

**Aline Luísa de Oliveira, Nicolle Barbieri, Benito Brito e Fabiana Horn**

Departamento de Biofísica – Instituto de Biociências – UFRGS

(alineluisa.oliveira@gmail.com)

## Introdução

*Escherichia coli* patogênicas aviárias (APEC) são a causa de doenças extra-intestinais, que podem se manifestar na forma de infecções localizadas ou sistêmicas, em aves domésticas e selvagens. Um pavão de uma propriedade particular apresentou inapetência e diarreia seguidas de óbito. A necropsia da ave detectou fígado friável (de fácil fragmentação), congesto e marrom, rim hipertrofiado, peritonite e aerossaculite leves, entre outros sinais característicos de infecção sistêmica causada por APEC. O objetivo deste trabalho foi analisar os isolados obtidos do fígado, coração, medula óssea, intestino, rim e pulmão desta ave a fim de verificar se representavam ou não a mesma cepa bacteriana.

## Resistência a Agentes Antimicrobianos

Alguns agentes antimicrobianos são utilizados na avicultura para prevenir infecções e promover o crescimento. Os isolados foram analisados quanto à resistência/suscetibilidade a 15 agentes antimicrobianos, através do método de disco-difusão. Todos os isolados apresentaram resistência a bacitracina, tetraciclina e trimetoprim. Os isolados apresentaram resistência a sulfa-trimetoprim, à exceção dos de pulmão e coração; e a sulfonamidas, à exceção do de intestino (Tabela 1).

Tabela 1. Análise da resistência/suscetibilidade dos isolados a 15 agentes antimicrobianos, através do método de disco-difusão.

Cepa	Código	Resistência Antimicrobianos											sulfa	trimetoprim	sulfa+tri	tetraciclina	
		ampicilina	bacitracina	cefalotina	ceftiofur	ciprofloxacino	cloranfenicol	enrofloxacino	gentamicina	neomicina	nitrofurantoína	norfloxacino					
pulmão	PV1	sensível	resistente	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	resistente	resistente	sensível	resistente
rim	PV2	sensível	resistente	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	resistente	resistente	resistente	resistente
coração	PV3	sensível	resistente	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	resistente	resistente	sensível	resistente
intestino	PV4	sensível	resistente	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	resistente	resistente	resistente
fígado	PV5	sensível	resistente	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	resistente	resistente	resistente	resistente
fêmur	PV6	sensível	resistente	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	sensível	resistente	resistente	resistente	resistente

## Tipagem Filogenética

A tipagem filogenética foi realizada através do método EcoR, que separa os isolados nos grupos A (comensais de humanos e outros animais), B1 (patogênicos de animais), B2 e D (causadores de infecções extra-intestinais) (Figura 1). Os isolados testados são todos pertencentes ao grupo B1 (Figura 2).

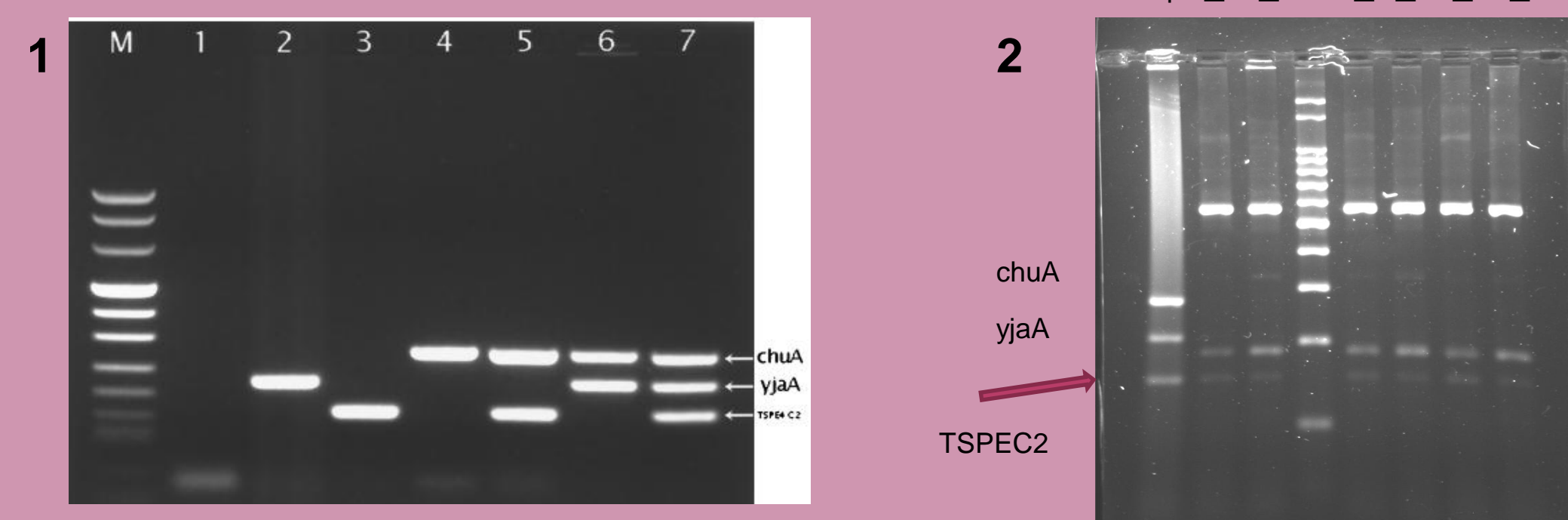


Figura 1. Gel de eletroforese mostrando o padrão de bandas determinado pelo método EcoR. Grupos: A-linhas 1 e 2; B1-linha 3; D-linhas 4 e 5; B2-linhas 6 e 7.

Figura 2. Gel de eletroforese mostrando o padrão de bandas dos isolados testados, indicando que todos pertencem ao grupo B1.

\* Todas as reações de PCR foram realizadas em 20 µl contendo 2 µl 10x tampão PCR, 1,2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U Taq DNA polimerase (CENBIOT), 0,5 µl 10 mM de cada dNTP, 0,1 µl (100 pmol) de cada par de oligonucleotídeo iniciador e 3 µl (40 ng) DNA da amostra. As reações foram submetidas nas seguintes condições em um termociclador: 4 min a 94° C, 30 ciclos de 5 s a 94° C e 10 s a 59° C com um ciclo final de 5 min a 72° C, e posteriormente mantidos a 4° C até o processamento da amostra.

## Análise Filogenética

A análise do perfil filogenético foi realizada através do método ARDRA (Análise de Restrição de DNA Ribossômico Amplificado), baseado na variação do espaçamento intergênico na região 16S-23S do DNA ribossômico. Todos os isolados testados apresentaram o mesmo padrão de restrição (Figura 3).

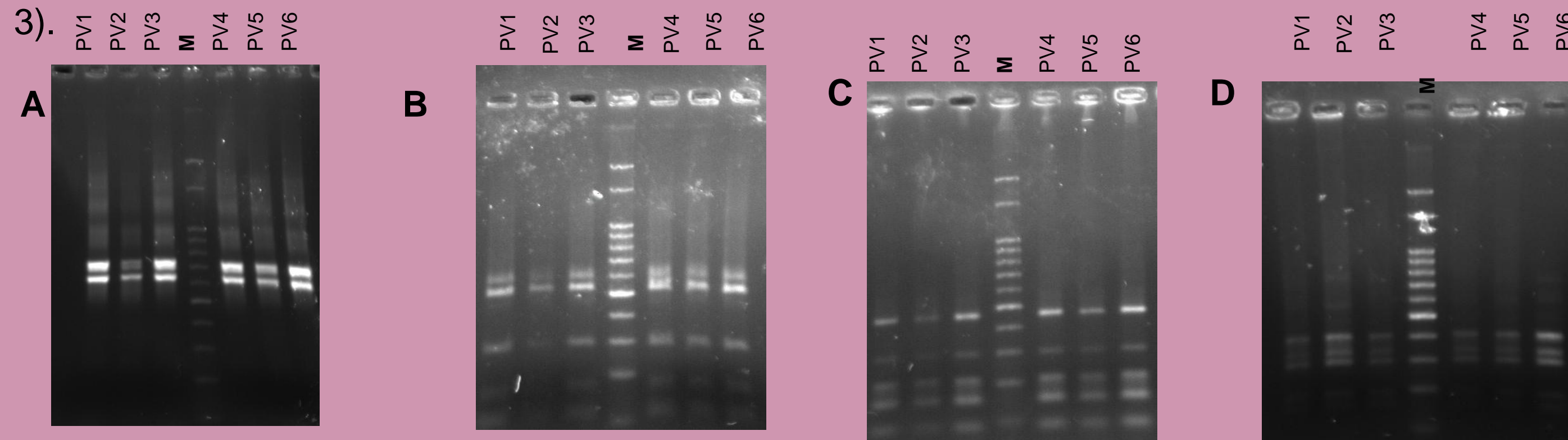


Figura 3. Análise filogenética através do método ARDRA: A. Amplificação da região 16S-23S do DNA ribossômico; B. Digestão do resultado da amplificação com as enzimas de restrição *rsal*; C. Digestão do resultado da amplificação com as enzimas de restrição *hinfl* e D. Digestão do resultado da amplificação com as enzimas de restrição *taqI*.

\* Todas as reações de PCR foram realizadas em 50 µl contendo 5 µl 10x tampão PCR, 1,5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 U Taq DNA polimerase (CENBIOT), 1 µl 10 mM de cada dNTP, 0,6 µl (600 pmol) de cada par de oligonucleotídeo iniciador (16S14F e 23S1r) e 4 µl (40 ng) DNA da amostra. As reações foram submetidas nas seguintes condições em um termociclador: 35 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 55° C, e 2 min a 72° C, com um ciclo final de 5 min a 72° C, e posteriormente mantidos a 4° C até o processamento da amostra. Oito µl do produto da PCR foram digeridos com 5 U das enzimas de restrição *RsaI*, *HinfI* ou *TaqI* e 5 µl do tampão correspondente. A reação foi incubada na temperatura de 37° C (*RsaI* ou *HinfI*) ou 65° C (*TaqI*) por 6 h e mantidas 4° C para posterior processamento da amostra.

## Fatores Associados à Virulência (VAGs)

Os fatores de virulência mais frequentemente associados à patogenicidade de APEC são as fímbrias de aderência F1 e Tsh, o sistema sideróforo aerobactina, a proteína iss, a cápsula K e a produção de colicina V. Foi realizada a genotipagem dos seis isolados quanto a 33 fatores associados à virulência, através de PCR Multiplex. Todos os isolados apresentaram os mesmos fatores de virulência (Tabela 2).

Tabela 2. Prevalência de fatores associados à virulência em isolados APEC\*

Cepa	Código	Multiplex I								Multiplex II						Multiplex III					Multiplex IV				Multiplex V										
		<i>sfa/foc</i>	<i>malX</i>	<i>neuC</i>	<i>iha</i>	<i>hriA</i>	<i>fimC</i>	<i>pic</i>	<i>kpsM</i>	<i>sit ep</i>	<i>ompA</i>	<i>iroN</i>	<i>gimB</i>	<i>sit chr</i>	<i>traT</i>	<i>ibeA</i>	<i>chuA</i>	<i>vat</i>	<i>tsh</i>	<i>iucD</i>	<i>coIV</i>	<i>papC</i>	<i>irp2</i>	<i>iss</i>	<i>astA</i>	<i>mat</i>	<i>fyuA</i>	<i>tia</i>	<i>ireA</i>	<i>criA</i>	<i>sat</i>	<i>Cnf1/2</i>	<i>hlyA</i>	<i>afa/dra</i>	
pulmão	PV1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
rim	PV2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
coração	PV3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
intestino	PV4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
fígado	PV5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
fêmur	PV6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

\* Todas as reações de PCR foram realizadas em 25 µl contendo 2,5 µl 10x tampão PCR, 2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 U Taq DNA polimerase (CENBIOT), 0,5 µl 10 mM de cada dNTP, 0,1 µl (100 pmol) de cada par de oligonucleotídeo iniciador e 4 µl (40 ng) DNA da amostra. As reações foram submetidas nas seguintes condições em um termociclador: 3 min a 94° C, 25 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 58° C, e 3 min a 68° C, com um ciclo final de 10 min a 72° C, e posteriormente mantidos a 4° C até o processamento da amostra.

## Conclusões

A análise através do método ARDRA mostra que os isolados apresentam o mesmo padrão de bandas resultante da amplificação da região 16S-23S do DNA ribossômico. Os isolados também pertencem ao mesmo grupo, de acordo com a classificação pelo método EcoR, e apresentam os mesmos fatores de virulência. Tais resultados indicam que os isolados representam a mesma cepa bacteriana. No entanto, alguns isolados apresentaram diferentes perfis de resistência a antimicrobianos. Isso pode ocorrer pela aquisição de pequenos plasmídeos que conferem resistência a antimicrobianos e são facilmente transferidos.