

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, Laturnus 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 Dye™ 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 score 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 4µm 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

aerossaculite micótica. Aerossaculite membranosa foi verificada em 56 dos 85 pinguins analisados. A microscopia eletrônica de transmissão dos cortes de traqueia fixados demonstrou que as inclusões intranucleares observadas na microscopia óptica consistiam em densos agregados de partículas virais. Partículas do capsídeo viral envelopado, assim como envelopes vazios, foram visualizados no núcleo das células e seus tamanhos variaram de 99.6 a 149 nm. A análise imuno-histoquímica das traquéias para o vírus da laringotraqueite das galinhas foi negativa, sugerindo que, por mais que as lesões histológicas visualizadas nos pinguins fossem muito semelhantes às lesões causadas pelo Gallid herpesvirus 1 em aves de produção, o agente envolvido no surto não seria o mesmo. Um fragmento de 460 pb referente à sequência parcial do gene da DNA polimerase do herpesvírus foi detectado. Esta sequência foi submetida ao GenBank (Número de acesso: KJ720217) e denominada *Magellanic penguin herpesvirus 1* (MPHV-1), por se tratar do primeiro relato na espécie e pela ausência de dados genéticos do *Spheniscid herpesvirus 1* para comparação. A análise filogenética da sequência obtida comparada com outras 19 sequências disponíveis no GenBank e que caracterizam subfamílias virais segundo o ICTV, demonstrou que o MPHV-1 causador da laringotraqueíte hemorrágica dos pinguins corresponde a uma nova espécie dentro do gênero *Iltovirus*, compreendido pelas espécies *Gallid herpesvirus 1* e *Psittacid herpesvirus 1*. Portanto, o *Magellanic penguin herpesvirus 1* pode ser classificado como pertencente à subfamília *Alphaherpesvirinae*, Gênero *Iltovirus*, conforme demonstrado na Figura 2.

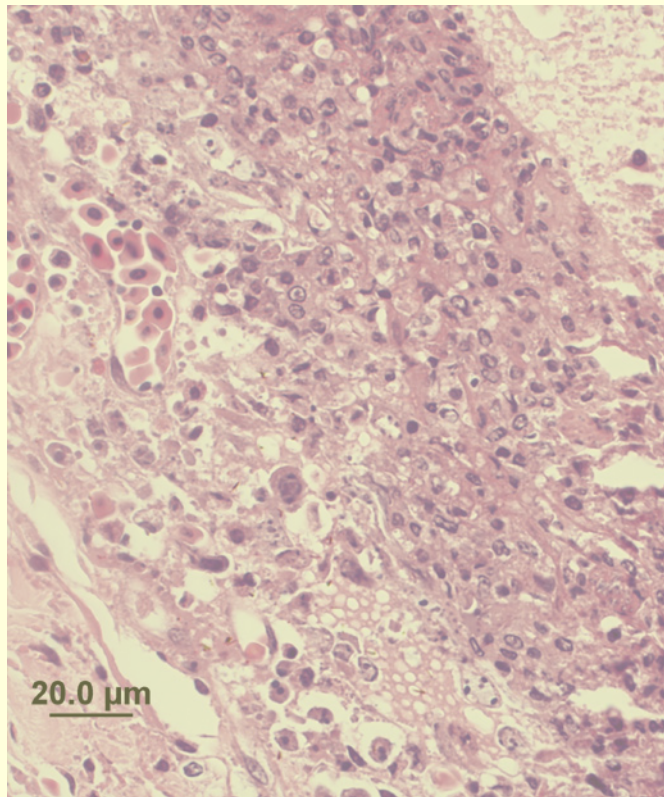


Figura 1 – Epitélio traqueal de pinguim de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) com células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranucleares tipo Cowdry A. H&E.

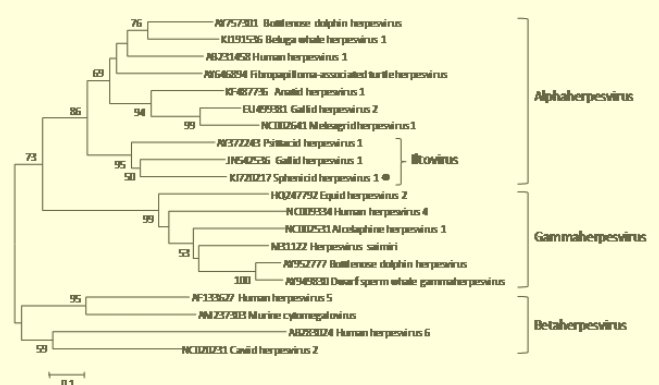


Figura 2 – Análise filogenética do *Spheniscid herpesvirus 1* identificado em macerado de traqueia de pinguins de Magalhães no Rio Grande do Sul, Brasil. A árvore contendo sequências de 136 aminoácidos de representantes das três subfamílias virais foi gerada pelo método de Neighbour-joining com 1000 repetições de bootstraps.

Conclusão: Embora a origem do herpesvírus descrito seja desconhecida, o padrão de mortalidade observado sugere que os animais não tiveram contato prévio com este genótipo viral. Contudo, não se pode descartar a hipótese de que as aves apresentassem o vírus em estado de latência e que tenham desenvolvido a enfermidade devido aos efeitos imunossupressores tanto da contaminação por petróleo quanto do estresse da reabilitação. Para tanto, investigações sobre a ocorrência ou não de herpesvírus na população saudável e de vida livre devem ser conduzidas para melhor esclarecimento desta ocorrência. **Agradecimentos:** O presente trabalho recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Projeto 2010/51801-5) e do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq – Projeto 141948/2011-6). Todos as colheitas e procedimentos foram autorizados por meio de licença SISBIO (36250-5), pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (CEUA/FMVZ, processo 2178/2011) e licença CITES (13BR010796/DF).

Referências Bibliográficas

- Ritchie, Branson W. & Carter, Kip. 1995. Chapter 7 Herpesviridae. In: Avian Viruses: Function and Control. Wingers Publishing, Lake Worth.
- Kaletka, Erhard F. & Docherty Douglas E. 2007. Avian Herpesviruses In: Thomas, N.J. et al. Infectious Diseases of Wild Birds. Blackwell Publishing, Oxford
- Kincaid, A.L. et al. 1988. Herpesvirus-like infection in Black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) Journal of Wildlife Diseases 24(1): 173-175.
- Davison, Andrew J. 2010. Herpesvirus systematic. Veterinary Microbiology 143: 52 – 69.
- BirdLife International 2012. *Spheniscus magellanicus*. In: IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014 [cited 23 June 2014]. <http://www.iucnredlist.org>
- VanDevanter, D., Warrener, P., Bennett, L. et al. 1996. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primers PCR. Journal of Clinical Microbiology. 34, 1666-1671
- Tamura, K et al. 2013. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>, acessado em 10 de setembro de 2014.