



Figura 3 – A abertura da pele ao exame necropsíco do cão – edema e necrose de musculatura de região torácica (A), cervical ventral (B e C), mandibular (B e C) e membro torácico direito (C).

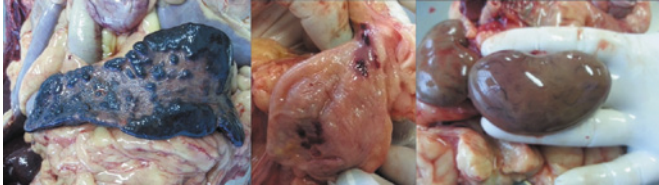


Figura 4 – Ao exame necropsíco do cão: A – baço retraído de coloração rósea com áreas enegrecidas em alto relevo; B – bexiga com manchas de coloração arroxeada em alto relevo; C – rins de coloração acastanhada com vasos bastante evidentes.

No exame histopatológico foi observado congestão e difusa hemorragia pulmonar. Em fígado foram notadas, severa congestão hepática e degeneração microvacuolar. Também foram observadas acentuadas lesões hemorrágicas difusas em região subepitelial de bexiga, com dilatação de capilares e processo inflamatório discreto. Hiperplasia linfóide em estômago (gastrite folicular) e intestino, hiperplasia reativa neutrofílica esplênica, hemorragia perivascular renal; e ainda paniculite foram detectadas. Em pele/tecido subcutâneo chamava atenção a marcante hemorragia principalmente em região de panículo e entre fibras musculares esqueléticas. **Discussão:** As bactérias do gênero *Acinetobacter* ganharam visibilidade nos últimos anos, especialmente em função do número de surtos em humanos causados por estirpes multirresistentes as drogas, que, em boa parte culminam em óbito dos pacientes, devido à rápida progressão de infecções sistêmicas [2]. Utilizando uma miríade de fatores de virulência esse patógeno oportunista consegue contornar a ação dos antibióticos. Em meio a esses fatores estão o acúmulo de múltiplas mutações e a obtenção de genes de resistência por transferência de plasmídeos, transposons e integrons. Outros mecanismos que causam danos ao hospedeiro são a produção e secreção de enzimas e produtos tóxicos, e a apoptose de células epiteliais decorrente da adesão dessas bactérias, quando estes eventos ocorrem no endotélio, causam hemorragia [2]. Dentre os fatores que predispõe o indivíduo a ser infectado por essa bactéria estão: o uso de corticosteróides, cateteres, ventilação mecânica, o constante uso de antibióticos e a longa estadia em hospitais [2]. Acomete principalmente o sistema respiratório, em pneumonias associadas a ventilação mecânica; trato urinário, devido ao uso de cateteres urinários; e tecido cutâneo, conseqüente a lesões na pele. Porém, também há casos de meningite em indivíduos que foram submetidos a cirurgias no sistema nervoso [2].

De acordo com os fatores de virulência e patogenia da *Acinetobacter* sp. nota-se que os sinais clínicos do animal atendido correspondem com as características citadas [2]. A arranhadura causada pelo felino foi o provável meio de entrada do patógeno, que provocou a infecção porque o animal estava imunocomprometido. As lesões endoteliais determinadas pelo agente são compatíveis com os achados clínicos e histopatológicos do caso citado. Essas lesões causaram uma severa hemorragia tipicamente perivascular devido à lesão endotelial e subsequente necrose justificando a hipotensão arresponsova as drogas. O quadro agudo e a piora progressiva são similares a relatos de infecções hospitalares em humanos no qual a bactéria é pouco responsiva a terapia antimicrobiana e tende a desencadear um processo séptico grave, na maior parte das vezes fatal [3]. **Conclusão:** A partir desse caso, nota-se que as infecções causadas pela *Acinetobacter* sp. são uma crescente preocupação em animais imunocomprometidos, porém, a falta de conhecimento de muitos

veterinários sobre este patógeno é um fator agravante. A escassez de relatos de casos mantém os veterinários alheios à doença, o que favorece a disseminação da bactéria e inviabiliza um diagnóstico rápido, que é fundamental para um melhor prognóstico.

Referências Bibliográficas

1. Boerlin, P.; S. Eugster, S.; Gaschen, F.; Straub, R.; Schawalder, P. Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary teaching hospital. 2001. *Veterinary Microbiology*, v. 82, n. 4, p. 347-359.
2. Francey, T.; Gaschen, F.; Nicolet, J.; Burnens, A.P. The role of acinetobacter baumannii as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit. 2000. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 14, n. 2, p. 177-183.
3. Endimiani, A.; Hunjer, k. M.; Hujer, A. M.; Bertschy, I.; Rossano, A.; Koch, C.; Gerber, V.; Francey, T.; Bonomo, R.; Perreten, V. *Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in switzerland: molecular characterization and clinical data. 2011. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, p. 1-7.

CARACTERIZAÇÃO DE APEC (AVIAN PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*) MULTIVIRULENTAS E MULTIRRESISTENTES

CUNHA, M.P.V.¹; SILVA, K.S.²; LINCOPAN, N.³; MORENO, A.M.²; KNÖBL, T.¹

¹ Departamento de Patologia – FMVZ/USP

² Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal – FMVZ/USP

³ Departamento de Microbiologia – ICB/USP

Introdução: A *Escherichia coli* extra-intestinal (ExPEC) é uma classe heterogênea de patógenos envolvidos em inúmeros processos mórbidos em humanos e animais, que se subdivide em *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* causadora de meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* patogênica para aves (APEC) [1]. As APEC têm grande importância na indústria de produção de aves por ocasionarem perdas econômicas que se estendem dos incubatórios ao abate, estando presentes em todas as fases da cadeia de produção de aves. Nos últimos anos, o potencial zoonótico dessa classe tem sido alvo frequente dos trabalhos realizados com APEC. O perfil de resistência a múltiplas drogas exibido por amostras aviárias devido à presença de elementos genéticos móveis como plasmídeos e integrons também tem sido explorado [2, 3]. Alguns clones do patótipo aviário, principalmente os pertencentes ao grupo filogenético B2, são muitos similares a estirpes das ExPEC que afetam humanos (UPEC e NMEC), sendo indistinguíveis genotípica e fenotipicamente [1, 2]. As aves de produção tem sido consideradas como reservatório de ExPEC e o consumo de carne de aves pode assumir um importante papel na cadeia epidemiológica das infecções nos seres humanos [1-3]. Recentemente, a hipótese de que infecções do trato urinário podem ser consideradas doenças veiculadas por alimentos de origem animal ganhou força, uma vez que bactérias presentes nesses alimentos são capazes de colonizar o intestino humano. Em situações específicas, essas bactérias podem provocar infecções em sítios distantes, incluindo vesícula urinária e rins [3]. Levando em conta essas evidências, o presente trabalho caracterizou amostras APEC do grupo filogenético B2 em relação à resistência aos antimicrobianos e virulência.

Materiais e métodos: Foram selecionadas 112 estirpes de APEC do grupo filogenético B2 isoladas de perus comerciais provenientes de 14 granjas. As amostras foram submetidas à técnica de PCR para a pesquisa de 12 genes de virulência (*astA*, *vat*, *cvi/cva*, *neuS*, *iroN*, *papC*, *iss*, *ibeA*, *iucD*, *tsh*, *irp2* e *aggR*) e duas ilhas de patogenidade (PAI I_{CFT073}, PAI II_{CFT073}) (Tabela 1) [1, 4]. Para determinação do perfil de resistência antimicrobiana, as amostras foram submetidas à técnica de Kirby-Bauer, de acordo com as normas internacionais preconizadas pelo CLSI [5]. Foram selecionados para o teste 14 antibióticos (Ácido Nalixídico, Enrofloxacino, Norfloxacino, Amoxicilina,

Cefotaxima, Cefoxitina, Ceftiofur, Eritromicina, Gentamicina, Estreptomicina, Florfenicol, Tetraciclina, Sulfonamidas e Cotrimoxazol). Todas as amostras foram submetidas à pesquisa de integrons de classe 1 e 2 por PCR [6]. As amostras que apresentaram produção fenotípica de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) foram submetidas à pesquisa de genes codificadores de ESBL por PCR e sequenciamento [7] e transconjugação em *E. coli* TOP10 (estirpe receptora) do plasmídeo. O ST (*Sequence Type*) das amostras foi investigado pela técnica descrita por Clermont et al. [8]. A diversidade genética das amostras foi analisada com a técnica de ERIC-PCR [9] e comparados mediante a construção de dendrograma utilizando o software Bionumerics® (Applied Maths, Bélgica). A similaridade das amostras foi estimada pelo coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada, os grupos foram determinados pelo método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average* (UPGMA). Os perfis que apresentaram coeficiente de similaridade igual ou superior a 90% foram considerados clonais. **Resultados e Discussão:** A prevalência dos fatores de virulência nas 112 amostras é apresentada na tabela 1. Os perfis de virulência e resistência estão descritos na figura 1. Destaca-se a alta frequência das ilhas de patogenicidade da cepa protótipo de urosepse humana (CFT073), o que indica estreita relação com isolados humanos e potencial zoonótico. Outro indício de zoonose é a presença dos grupos clonais O25:H4 B2 ST131 (seis amostras) e O6 B2 ST73 (duas amostras). O grupo clonal ST 131 é uma linhagem pandêmica multivirulenta e multiresistente que emergiu na década de 2000 e causa infecção extraintestinal em humanos, sendo identificada no mundo todo [10]. Depois do grupo clonal ST131, a linhagem ST73 é o grupo mais comum em isolados de infecção no trato urinário, bacteremia, pielonefrite e sepse em humanos na Europa e América do Norte [10]. Em relação à resistência antimicrobiana, 85% (95/112) dos isolados foram multiresistentes (resistentes a três ou mais classes de antibióticos), 95,5% (107/112) foi positiva para integrons de classe 1 e 75% (8/112) foram positivas para ambas classes (classes 1 e 2), demonstrando a alta prevalência desses elementos genéticos. As amostras produtoras β-lactamases portavam genes do tipo bla_{CMY-2} (4 amostras), bla_{CTX-M-2} (1 amostra) ou ambos (1 amostra). Os plasmídios de três amostras foram transconjugados com sucesso (tabela 2). As estirpes apresentaram grande diversidade genética (figura 1), não havendo o predomínio de um clone específico.

Tabela 1 – Descrição e prevalência dos genes de virulência e ilhas de patogenicidade em 112 estirpes de *E. coli* APEC.

Gene virulência	Descrição	n (%)
<i>papC</i>	Fimbria P – associada à pielonefrite	24 (21,4)
<i>tsh</i>	Adesina com capacidade proteolítica	80 (71,4)
<i>iroN</i>	Sideroforo salmochelina (captura de ferro)	109 (97,3)
<i>iucD</i>	Produção de aerobactina (captura de ferro)	79 (70,5)
<i>cvl/cva</i>	Plasmídio ColV – produção de colicina	81 (72,3)
<i>neuS</i>	Cápsula K1	40 (35,7)
<i>ibeA</i>	Invasão endotélio cerebral	50 (44,6)
<i>iss</i>	Sobrevivência ao soro – desativa sistema complemento	105 (93,7)
<i>vat</i>	Toxina vacuolizante	52 (46,4)
<i>astA</i>	Toxina de <i>E. coli</i> enteroagregativa	24 (21,4)
<i>aggR</i>	Ativador transcricional de AAFs em EAEC	0 (0)
<i>irp2</i>	Produção de yersiniabactina	84 (75)
PAI I _{CFT073}	Ilha I de patogenicidade de UPEC CFT073 (<i>hly</i> , <i>pap</i> , <i>iuc</i> , <i>iut</i>)	63 (56,5)
PAI II _{CFT073}	Ilha II de patogenicidade de UPEC CFT073 (<i>pap</i> , sideróforo)	74 (64,3)

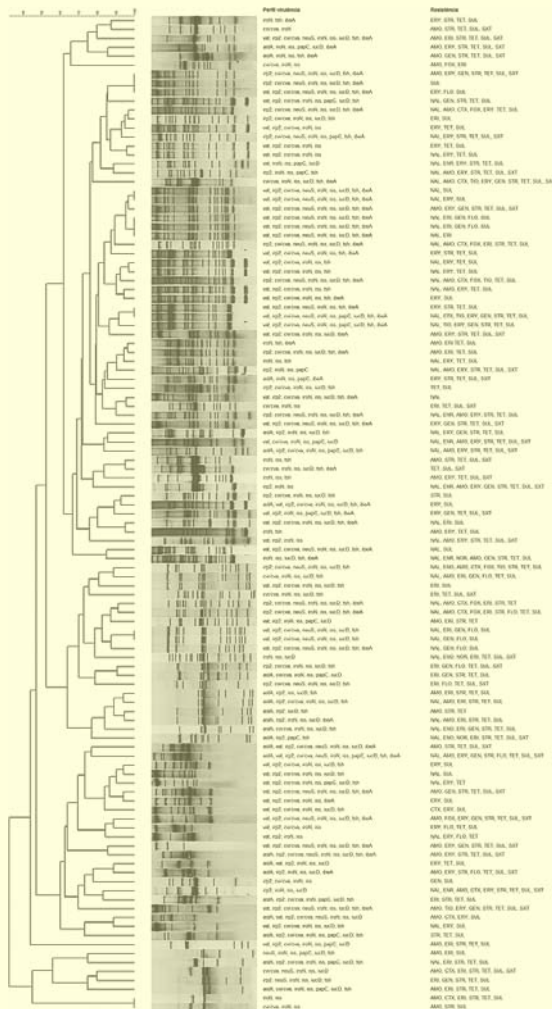


Tabela 2 – Características fenotípicas e genotípicas das amostras de *E. coli* APEC produtoras de β-lactamases.

Amostra	bla _{gene}	Integron	Perfil de resistência	Perfil de virulência
28	CMY-2	Classe 1	NAL, AMO, CTX, FOX, ERI, STR, TET	<i>cvl/cva</i> , <i>iroN</i> , <i>iss</i> , PAI I _{CFT073}
36	CTX-M-2	Classe 1	NAL, AMO, CTX, FOX, ERI, STR, FLO, TET, SUL	HPI, <i>cvl/cva</i> , <i>neuS</i> , <i>iroN</i> , <i>iss</i> , <i>iucD</i> , <i>tsh</i> , <i>ibeA</i> , PAI I _{CFT073} , PAI II _{CFT073}
51	CMY-2	Classe 1	NAL, AMO, CTX, FOX, ERY, STR, TET, SUL	HPI, <i>cvl/cva</i> , <i>neuS</i> , <i>iroN</i> , <i>iss</i> , <i>iucD</i> , <i>tsh</i> , <i>ibeA</i> , PAI I _{CFT073} , PAI II _{CFT073}
70	CMY-2	Classe 1	AMO, FOX, ERI	<i>cvl/cva</i> , <i>iroN</i> , <i>iss</i> ,
153	CMY-2	Classe 1	NAL, AMO, CTX, FOX, TIO, TET, SUL	HPI, <i>cvl/cva</i> , <i>neuS</i> , <i>iroN</i> , <i>iss</i> , <i>iucD</i> , <i>tsh</i> , <i>ibeA</i> , PAI I _{CFT073} , PAI II _{CFT073}
157	CTX-M-2, CMY-2	Classe 1	NAL, AMO, CTX, FOX, ERI, TET, SUL	HPI, <i>cvl/cva</i> , <i>neuS</i> , <i>iroN</i> , <i>iss</i> , <i>iucD</i> , <i>tsh</i> , <i>ibeA</i> , PAI I _{CFT073} , PAI II _{CFT073}

NAL= Ácido Nalidíxico, ENO= Enrofloxacino, NOR=Norfloxacino, AMO=Aoxicilina, CTX=Cefotaxima, FOX=Cefoxitina, CTF=Ceftiofur, ERY=Eritromicina, GEN=Gentamicina, STR=Estreptomicina, FLO=Florfenicol, TET=Tetraciclina, SUL= Sulfonamidas, SXT=Sulfametoxazol/trimetoprim. Transformantes (T) estão em negrito.

Conclusão: Foi encontrada uma alta prevalência de estirpes de APEC possuindo múltiplos genes de virulência, inclusive relacionados com estirpes de ExPEC humanas. A semelhança genotípica dessas estirpes com amostras isoladas de humanos alerta para a possibilidade das aves de produção servirem como reservatórios de bactérias multiresistentes com potencial zoonótico, representando um perigo para a saúde pública. Levando em conta os resultados

obtidos e o preocupante dado que ExPEC são a principal causa de infecções em aves e humanos, ratificamos a necessidade da uso racional de antimicrobianos na produção de aves, assim como a implementação de estratégias de monitorização e vigilância de tais cepas. Os resultados obtidos revelaram a existência de um elevado nível de multirresistência mediada por integrons de classe 1 associado à estirpes multivirulentas. As complexas interações entre o ambiente e as características genéticas das estirpes APEC podem levar à seleção e disseminação da preocupante coexistência de virulência e resistência, uma vez que o aumento dos níveis de resistência múltipla aos antibióticos em todo o mundo pode estar associado ao uso indiscriminado desses medicamentos na produção animal. **Agradecimentos:** À FAPESP pelo apoio financeiro (Processos 11/18204-6, 11/18213-5, 14/11523-7) e CAPES.

Referências Bibliográficas

- Ewers C, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, Antão E-M, Laturmus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, Böhnke U, Steinrück H, Philipp H-C, Wieler LH: Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol* 2007, 297:163–76.
- Mellata M: Human and Avian Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Infections, Zoonotic Risks, and Antibiotic Resistance Trends. *Foodborne Pathog Dis* 2013, 10:916–932.
- Nordstrom L, Liu CM, Price LB: Foodborne urinary tract infections: a new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness. *Front Microbiol* 2013, 4(March):1–6.
- Sabaté M, Moreno E, Pérez T, Andreu A, Prats G: Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12:880–6.
- CLSI: *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard, M31-A3*. 3rd ed., Wayne, PA, USA; 2008.
- Dillon B, Thomas L, Mohmand G, Zelynski a, Iredell J: Multiplex PCR for screening of integrons in bacterial lysates. *J Microbiol Methods* 2005, 62:221–32.
- Silva KC, Fontes LC, Moreno AM, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira AJP, Lincopan N: Emergence of extended-spectrum- β -lactamase CTX-M-2-producing *Salmonella enterica* serovars Schwarzengrund and Agona in poultry farms. *Antimicrob Agents Chemother* 2013, 57:3458–9.
- Clermont O, Christenson JK, Daubié A-S, Gordon DM, Denamur E: Development of an allele-specific PCR for *Escherichia coli* B2 sub-typing, a rapid and easy to perform substitute of multilocus sequence typing. *J Microbiol Methods* 2014, 101:24–27.
- Leung KT, Mackereth R, Tien Y-C, Topp E: A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources. *FEMS Microbiol Ecol* 2004, 47:111–9.
- Riley LW: Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 2014, 20:380–90.

UM NOVO HERPESVÍRUS ASSOCIADO À LARINGOTRAQUEÍTE EM PINGUINS DE MAGALHÃES (*SPHENISCUS MAGELLANICUS*) NO SUL DO BRASIL

NIEMEYER, C.¹; FAVERO, C.¹; SHIVAPRASAD, H.L.²; SILVA-PINHO, R.³; CANABARRO, P.L.³; BRANDÃO, P.E.¹; CATÃO-DIAS, J.L.¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 05508-900 São Paulo – SP, Brasil. Email: claudia.niemeyer@usp.br

²California Animal Health and Food Safety Laboratory System – Campus de Tulare, Universidade da Califórnia, Davis, EUA

³Centro de Recuperação de Animais Marinhos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande – RS, Brasil

Introdução: A infecção por herpesvírus em seu hospedeiro natural costuma ser branda e frequentemente evolui para um processo latente; contudo, infecções entre espécies podem gerar quadros severos e fatais (1,2). A primeira infecção por herpesvírus em pinguins foi descrita por Kincaid (1988) em pinguins africanos (*Spheniscus demersus*) no Zoológico de Baltimore, EUA.

Neste caso, os animais apresentaram prostração e insuficiência respiratória e as lesões histopatológicas consistiam em infiltrado inflamatório com formação de células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranucleares tipo A nas células epiteliais dos sinos, traqueia e brônquios. Apesar do agente não ter sido molecularmente caracterizado, classificou-se posteriormente como Sphenicid herpesvírus 1 (SpHV1) baseado no padrão das lesões e na microscopia eletrônica (4). Os pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*), considerados quase ameaçados pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (2012), são aves marinhas migratórias nativas de regiões temperadas e sub-temperadas da América do Sul (5). Pinguins são bons indicadores do ambiente marinho e sensíveis aos impactos antropogênicos em seu habitat. Todos os anos um grande número de pinguins encalha vivos ou mortos nas praias brasileiras e muitos deles são resgatados por centros de reabilitação ao longo da costa. Embora infecções por herpesvírus tenham sido descritas em diferentes classes animais (4), a ocorrência de infecção em pinguins de Magalhães nunca foi identificada. O presente estudo descreve a primeira ocorrência de infecção por herpesvírus na espécie, além de fornecer os primeiros dados moleculares de uma nova espécie do vírus capaz de causar traqueíte hemorrágica nos pinguins.

Materiais e métodos: No inverno de 2011, 167 pinguins de Magalhães com diferentes graus de petrolização (17 adultos e 150 juvenis) foram admitidos no Centro de Reabilitação de Animais Marinhos (CRAM) em Rio Grande – RS. Oitenta e cinco deles morreram e foram submetidos à necropsia de acordo com protocolo estabelecido. Treze pinguins foram submetidos à eutanásia com 2mL IV de T61* (MSD Saúde Animal – São Paulo/Brasil) por apresentarem comprometimento respiratório severo.

Dos animais necropsiados, fragmentos traqueais de 22 pinguins foram macerados e o DNA extraído de acordo com o protocolo Proteinase K/Fenol/Clorofórmio. Nested PCR com *primers* degenerados visando a DNA polimerase dos herpesvírus foi realizada segundo VanDevanter et al. (1996). A reação de sequenciamento utilizou Big DyeTM 3.1 e os mesmos *primers* da nested PCR. As sequências foram geradas pelo sequenciador automático ABI3500 GeneticAnalyzer (AppliedBiosystems®). A análise qualitativa dos eletroferogramas foi realizada pelo programa PHRED/PHRAP (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>) e as sequências com escore maior que 20 foram aceitas. A árvore filogenética foi elaborada com o programa MEGA v.6.0 (7) utilizando-se o método de inferência filogenética *neighbor-joining*, o modelo de substituição de aminoácidos de Poisson, testando-se a confiabilidade dos ramos pelo método *bootstrap* com valores de 1000 repetições. Para a análise histopatológica amostras de tecidos foram fixadas em solução formol 10% por 48 horas, cortadas e embebidas em parafina. As lâminas foram elaboradas com cortes de 4 μ m e coradas com hematoxilina e eosina. Tanto a microscopia eletrônica de transmissão quanto a imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-laringotraqueíte vírus de galinhas foram realizadas na University of California (UC), Davis – EUA. **Resultados:** Vinte e seis pinguins apresentaram dispnéia aguda e severa e morreram em até 15 dias após entrarem no Centro de Reabilitação. A principal lesão macroscópica foi traqueíte necrótica hemorrágica pseudomembranosa com obstrução do lúmen traqueal, presente em 28 pinguins. Todas as aves apresentaram congestão variável e edema pulmonar, 58 drenaram exsudato branco-amarelado ao corte dos pulmões e 56 apresentaram espessamento severo com aderência de exsudato fibrinoso amarelado em sacos aéreos abdominais e torácicos caudais. Esplenomegalia e hepatomegalia também foram achados comuns. A avaliação histopatológica da traqueia revelou hiperplasia do epitélio com presença de células sinciciais, necrose focal e corpúsculos de inclusão intranucleares do tipo Cowdry A (Figura1). Todos os pinguins apresentaram congestão pulmonar severa e hemorragia multifocal a coalescente. Cinquenta e oito apresentaram pneumonia supurativa aguda difusa variando de discreta a severa e doze aves apresentaram pneumonia piogranulomatosa associada a