

positivo de apoptose e as células controle negativo de morte (Ctrl) foram expostas somente ao meio neurobasal acrescido de penicilina:estreptomicina e glutamina. A expressão das proteínas pró-apoptóticas (caspase-8, -9, -3 e Bax) e anti-apoptótica (Bcl-2) foram avaliadas pelo método de Western blot após a separação de 40µg de proteínas totais, por SDS-PAGE. **Resultados e Discussão:** Os resultados preliminares indicaram que em 3h de exposição: Coc expressou mais pró-caspase-8 do que o Ctrl ( $p < 0,05$ ), A ( $p < 0,05$ ) e C+A ( $p < 0,01$ ), assim como o fragmento de 41Kda ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$  e  $p < 0,05$ , respectivamente) e maior do que o Ctrl no fragmento de 25Kda ( $p < 0,0001$ ). Não ativou caspase-9, não alterou a razão Bax/Bcl-2, mas ativou caspase-3, com maior expressão de pró-caspase e caspase clivada (17kda) do que Ctrl ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,001$ , respectivamente), A (ambas  $p < 0,0001$ ) e C+A (ambas  $p < 0,0001$ ). Sugerindo que a Coc pode ativar a apoptose mediada por caspase-8 nesse período de exposição. AEME apresentou maior expressão do fragmento de 25Kda do que o Ctrl ( $p < 0,01$ ), expressou mais o fragmento clivado de caspase-9 do que Coc ( $p < 0,05$ ), razão Bax/Bcl-2 normal e menor expressão de pró-caspase-3 do que Ctrl ( $p < 0,05$ ) e caspase clivada do que Coc ( $p < 0,05$ ), sugerindo que nesse tempo, ainda não há morte celular por apoptose por essa droga. C+A, assim como AEME, expressou mais do que o Ctrl o fragmento clivado de caspase-8 ( $p < 0,01$ ), mais do que a Coc o fragmento clivado de caspase-9 ( $p < 0,01$ ), com razão Bax/Bcl-2 normal porém, quanto à caspase-3, a associação expressou mais pró-caspase-3 do que o Ctrl ( $p < 0,001$ ) e AEME ( $p < 0,01$ ), mas menos do que Coc ( $p < 0,0001$ ), e expressou menos o fragmento clivado de 17Kda do que Coc ( $p < 0,0001$ ), mostrando que nesse tempo de exposição a associação se comporta semelhante à AEME diferenciando apenas pela expressão de pró-caspase-3. Em 6h de exposição; Coc não apresentou sinais de ativação das caspases-8 ou -9, mas apresentou maior clivagem de caspase-3 do que o Ctrl ( $p < 0,01$ ), com aumento da razão Bax/Bcl-2. Como a ativação de Bax antecede ativação de caspase-9, esperamos observar ativação dessa via em tempo maior de 6h de exposição. AEME expressou mais pró-caspase-8 do que Ctrl, sem alterações quanto caspase-9 ou caspase-3, mas com aumento da razão Bax/Bcl-2. C+A, apesar de expressar mais do que o controle o fragmento clivado de caspase-8, a associação das drogas não ativou caspase-9 e apresentou menor razão Bax/Bcl-2 do que as drogas isoladamente, com aumento de pró-caspase-3 e caspase-3 clivada, semelhantemente à Coc em 3h, ou seja, mediado por caspase-8. **Conclusão:** Devido ao reduzido número amostral, ainda é cedo para se caracterizar uma via de ativação da apoptose, mas foi constatado que a associação de drogas comporta-se de modo diferente em 3h e 6h. Cocaína parece ativar caspase-3, "ponto sem retorno" para a morte celular, a partir da via extrínseca da apoptose (mediada por caspase-8) em 3h de exposição e a AEME a partir de 6h. Outras proteínas e vias ainda devem ser investigadas para melhor caracterizar o processo de indução de morte celular decorrente da exposição dessas substâncias. **Apoio financeiro:** FAPESP, CNPq

## Referências

- [1] DIECKMANN, L. H. J.; et al. Effects of biperiden on the treatment of cocaine/crack addiction: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *European Neuropsychopharmacology*, v. 24, n. 8, p. 1196-1202, 2014.
- [2] UNODC - United Nations Office on Drugs and Crime. *World Drug Report*. United Nations publication, 2014. 127 p.
- [3] LANE, S. D.; et al. Diffusion tensor imaging and decision making in cocaine dependence. *PLoS ONE*, v. 5, n. 7, p. e11591, 2010.
- [4] XIE, X.; WELLS, A. M.; FUCHS, R. A. Cocaine Seeking and Taking: Role of Hippocampal Dopamine D1-like Receptors. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 17, n. 9, p. 1533-1538, 2014.
- [5] GARCIA, R. C. T.; et al. Neurotoxicity of Anhydroecgonine Methyl Ester, a Crack Cocaine Pyrolysis Product. *Toxicological Sciences*, v. 128, n.1, p.223-234, 2012.

## PLASMÍDEOS E GENES DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS E CEFALOSPORINAS DE TERCEIRA GERAÇÃO EM AMOSTRAS CLÍNICAS E COMENSAIS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE FRANGOS DE CORTE, POEDEIRAS E PERUS NO BRASIL

CUNHA, MARCOS PAULO V.1; FRANCO, LETICIA SOUZA1; CARVALHO, VANIA MARIA1, MORENO, ANDREA MICKE2; KNÖBL, TEREZINHA1.

1Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

2 Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

**Introdução e Objetivos:** A pressão seletiva causada pelos antibióticos utilizados como promotores de crescimento ou terapêuticos em animais de produção é uma preocupação atual no mundo todo.<sup>1,2</sup> Recentemente, vários trabalhos demonstraram que estirpes de bactérias patogênicas e/ou multiresistentes são selecionadas no contexto da produção animal.<sup>2</sup> Dentre os antibióticos aos quais as bactérias têm apresentando aumento nos níveis de resistências estão as quinolonas e cefalosporinas de terceira geração. Antibióticos pertencentes a essas classes são os mais utilizados na medicina humana e veterinária mundialmente. Normalmente os mecanismos de resistência a essas classes são mediados por plasmídeos e envolvem a produção de enzimas que hidrolisam os antibióticos, como as beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), ou bombas de efluxo e proteção do alvo da molécula dos antimicrobianos, no caso da resistência quinolonas (PMQR).<sup>3,4</sup> Elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons têm um papel crucial na disseminação e evolução de genes que codificam essas enzimas entre bactérias.<sup>5</sup> Levando isso em conta, o objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de plasmídeos e genes de resistência em amostras comensais e patogênicas (*avian pathogenic E. coli* - APEC) de *Escherichia coli* isoladas de frangos, poedeiras e perus de criações comerciais utilizando técnicas moleculares.

**Materiais e Métodos:** 458 estirpes não duplicadas de *Escherichia coli* isoladas de perus (APEC=225, comensal=130) frangos de corte e poedeiras (APEC=33, comensal=70), em amostras colhidas, no período de 2009 a 2014, em granjas de criação, situadas nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo, Brasil foram sementes em meio de cultura contendo ácido nalidixico (16 mg/L) e ceftiofur (8mg/L). As que apresentaram crescimento foram submetidas à técnica de PCR para a pesquisa de genes plasmidiais de resistência às quinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *oqxAB*, *qepA* e *aac(6)'Tb-cr*), *ampC* plasmidiais (*blaCMY*, *blaDHA*, *blaFOX* e *blaACC*) e beta-lactamases de espectro estendido (*blaCTX-M*, *blaSHV* e *blaTEM*). Os produtos foram sequenciados para determinação das variantes. Amostras positivas para qualquer um dos genes tiveram seus plasmídeos classificados pela técnica de PBRT (PCR-based on Replicon Typing) incluindo 22 grupos de incompatibilidade plasmidial (A/C, B/O, F, FII, FIA, FIB, FIC, I, K, HI1, HI2, L/M, N, P, R, T, U, X, Y, W, CoE, CoLETP) e o ambiente genético foi determinado com a pesquisa de sequências de inserção e transposons (IS26, ISEcp1, Tn3 e ISCR1) e da técnica de primer walking. A conjugação de plasmídeos foi realizada com a estirpe *E. coli* C600 (ATCC 23724) como receptora. A extração e purificação dos plasmídeos foi realizada com o kit comercial (Wizard Plus SV, Promega, USA). Plasmídeos CoE-like foram completamente sequenciados com técnicas de primers divergentes e primer walking. As análises, alinhamento e anotação dos plasmídeos foi realizada com os softwares ClustalX2 v2.1 (<http://www.clustal.org/clustal2/>), BioEdit v7.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e Artemis (Sanger Institute, UK).

**Resultados e Discussão:** Dentre as estirpes isoladas dos perus, 42 APEC foram positivas para pelo menos um gene plasmidial de resistência às quinolonas (tabela 1) e 16 amostras comensais tiveram resultados positivos. Dentre as 33 amostras qnrB positivas (22 APEC, 11 fecal), 32 apresentaram a variante qnrB19, que estava inserida em pequenos plasmídeos do grupo ColE-like com tamanhos entre 2.7 and 3.5 Kb. Uma amostra apresentou uma nova variante qnrB (em análise pela curadoria). O total de amostras dos perus que apresentou genes ESBL ou AmpC é apresentado na tabela 1. As amostras fecais de galinhas e frangos de corte (n=70) apresentaram alto índice de ESBL (87%), com predomínio de enzimas CTX-M-2 e CTX-M15, além duas amostras produtoras de CTX-M-8. Em todas as amostras ESBL e PMQR, os genes CTX-M-2 e qnrA1 estavam inseridos em integrons de classe 1 associados a ISCR1. Já as amostras CTX-M-15, CTX-M-8 e CMY-2 apresentaram o elemento ISEcp1 a jusante. Os plasmídeos ColE-like portando o gene qnrB19 sequenciados (n=8) apresentaram alta similaridade (96-100%) entre si e com sequências de plasmídeos do mesmo tipo detectados em E. coli e Salmonella spp. isoladas de humanos na Colômbia, Peru e Argentina [6–8]. Os plasmídeos sequenciados continham a mesma estrutura: o gene qnrB19 e três ORFs (open reading frames), sendo um possivelmente envolvidos na replicação e um hipotético, além do gene psp truncado e sequências homólogas a IRs (inverted repeats) de ISEcp1. Estudos realizados na Europa e Ásia mostraram que plasmídeos que portam qnrB19 nesses continentes são grandes (>50 Kb) e conjugativos e pertencentes ao grupo IncN [4,9]. Quando comparados com dados dos estudos realizados com estirpes soladas de humanos na Colômbia, Peru e Argentina, os achados do presente trabalho sugerem a endemicidade de estirpes portando plasmídeos ColE-like qnrB19 na América do Sul e a possível participação das aves de produção na cadeia epidemiológica e transmissão dessas estirpes para humanos.

Em relação às beta-lactamases, a presença dos genes codificadores das enzimas CTX-M-2 e CTX-M-8 está de acordo com outros achados na América do Sul, pois estas duas ESBL foram primeiramente descritas em amostras nosocomiais da Argentina e Brasil, respectivamente. No Brasil só existem relatos de estirpes de E. coli produtoras de CTX-M-2 em aves de produção e com prevalência muito menor ao constatado no presente trabalho. No entanto, um dado preocupante foi a detecção de CTX-M-15 e CMY-2 nas aves de produção. E. coli produtoras de CTX-M-15 são um problema mundial que se iniciou em 2008, com a descrição de uma linhagem virulenta e multirresistente denominada ST131. Após os primeiros relatos na Europa e Estados Unidos, essa linhagem se espalhou pelo mundo, sendo considerada uma linhagem pandêmica de E. coli, mas com raros relatos na América do Sul, geralmente relacionados a

estirpes isoladas de infecções em humanos. A emergência de CTX-M-15 aqui apresentada pode indicar o mesmo fenômeno observado por Sennati et al. (2012) na Argentina, a mudança na epidemiologia e no perfil populacional de E. coli ESBL de CTX-M-2 para CTX-M-15 [10]. **Conclusão:** Foi relatada a alta prevalência de E. coli produtoras de ESBL, AmpC e PMQR em frangos e perus no Brasil. A disseminação da resistência aos principais antimicrobianos por elementos móveis na cadeia de produção de aves é uma preocupação não apenas para saúde animal, mas também para a saúde pública. O uso racional e controlado de antimicrobianos na produção animal é necessário, assim como a implementação de estratégias de monitoramento e vigilância da resistência em bactérias de origem animal.

**Referências**

[1] AARESTURUP, F. M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, v. 96, p. 271-81, 2005.

[2] AARESTURUP, F. M. The livestock reservoir for antimicrobial resistance : a personal view on changing patterns of risks , effects of interventions and the way forward. *Philos Trans R Soc London Ser B-Biologic*, v. 370, n. 1-13, 2015.

[3] BUSH, K. Bench-to-bedside review: the role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care*, v. 14, p. 224, 2010.

[4] JACOBY, G. A.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D. C. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *Microbiol Spectr*, v. 2, p.1-24, 2014.

[5] PERRY, J. A.; WESTMAN, E. L.; WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: what's new? *Curr Opin Microbiol*, v. 21C, p. 45-50, 2014.

[6] TRAN, T.; ANDRES, P.; PETRONI, A.; SOLER-BISTUÉ, A.; ALBORNOZ, E.; ZORREGUIETA, A.; et al. Small plasmids harboring qnrB19: a model for plasmid evolution mediated by site-specific recombination at oriT and Xer sites. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, p. 1821-7, 2012.

[7] PALLECCHI, L.; RICCOBONO, E.; SENNATI, S.; MANTELLA, A.; BARTALESI, F.; TRIGOSO, C.; et al. Characterization of small ColE-like plasmids mediating widespread dissemination of the qnrB19 gene in commensal enterobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*; v. 54, p. 678-82, 2010.

[8] KARZMARCZYK, M.; MARTINS, M.; MCCUSKER, M.; MATTAR, S.; AMARAL, L.; LEONARD, N.; et al. Characterization of antimicrobial resistance in Salmonella enterica food and animal isolates from Colombia: Identification of a qnrB19-mediated quinolone resistance marker in two novel serovars. *FEMS Microbiol Lett*, v. 313, n. 10-9, 2010.

[9] GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; FORTINI, D.; VELDMAN, K.; MEVIUS, D.; CARATTOLI, A. Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in Salmonella. *J Antimicrob Chemother*, v. 63, n. 274-81, 2009.

[10] SENNATI, S.; SANTELLA, G.; DI CONZA, J.; PALLECCHI, L.; PINO, M.; GHIGLIONE, B.; et al. Changing Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Argentina: Emergence of CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, p. 6003-5, 2012.

**Tabela1** - Distribuição dos genes codificadores de resistência às quinolonas (PMQR), beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e AmpC plasmidiais, assim como os respectivos plasmídeos e ambiente genético, em 458 amostras de Escherichia coli isoladas de perus, poedeiras e frangos de corte, no Brasil, no período de

Ave (N)	PMQR				ESBL				ampC			
	Gene	N	Plasmídeos	Ambiente Genético	Gene	N	Plasmídeos	Ambiente Genético	Gene	N	Plasmídeo	Ambiente Genético
Perus (225 APEC, 130 fecal)	qnrA1	17	A/C, FII, HI2	Integron classe 1-ISCR1	CTX-M-2	5	II, L/M, B/O, F, FII, FIA, FIB, N	Integron classe 1-ISCR1	CMY-2	11	A/C, II	ISEcep1
	qnrB19	32	ColE	pspF, ΔISEcep1								
	qnrB-like	1	ND*	pspF, sapA								
	qnrS1	7	N, HI1	Tn3	CTX-M-8	10	II,F, FII, FIA, FIB, N	ISEcep1				
	oqxAB	2	F, X, HI2, L/M	IS26								
Frangos e poedeiras (33 APEC, 70 comensal)	qnrB19	7	ColE	pspF, ΔISEcep1	CTX-M-2	38	II, L/M, ColE, F, FII, FIA, FIB,	Integron classe 1-ISCR1				
	oqxAB	2	X, HI2, II	IS26	CTX-M-8	2	II, ColE, FII, FIA, FIB	ISEcep1				
	qnrS1	1	N, HI1	Tn3	CTX-M-15	20	II, L/M, B/O, F, FII, FIA, FIB, N, A/C, ColE	ISEcep1				

\*ND=Não determinado