

CARACTERÍSTICAS DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* PROVENIENTES DE AVES SILVESTRES QUANTO A GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.

CHARACTERISTICS OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES FROM WILD FOWL ACCORDING TO VIRULENCE GENES AND ANTIBIOTIC RESISTANCE.

IKUNO, A.A.¹; GAMA, N.M.S.Q.²; GUASTALLI; E.A.L.² GUIMARÃES, M.B.³; & FERREIRA, V.C.A.¹

¹Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. e-mail: ikuno@biologico.sp.gov.br

²Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola-Unidade de Pesquisa de Bastos

³Ambulatório de aves-FMVZ-USP.

RESUMO

A mobilidade e a migração das aves são importante fenômeno biológico e um fator potencialmente crucial de epizootia. Espécies de aves sedentárias podem se mover longas distâncias e espécies de aves nômades podem transportar patógenos durante os seus movimentos erráticos. A flora normal do intestino de aves silvestres ou urbanas não é bem documentada, particularmente passeriformes. A identificação de genes de virulência associados em *E. coli* não patogênica comensal e do ambiente pode ser usada como indicador de risco potencial que tais novos reservatórios de linhagens patogênicas representam para humanos e animais e para identificar surtos de *E. coli* patogênica.

Isolados de *E. coli* provenientes de aves silvestres foram analisados quanto à presença de genes de virulência por PCR. Os resultados mostraram a presença de 7 genes de virulência em *E. coli* isoladas de aves silvestres. A maioria dos isolados (61,4%) foram positivos para o gene *irp2* associado com os genes de virulência *iucD* (24,6%), *iss* (24,7%), *cvi/cva*, *vat*, *tsh* (19,3%). Em comparação a isolados de *E. coli* de aves poedeiras uma baixa porcentagem de amostras possuía o gene *astA* (1,7%). O gene para hemaglutinina sensível à temperatura (*tsh*), freqüentemente observado em isolados virulentos e raramente em comensal, foi detectado em 28%. Todos os isolados foram resistentes a lincomicina freqüentemente associada à resistência à estreptomicina (63%). Foram observados isolados com resistência múltipla a pelo menos 3 antibióticos.

PALAVRAS-CHAVE: aves silvestres, *Escherichia coli*, genes de virulência, resistência a antibióticos, PCR multiplex.

ABSTRACT

Avian mobility and migration are important biological phenomena and potentially crucial epizootiologic factors. Sedentary avian species can move long distances and nomadic bird species can transport pathogens to different sites during erratic movements. The normal intestinal flora of wild birds or urban birds is not well documented particularly passerines. The identification of virulence genes associated in commensal non-pathogenic *E. coli* and from the environment may be used as an indicator of the potential

risk that such new pathogenic strain reservoirs represent for humans and animals, and for identifying pathogenic *E. coli* outbreaks.

E. coli isolates from wild fowl were examined for virulence genes by PCR. These results demonstrate the presence of 7 virulence genes in *E. coli* isolated from wild fowl. The majority of isolates (61.4%) were positive for *irp2* gene associated with *iucD* (24.6%), *iss* (24.7%), *cvi/cva*, *vat*, *tsh* (19.3%) virulence genes. In comparison to *E. coli* isolates from laying hens a lower percentage of samples possessed *astA* gene (1.7%). Temperature sensitive hemagglutinin gene (*tsh*) frequently observed in virulent isolates and rarely in comensal was detected in 28% of studied samples. All isolates were resistant to lincosamin frequently associated with streptomycin (63%). Multiple resistance isolates to at least 3 antibiotic agents was observed.

KEY-WORDS: wild fowl, *Escherichia coli*, virulence genes, antibiotic resistance, multiplex PCR.

INTRODUÇÃO

Amostras de *E. coli* provenientes de animais e de humanos apesar de apresentarem uma grande diversidade de patótipos tem muitos genes comuns, o que sugere a possibilidade de trocas genéticas entre elas e conseqüentemente a probabilidade do surgimento de um patógeno emergente (KUHNER et al., 2000). A virulência bacteriana é um fenômeno multifatorial e alterações na resistência ou a aquisição de fatores de virulência associados na *E. coli* comensal podem servir como um “sistema de alerta” para o aparecimento de resistência e virulência em bactérias potencialmente patogênicas.

Patógenos emergentes além de representarem um problema para a saúde humana se constituem em uma ameaça para os animais domésticos e para a conservação da biodiversidade global. As aves silvestres têm importância para a saúde pública tanto por portarem patógenos zoonóticos emergentes, como por dispersarem artrópodes vetores infectados. A migração desses animais se constitui em um mecanismo para estabelecimento de novos focos endêmicos de doenças a grandes distâncias dos locais aonde a infecção foi adquirida.

No processo de urbanização a preocupação com o ambiente e a qualidade de vida tem levado a sociedade a privilegiar nas cidades a existência de áreas verdes e mesmo resgatar a vegetação de áreas deterioradas. Essa escolha tem atraído e aumentado a população de pássaros, estreitando a interface entre o habitat desses animais e o homem. Como conseqüência, surge a preocupação da contaminação ambiental e disseminação de patógenos potencialmente zoonóticos.

A caracterização da *E. coli* quanto ao padrão de resistência a antibióticos e a identificação do padrão de virulência são informações fundamentais para a caracterização de isolados clínicos, tanto de aves, como da água e do ambiente, e possibilitam discriminar o potencial patogênico dessas bactérias e a identificação de clones patogênicos emergentes. Isolados de *E. coli* provenientes de aves de postura, de água de dessedentação e do ambiente de granjas, sugerem que em nosso meio está havendo uma ampliação do perfil de resistência a antibióticos nessa bactéria, associada à presença de alguns fatores de virulência (GAMA, et al., 2004). Por essa razão, existe a necessidade de geração de conhecimento quanto à relação desses isolados com amostras não patogênicas, quanto a sua presença no ambiente, em reservatórios naturais e a ocorrência de genes de virulência.

Neste estudo foi avaliada a resistência a antibióticos e a presença de genes de virulência em isolados de *E. coli* de aves silvestres e feita uma correlação com o padrão de

associação desses marcadores e o observado em aves poedeiras.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram analisados 57 isolados de *E. coli*, provenientes de aves silvestres que ocorrem na cidade de São Paulo, em sua maioria passeriformes (*Amazonas rhodocorita*, *Saltator similis*, *Rhamphastos tucanos*, entre outros), sem sintomas clínicos de colibacilose. Essas amostras foram coletadas por *swabs* do trato respiratório nos períodos de agosto e setembro de 2006. As amostras foram inoculadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion/DIFCO) e incubadas a 37°C por 24 h. As colônias de *E. coli* crescidas em ágar LB foram confirmadas pela série bioquímica.

Foram usadas como amostras de referência: *E. coli* O28 IAL 197, O111 IAL 286 e O157 H:7 IAL 1848.

PCR multiplex

A reação de PCR multiplex foi realizada, com algumas modificações, conforme descrito por EWERS et al., 2005. A extração do DNA de *E. coli* das amostras foi feita pelo método da fervura por 10 min e após centrifugação, uma alíquota de 2 µL do sobrenadante foi usada para amplificação.

As amostras analisadas foram verificadas quanto à presença dos genes *astA*, *iss*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *vat*, *cvi-cva* cujas seqüências foram descritas por EWERS et al. (2005). A reação de PCR multiplex foi feita empregando os seguintes parâmetros: 2 µL de cada amostra de DNA extraído de amostras de *E. coli* crescidos em ágar LB por 12 horas, adicionado a uma mistura de reação (25 µL) contendo 0,1 µL de cada par de *primer* (10 pmol), 1 µL de cada dNTP (200 µM); 2,5 µL de tampão de PCR (10x), 2 µL de 50 mM de MgCl₂ e 2,5 U de *Taq* polimerase. As amplificações foram feitas em termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) nas seguintes condições: t₁, 3 min a 94°C; t₂, 30 seg a 94°C, t₃, 30 seg a 58°C; t₄, 3 min a 68°C; (30 ciclos repetidos) e t₅ 10 min a 72°C. A análise dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese (60 V/2 h) em gel de agarose a 1,5%, em tampão TAE (Tris-acetato 20 mM, EDTA 0,05 mM, pH 8,0) e evidenciada com brometo de etídio (1 µg/mL). A imagem do gel sob luz UV foi registrada em fotodocumentador Alpha Imager 1220 (Alpha Innotech Corp.) acoplado a um computador.

Sensibilidade a antimicrobianos

Os isolados (27) foram testados quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos lincomicina (15µg), eritromicina (15 µg), estreptomicina (10 µg), e fosfomicina (50 µg) pelo método em disco (BAUER et al., 1966). A interpretação foi feita através da medição dos halos de inibição, segundo orientação do fabricante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados 57 isolados de *E. coli* de aves silvestres quarentenadas que ocorrem na cidade de São Paulo, quanto à presença e a possível associação de 08 genes de virulência, *astA*, *iss*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *vat*, *cvi-cva*. Os resultados apresentados na Tabela 1 estão apresentados com dados já observados em aves de interesse comercial (IKUNO et al., 2006) e mostram que em isolados de *E. coli* de aves silvestres o gene *papC*, que está relacionado com a adesão da bactéria e que codifica para a fímbria, não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas.

O gene *irp2*, que codifica para o sistema de aquisição de ferro pela bactéria, teve larga distribuição entre os isolados estudados, ocorrendo em 61,4% das amostras. Ele apareceu acentuadamente associado ao gene *iucD* (24,6%), que codifica para uma aerobactina, ao gene *iss* (24,7%), ao gene *cvi/cva*, que codifica o plasmídio da colicina V, ao gene *vat*, que codifica uma toxina de vacuolização e ao gene *tsh* que codifica para uma hemaglutinina sensível à temperatura (19,3%). O gene *astA*, que codifica uma enterotoxina estável ao calor, encontrada nas bactérias diarreogênicas foi observado em 1,7% das amostras analisadas, o que contrasta com amostras provenientes de aves comerciais, nas quais ele tem um percentual de ocorrência de 20%. O gene *papC*, relacionado à adesão e que codifica para a fímbria, não foi detectado em nenhuma das amostras estudadas. O gene *tsh*, cujo produto tem importante papel nos primeiros estágios da infecção, pode desempenhar a função de adesão nesses isolados aonde apareceu com percentual de 28%, e é frequentemente encontrado em isolados virulentos e raro em comensais (DELICATO et al., 2002).

O gene *iss*, que codifica uma proteína que garante a sobrevivência no soro é um marcador para a presença de uma unidade de patogenicidade em amostras virulentas (VANDEKRCHOE et al., 2005) teve uma distribuição mais restrita em aves silvestres (24,6%), quando comparado com o observado em aves comerciais (50%). O gene *iucD*, que codifica uma aerobactina, teve uma baixa frequência em aves silvestres (1,7%), porém, ocorre com elevada frequência em aves comerciais em associação com o gene *iss*. Ambos estão relacionados com *E. coli* patogênica em diferentes espécies (NEGLEKA et al., 2002).

Tabela 1. Percentual de ocorrência de genes de virulência nas amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves silvestres e de aves de interesse comercial.

Aves	Genes							
	<i>cvi-cva</i> %	<i>vat</i> %	<i>tsh</i> %	<i>iucD</i> %	<i>papC</i> %	<i>irp2</i> %	<i>iss</i> %	<i>astA</i> %
silvestres	29,8	33,3	28,0	1,7	0	61,4	24,6	1,7
poedeiras*	16,6	10	10	26,6	0	13,3	50	20

* IKUNO et al., 2006

Tabela 2. Percentual de associação de genes de virulência nas amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves silvestres.

<i>cvi/cva</i>	<i>vat</i>	<i>tsh</i>	<i>iucD</i>	<i>papC</i>	<i>irp2</i>	<i>iss</i>	<i>astA</i>
----------------	------------	------------	-------------	-------------	-------------	------------	-------------

Genes								
<i>cvi-cva</i>	---	19,3%	7,0%	1,7%	0%	19,3%	7,0%	0%
		---	5,3%	0%	0%	19,3%	17,6%	0%
<i>vat</i>			---	0%	0%	19,3%	7,0%	0%
<i>tsh</i>				---	0%	24,6%	1,7%	0%
<i>iucD</i>					---	0%	0%	0%
<i>papC</i>						---	24,7%	1,7%
<i>irp2</i>							---	0%
<i>iss</i>								---
<i>astA</i>								

Os resultados obtidos da análise dos isolados de *E. coli* de aves silvestres quanto à sensibilidade ou resistência a antimicrobianos estão resumidos na Tabela 3. Todas as amostras analisadas apresentaram em sua totalidade resistência a lincomicina e em 63% delas esse fenótipo ocorreu associado à resistência a estreptomicina e em um percentual menor à eritromicina (37%). Observou-se também um percentual de 22,2% na associação da resistência a 3 antimicrobianos (lincomicina + estreptomicina + eritromicina ou + fosfomicina) e somente 1% dessas amostras apresentou resistência aos quatro antibióticos.

Tabela 3. Perfil de resistência a antimicrobianos em amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves silvestres

Antimicrobiano	% de amostras
MY	100
MY + S	63
MY + E	37
MY + S + E	22,2
MY + S + FOS	22,2
MY + S + E + FOS	1

MY = Lincomicina, S = Estreptomicina, E = Eritromicina, FOS = Fosfomicina.

CONCLUSÕES

Isolados de *E. coli* provenientes de aves silvestres mostraram que o gene de virulência *irp2*, que codifica para o sistema de aquisição de ferro pela bactéria, ocorreu em 61,4% em associação a outros genes de virulência como o gene *iucD*, *iss*, *cvi/cva*, *vat*, *tsh*.

O gene *astA*, que codifica uma enterotoxina estável ao calor, encontrada nas bactérias diarreogênicas foi observado em 1,7% das amostras analisadas, o que contrasta com amostras provenientes de aves comerciais, nas quais ele tem um percentual de ocorrência de 20%.

Todos os isolados apresentaram resistência ao antimicrobiano lincomicina fortemente associado à resistência à estreptomicina.

Um percentual significativo de associação à resistência a três antibióticos foi encontrado em grande número de amostras.

REFERÊNCIAS

- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TUCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk methods. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:494-496, 1966.
- DELICATO, E.R.; BRITO, B.G.; KONOPATZKI, A.P.; GAZIRI, L.C. & VIDOTTO, M.C. Occurrence of the temperature-sensitive hemagglutinin among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 46:713 – 76, 2002.
- EWERS, C.; JANSEN, T.; KIESSLING, S.; PHILIP, H.C. & WIELER, L.H. Rapid detection of virulence associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 49: 269-273, 2005.
- GAMA, N. M. S. Q.; GUASTALLI, E. A. L. & PAULILLO, A.C. Isolamento de *Escherichia coli* de amostras de água de dessedentação de galinhas poedeiras. *Arq. Inst. Biol.* 71(supl.): 245, 2004.
- IKUNO, A.A.; GUASTALLI, M.R.; BUIM, GAMA, N.M.S.Q.; FRANÇA, S.B.; ALONSO, A.C.; FUJIKURA, L.M. & FERREIRA, V.C.A. Genes de virulência associados em *Escherichia coli* (APEC) isoladas de aves de postura, do meio ambiente e de água de dessedentação de granjas comerciais. 19ª Reunião Anual do Instituto Biológico/APTA/SAA/SP, novembro 2006.
- KUHNERT, P.; BOERLIN, P. & FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiol. Reviews* 24: 107-117, 2000.
- NEGLEKA M., BRERETON L., BROWN G. & FAIRBROTHER J.M. pathotypes of *Escherichia coli* as related to *tsh*-, *pap*-, *pil*-, and *iuc*-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian Dis.* 46 (1): 143-152, 2002.
- VANDEKRCHOE, D.; VANDEMAELE, F.; ADRIAENSEN, C.; ZALESKA, M.; HERNALSTEENS, J.P.; DE BAETS, L.; BUTAYE, P.; VAN IMMERSEEL, F.; WATTIAU, P. LAEVENS, H.; MAST, J.; GODDEERIS, B. & PASMANS F. Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: Comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. *Vet. Microbiol.* 108: 75-87, 2005.