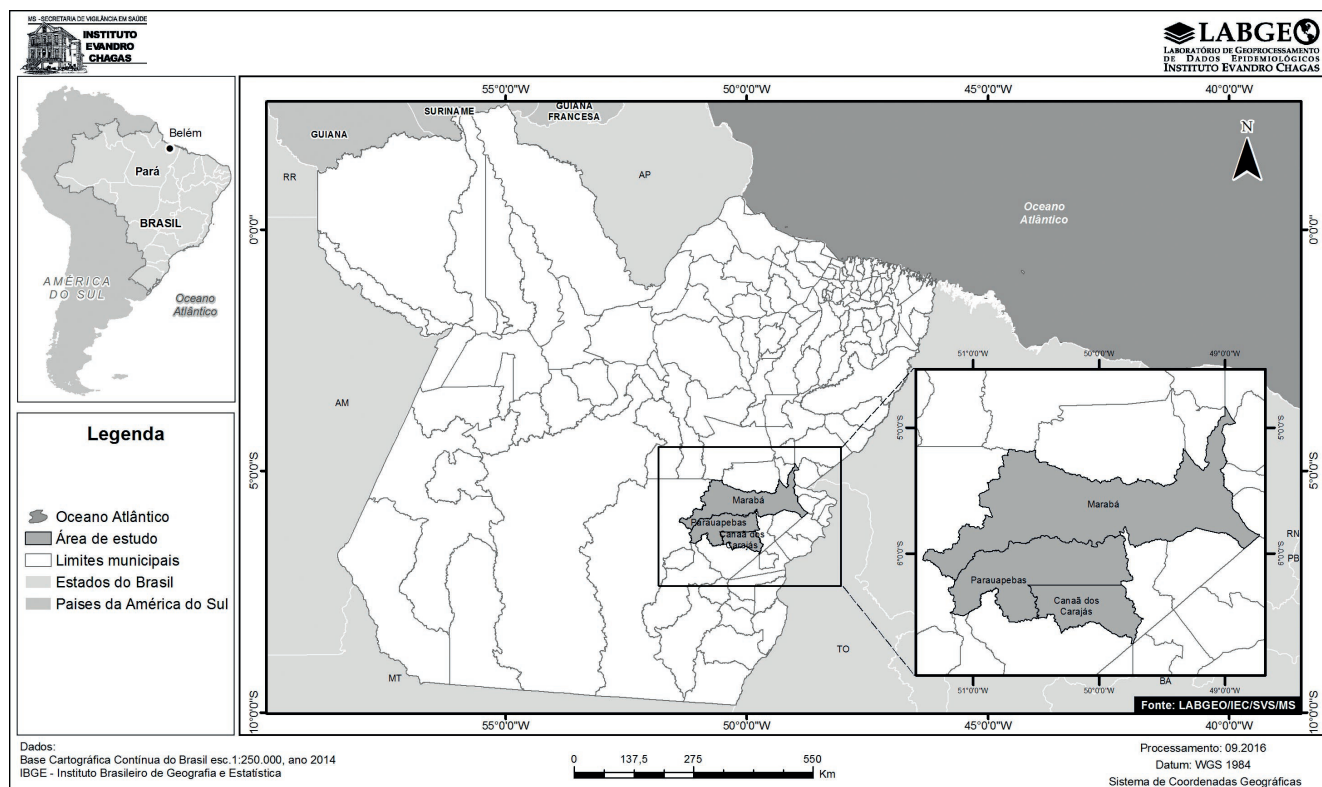
A análise epidemiológica molecular de cepas bacterianas provenientes de diferentes origens é uma avaliação das relações de parentesco existentes entre elas. A principal questão dessas análises é saber se diferentes isolados de um determinado patógeno representam a disseminação de um organismo comum ou clone. Nesse sentido, a epidemiologia tem buscado desenvolver técnicas que proporcionem uma melhor avaliação das relações existentes entre diferentes isolados bacterianos.

O conceito básico das técnicas de tipagem molecular propõe que amostras bacterianas, epidemiologicamente relacionadas, possuem um precursor comum; dessa forma, estudos utilizando essas técnicas permitem uma melhor compreensão sobre os mecanismos evolutivos, sobre o surgimento de cepas virulentas e reservatórios de cepas bacterianas<sup>10</sup>. Diante do exposto, devido aos possíveis riscos acarretados à saúde pública por linhagens de EPEC, são necessários estudos que avaliem a distribuição e frequência dessas cepas nos animais, possibilitando a comparação com cepas de EPEC isoladas de humanos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram obtidas amostras fecais ou porções dos intestinos delgado e grosso, linfáticos e mesentéricos e fragmentos de fígado e baço de 630 animais silvestres (roedores, aves e marsupiais) de ambos os sexos, capturados em três municípios do estado do Pará (Marabá, Parauapebas e Canaã dos Carajás), de março de 2008 a dezembro de 2009 (Figura 1). Os espécimes fecais coletados foram acondicionados em meio de transporte Cary Blair e, juntamente com o pool de órgãos mantidos sob refrigeração, encaminhados diretamente ao Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas do Instituto Evandro Chagas (IEC), onde foram processadas.



**Figura 1** – Localização dos municípios de Parauapebas, Marabá e Canaã dos Carajás, estado do Pará, Brasil

Os experimentos com animais foram aprovados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, processo nº 02018001038/08-11.

#### ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

Para isolamento de *E. coli*, o material fecal em suspensão ou do pool de órgãos foi semeado em meios Ágar MacConkey – MC (Difco, EUA) e incubado à temperatura de 35–37 °C, por 18–24 h. Após esse período, as colônias suspeitas de *E. coli* foram submetidas aos meios de triagem Triple Sugar Iron Agar – TSI (Difco, EUA). A caracterização bioquímica dos isolados bacterianos foi realizada utilizando o kit VITEK® 2 (bioMérieux, Brasil).

#### IDENTIFICAÇÃO DAS CATEGORIAS DE *E. coli* DIARREIOGÊNICAS

Três a cinco isolados de *E. coli* selecionados de cada animal foram mantidos em caldo Luria com glicerol a -70 °C para pesquisa de EPEC, EIEC, STEC, ETEC e EAEC, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) Multiplex<sup>11,12</sup>. Os controles positivos (EPEC E2348/69, EHEC EDL 931, ETEC H10407, EIEC EC 299/07, EAEC 042) e negativo (K12 DH5α) foram cedidos gentilmente pela Dra. Tânia Vaz, do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

#### PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *E. coli*

As cepas foram cultivadas em Ágar Nutriente (Difco, EUA) para serem utilizadas no procedimento de extração de DNA. O material extraído foi armazenado a -20 °C por um tempo máximo de 20 dias para ser utilizado nas reações da PCR Multiplex.

Para essa, foram utilizados iniciadores descritos por Aranda et al.<sup>13</sup> e Toma et al.<sup>14</sup> (Tabela 1). As cepas identificadas como aEPEC tiveram o seu gene *eae* sequenciado, utilizando a plataforma ABI 3130 (Applied Biosystems, EUA) com o kit ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EUA). As sequências produzidas foram editadas no programa Sample Manager, acoplado ao ABI 3130 DNA Sequencer. Para análise das sequências, foi utilizado os programas BioEdit v7.1.3<sup>15</sup>, Mega v5.05<sup>16</sup> e DnaSP v5<sup>17</sup>.

#### EXTRAÇÃO DO DNA E PCR MULTIPLEX

O DNA dos isolados caracterizados fenotipicamente como *E. coli* e das cepas de referência dos controles positivos e negativo foi extraído pelo método de fervura e congelamento, seguindo as recomendações de Starnbach et al.<sup>18</sup> e Baloda et al.<sup>19</sup>.

A PCR foi realizada a partir de 2 µL de cada DNA extraído e 23 µL da solução *mix*, contendo entre 0,5 e 1,5 µL, de acordo com cada iniciador (Invitrogen, Brasil); 10 mM de dNTP *mix* dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Invitrogen, Brasil); 0,5 U de Platinum Taq DNA Polymerase; tampão Taq 1X; 50 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Brasil) e água estéril ultra pura para um volume final de 25 µL. As preparações da PCR Multiplex foram colocadas no termociclador automático de gradiente modelo Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA) e submetidas a ciclos específicos de amplificação que consistiu de um passo de 2 min a 50 °C (*hot-start*), um passo de 5 min a 95 °C (desnaturação inicial), seguido por 40 ciclos de 1 s a 95 °C, 50 °C e 72 °C, e um passo final de extensão de 7 min a 72 °C.

**Tabela 1** – Iniciadores utilizados na PCR Multiplex e seus respectivos produtos de amplificação

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Gene-alvo	Produtos de amplificação (pb)	Referência
eae-1 eae-2	CTGAACGGCGATTACGCGAA CGAGACGATACGATCCAG	<i>eae</i>	917	Aranda et al. <sup>13</sup>
BFP-1 BFP-2	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	<i>bfpA</i>	326	Aranda et al. <sup>13</sup>
aggRks-1 aggRksa-2	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	<i>aggR</i>	254	Toma et al. <sup>14</sup>
LT-f LT-r	GGCGACAGATTATACCGTGC CGGTCTCTATATCCCTGTT	<i>elt</i>	450	Aranda et al. <sup>13</sup>
ST-f ST-r	ATTTTMTTCTGATTTTCTT CACCCGGTACARGCAGGATT	<i>est</i>	190	Aranda et al. <sup>13</sup>
lpaH-1 lpaH-2	GTTCCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	<i>ipaH</i>	600	Aranda et al. <sup>13</sup>
VTcom-u VTcom-d	GAGCGAAATAATTTATATGTG TGATGATGGCAATTCAGTAT	<i>stx1/stx2</i>	518	Toma et al. <sup>14</sup>

Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) em tampão TBE (Tris base 0,89M, ácido bórico 0,45 M, EDTA 1 mM, pH 8,4) e visualizados sob luz UV com auxílio de um transiluminador (Vilber Lourmat, França). Como marcador de tamanho molecular, foi usado o Ladder de 1 Kb *plus* (Invitrogen, Brasil). Posteriormente, o gel foi fotografado por um sistema de fotodocumentação, Bioimaging Systems (UPV, EUA).

#### SEQUENCIAMENTO DO GENE *eae* DA *aEPEC*

Os fragmentos dos genes *eae* obtidos de oito isolados foram purificados com o kit comercial Kit BigDye® X Terminator (Applied Biosystems, EUA) e sequenciados para a confirmação, usando o *primer forward* específico para o gene *eae*. Para o

sequenciamento, foi preparado um *mix* contendo 200–300 ng do DNA suspeito e o *primer* específico na concentração de 1,5 pmol/mL, e, posteriormente, alinhadas e comparadas com as sequências para o gene *eae* *aEPEC*: isoladas de pacientes diarreicos, (KT591325.1 ζ e KT591333.1 β2), isolada de animal (KT591282.1 ε1) e isolada de humano e animal (KT591233.1 β1).

#### RESULTADOS

Das 630 culturas analisadas, fezemos e *pool* de órgãos, foram isoladas *E. coli* em 263 (41,7%) amostras (Tabela 2). Após a PCR, foi observada amplificação para o gene *eae* em 3,04% (8/263), distribuídos em roedores com 2,66% (7/263) e marsupiais com 0,4% (1/263) (Tabela 3; Figura 2).

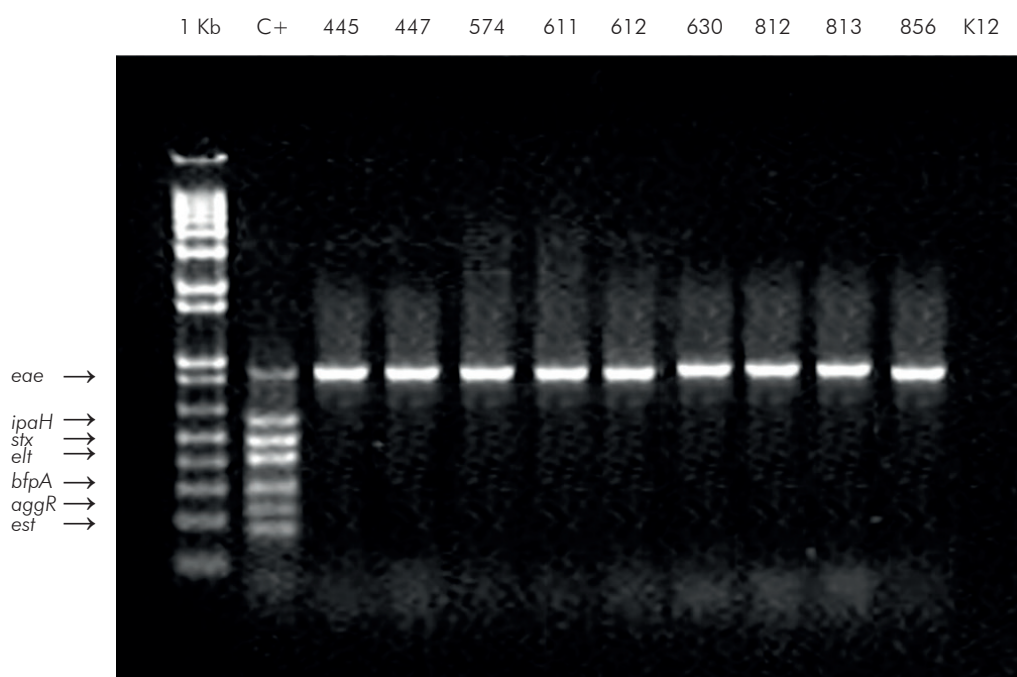
**Tabela 2** – Número de *E. coli* isoladas de animais silvestres capturados em três municípios do estado do Pará (Marabá, Parauapebas e Canaã dos Carajás), Brasil

Classes	<i>E. coli</i>		não DEC*
	Nº de isolados	<i>aEPEC</i>	
Aves	34	–	34
Marsupiais	22	1	21
Quelônios	–	–	–
Roedores	195	7	188
Lagomorfos	–	–	–
Répteis	12	–	12
Total	263	8	255

\* *E. coli* não diarreiogênica; Sinal convencional utilizado: – Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

**Tabela 3** – Cepas aEPEC isoladas de animais silvestres (roedores e marsupiais) capturados em três municípios do estado do Pará (Marabá, Parauapebas e Canaã dos Carajás), Brasil

Registro IEC	Animal	Nome científico	Município
445	Roedor	<i>Proechimys guyannensis</i>	Parauapebas
447	Roedor	<i>Proechimys guyannensis</i>	Parauapebas
574	Marsupial	<i>Monodelphis emiliae</i>	Parauapebas
611	Roedor	<i>Oligoryzomys</i> sp.	Parauapebas
630	Roedor	<i>Oryzomys capito</i>	Canaã dos Carajás
812	Roedor	<i>Oxymycterus</i> sp.	Parauapebas
813	Roedor	<i>Oxymycterus</i> sp.	Parauapebas
856	Roedor	<i>Oxymycterus</i> sp.	Parauapebas

**Figura 2** – PCR Multiplex – 1: Ladder 1 Kb; 2: Controle positivo (cinco categorias de DEC); 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11: aEPEC; e 12: Controle negativo (*E. coli* K12 DH5).

Após PCR e sequenciamento do gene *eae*, as amostras foram alinhadas pelo programa BioEdit v7.1.3<sup>15</sup> com as mutações descritas na tabela 4. Foram observadas taxas de transição/transversão (*R*) igual a 7.47, segundo modelo de Kimura<sup>20</sup> 2-parâmetros. A análise do teste de Tajima's Neutrality demonstrou diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) de 0.014298 para um número de segregações por sítio igual a 24 nos 917pb do gene *eae* das oito amostras analisadas. Após análises das sequências do gene *eae* das aEPEC dos oito isolados de origem animal, foi observada a presença de quatro variantes distintas para a intimina,

que foram  $\beta$ 1 (amostras 574, 812 e 813),  $\beta$ 2 (amostra 630),  $\zeta$  (amostras 445 e 447) e  $\epsilon$  (amostras 611 e 856).

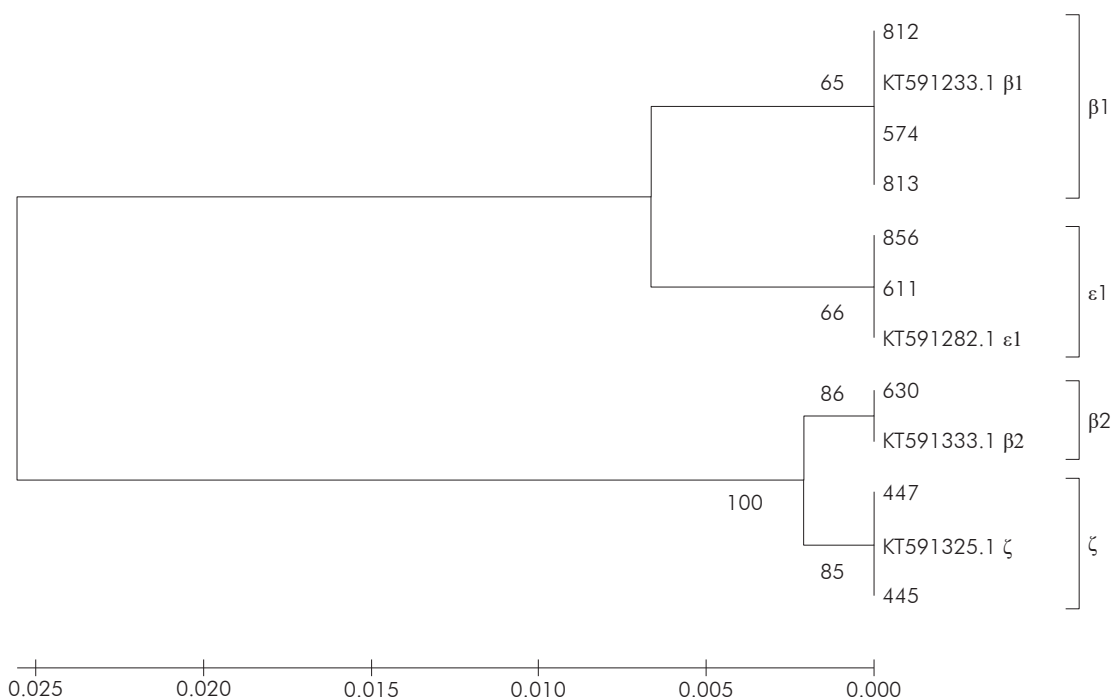
Após análise filogenética pelo método de agrupamento de pares não ponderados com base na média aritmética (*unweighted pair group method with arithmetic mean* – UPGMA), a árvore consenso apresentou a formação de dois grupos, compostos de dois ramos distintos cada, agrupando, no primeiro grupo, KT591282.1,  $\epsilon$ 1 intimina (611 e 856) com KT591233.1,  $\beta$ 1 intimina (574, 812 e 813); e, no segundo grupo, KT591325.1,  $\zeta$  intimina (445 e 447) com KT591333.1,  $\beta$ 2 intimina (630) (Figura 3).



**Tabela 4** – Alinhamento das sequências obtidas com a utilização do BioEdit v7.1.3 com seus respectivos pontos de mutações

Pontos polimórficos	717	741	783	786	810	909	978	987	990	999	1012	1014	1023	1035	1040	1041	1050	1053	1089	1096	1113	1137	1257	1293
KT591325.1_zeta_intimina	A	A	G	T	T	T	A	C	C	T	C	G	C	T	G	G	T	G	T	C	T	T	T	A
EAE_445	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
EAE_447	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KT591333.1_beta2_intimina	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
EAE_630	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KT591282.1_epsilon1_intimina	C	G	T	C	.	C	G	T	T	C	T	A	T	C	A	A	C	A	C	T	C	C	C	G
EAE_611	C	G	T	C	.	C	G	T	T	C	T	A	T	C	A	A	C	A	C	T	C	C	C	G
EAE_856	C	G	T	C	.	C	G	T	T	C	T	A	T	C	A	A	C	A	C	T	C	C	C	G
KT591233.1_beta1_intimina	C	T	T	.	C	C	G	T	T	C	T	A	T	C	A	A	C	A	C	T	C	C	C	G
EAE_574	C	T	T	.	C	C	G	T	T	C	T	A	T	C	A	A	C	A	C	T	C	C	C	.
EAE_812	C	T	T	.	C	C	G	T	T	C	T	A	T	C	A	A	C	A	C	T	C	C	C	G
EAE_813	C	T	T	.	C	C	G	T	T	C	T	A	T	C	A	A	C	A	C	T	C	C	C	G

Os nucleotídeos idênticos são indicados por pontos; KT591325.1, KT591333.1, KT591282.1, KT591233.1: Sequências de referências para as classes de intiminas analisadas.

**Figura 3** – Árvore filogenética do gene *eae* pelo método UPGMA com 2.000 réplicas de *bootstrap*

## DISCUSSÃO

Os marcadores de virulência analisados revelaram que as aEPEC isoladas possuem características genéticas semelhantes àsquelas encontradas em humanos com as sequências do gene *eae* conservadas nas amostras 445, 447 e 630, provenientes de isolados de roedores. Estudos anteriores demonstraram a ocorrência de animais como reservatório de cepas consideradas como potenciais agentes de doenças

que podem ser transmitidas entre seres humanos e animais<sup>21,22,23</sup>.

Estudos com aEPEC têm focado principalmente na comparação entre cepas isoladas de casos diarreicos e de pacientes saudáveis<sup>24,25,26</sup>. Mais recentemente, a identificação da presença de tipos de EPEC potencialmente patogênicos para humanos, isolados de animais, pode indicar que a transmissão desses microrganismos entre animais e seres humanos ocorre e

tem um impacto sobre a saúde pública<sup>6</sup>; porém pouco se tem avaliado acerca da ocorrência desses patógenos em animais silvestres. Dessa forma, o presente estudo buscou a identificação das subclasses de intiminas em animais silvestres e observou a ocorrência das subclasses  $\zeta$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\varepsilon$ , como aquelas que estão neles circulando. Como essas subclasses já foram descritas em seres humanos e animais de criação<sup>6,24,25,26</sup>, os dados podem apontar para uma possível contaminação da fauna silvestre por cepas provenientes da contaminação ambiental ou que esses espécimes estão servindo de reservatórios naturais para esse patógeno.

Dentre os animais estudados, os roedores apresentaram maior frequência de aEPEC, com amostras apresentando sequências altamente conservadas para o gene *eae*, quando comparadas a isolados humanos<sup>6</sup>. Apenas um marsupial foi identificado como portador da aEPEC, porém a sequência isolada apresentou 100% de similaridade com aquelas observadas em roedores. A grande diversidade genômica da *E. coli* lhe confere uma notável plasticidade ecológica; graças a ela, esses microrganismos adaptam-se rapidamente a diferentes ambientes, podendo, dessa forma, passar de organismo de vida livre a comensal do trato intestinal dos animais de sangue quente e, ainda, a patógenos que infectam humanos e animais<sup>6,9,25,27,28,29,30</sup>.

Xu et al.<sup>6</sup>, ao analisarem as subclasses de intiminas em humanos, animais e alimentos, identificaram as intiminas  $\lambda$ ,  $\beta 2$ ,  $\mu$ ,  $\iota 2$ ,  $\xi$ ,  $\zeta$ ,  $\alpha 2$  e  $\pi$  em pacientes diarreicos. A subclasse  $\gamma 1$  foi identificada concomitantemente em pacientes diarreicos e em suínos; a intimina  $\kappa$ , identificada tanto em alimento

(carne crua) como em pacientes diarreicos; e as classes  $\varepsilon 2$ ,  $\eta 2$  e  $\iota 1$ , tanto em pacientes diarreicos como em assintomáticos, demonstrando a grande variabilidade e distribuição das aEPEC entre as amostras analisadas. Anteriormente, Moura et al.<sup>31</sup> descreveram o subtipo  $\beta 1$  como o mais frequente em isolados de animais e humanos; nesse mesmo sentido, Aidar-Ugrinovich et al.<sup>22</sup> já haviam descrito que, no Brasil, o subtipo  $\beta 1$  se apresentava como o mais frequente em EPEC isoladas de bovinos; semelhante ao observado por Cortés et al.<sup>32</sup>, que identificaram o subtipo  $\beta 1$  como o mais prevalente nas cepas isoladas de ovinos, seguido do subtipo  $\gamma 2$ . No presente estudo, os subtipos mais frequentes foram  $\beta 1$  (amostras 574, 812 e 813),  $\beta 2$  (amostra 630),  $\zeta$  (amostras 445 e 447) e  $\varepsilon$  (amostras 611 e 856), presentes em oito aEPEC das 263 *E. coli* identificadas. Porém, como não foram isoladas tEPEC, e 255 amostras foram caracterizadas como não diarreicas, sugere-se que a variabilidade existente pode ser maior, como observado na literatura, reforçando a necessidade de mais estudos que esclareçam a variabilidade genética existente entre as EPEC isoladas de humanos e animais na Região Amazônica.

## CONCLUSÃO

Os dados demonstraram que as aEPEC isoladas dos animais silvestres possuem características genéticas semelhantes e mostraram proximidade com o gene *eae* de aEPEC encontradas em humanos e em animais de criação, possibilitando inferir que os animais avaliados servem como possíveis reservatórios de cepas de origem humana, bem como potenciais transmissores de cepas animais com caráter zoonótico.



## REFERÊNCIAS

- Kapper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb;2(2):123-40.
- Hu J, Torres AG. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? Clin Microbiol Infect. 2015 Aug;21(8):729-34.
- Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. Gut Microbes. 2012 Mar-Apr;3(2):71-87.
- Ooka T, Seto K, Kawano K, Kobayashi H, Etoh Y, Ichihara S. Clinical significance of *Escherichia albertii*. Emerg Infect Dis. 2012 Mar;18(3):488-92.
- Hernandes RT, Elias WP, Vieira MAM, Gomes TAT. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 2009 Aug;297(2):137-49.
- Xu Y, Bai X, Zhao A, Zhang W, Ba P, Liu K, et al. Genetic diversity of intimin gene of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from human, animals and raw meats in China. PLoS One. 2016 Mar;11(3):e0152571.
- Leomil L, Pestana de Castro AF, Krause G, Schmidt H, Beutin L. Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. FEMS Microbiol Lett. 2005 Aug;249(2):335-42.
- Aidar-Ugrinovich L, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Leomil L, Dahbi G, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. Int J Food Microbiol. 2007 Apr;115(3):297-306.
- Ishii S, Meyer KP, Sadowsky MJ. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. Appl Environ Microbiol. 2007 Sep;73(18):5703-10.
- Goering RV. Pulsed-field gel electrophoresis. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang Y-W, Unger E, Relman DA, et al. Molecular microbiology: diagnostic principles and practice. Washington: ASM Press; 2004. p. 185-96.

- 11 Aranda KRS, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. FEMS Microbiol Lett. 2007 Jan;267(2):145-50.
- 12 Sousa EB. Aspectos microbiológicos e epidemiológicos da doença diarreica aguda no município de Juruti, Pará [dissertação]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas; 2010.
- 13 Aranda KRS, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. J Clin Microbiol. 2004 Dec;42(12):5849-53.
- 14 Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, et al. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2003 Jun;41(6):2669-71.
- 15 Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Sym Ser. 1999;41:95-8.
- 16 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. Mega5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 2011 Oct;28(10):2731-9.
- 17 Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 2009 Apr;25(11):1451-2.
- 18 Starnbach MN, Falkow S, Tompkins LS. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. J Clin Microbiol. 1989 Jun;27(6):1257-61.
- 19 Baloda SB, Krovacek K, Eriksson L, Linné T, Månsson I. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas* strains isolated from drinking water, fish, and foods by polymerase chain reaction. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1995 Jan;18(1):17-26.
- 20 Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol. 1980 Dec;16(2):111-20.
- 21 Rodrigues J, Thomazini CM, Morelli A, Batista GCM. Reduced etiological role for enteropathogenic *Escherichia coli* in cases of diarrhea in Brazilian infants. J Clin Microbiol. 2004 Jan;42(1):398-400.
- 22 Aidar-Ugrinovich L, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Leomil L, Dahbi G, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. Int J Food Microbiol. 2007 Apr;115(3):297-306.
- 23 Carvalho VM, Irino K, Onuma D, Pestana de Castro AF. Random amplification of polymorphic DNA reveals clonal relationships among enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from non-human primates and humans. Braz J Med Biol Res. 2007 Feb;40(2):237-41.
- 24 Afset JE, Anderssen E, Bruant G, Harel J, Wieler L, Bergh K. Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. J Clin Microbiol. 2008 Jul;46(7):2280-90.
- 25 Contreras CA, Ochoa TJ, Lacher DW, DebRoy C, Navarro A, Talledo M, et al. Allelic variability of critical virulence genes (*eae*, *bfpA* and *perA*) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children. J Med Microbiol. 2010 Jan;59(Pt 1):25-31.
- 26 Ramachandran V, Brett K, Hornitzky MA, Dowton M, Bettelheim KA, Walker MJ, et al. Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. J Clin Microbiol. 2003 Nov;41(11):5022-32.
- 27 Carvalho VM, Gyles CL, Ziebell K, Ribeiro MA, Catão-Dias JL, Sinhorini IL, et al. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. J Clin Microbiol. 2003 Mar;41(3):1225-34.
- 28 Nakazato G, Gyles C, Ziebell K, Keller R, Trabulsi LR, Gomes TAT, et al. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). Vet Microbiol. 2004 Aug;101(4):269-77.
- 29 Krause G, Zimmermann S, Beutin L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. Vet Microbiol. 2005 Mar;106(1-2):87-95.
- 30 Pitondo-Silva A, Nakazato G, Falcão JP, Irino K, Martinez R, Darini AL, et al. Phenotypic and genetic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal children in the Ribeirão Preto metropolitan area, São Paulo State, Brazil. APMIS. 2015 Feb;123(2):128-35.
- 31 Moura RA, Sircili MP, Leomil L, Matté MH, Trabulsi LR, Elias WP, et al. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. Appl Environ Microbiol. 2009 Dec;75(23):7399-408.
- 32 Cortés C, De la Fuente R, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Dhahi G, et al. Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. Vet Microbiol. 2005 Sep;110(1-2):67-76.

Recebido em / Received: 29/4/2016

Aceito em / Accepted: 7/10/2016