

# AVALIAÇÃO DOS CLONES DE *Escherichia coli* RESISTENTES ÀS POLIMIXINAS ISOLADOS DE FRANGOS EM GRANJAS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Aluna: Beatriz Garcia Belassiano; Instituição de ensino conveniada: Colégio Pedro II - Campus Centro; Orientador: Bruno Rocha Pribul; Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH) do IOC / FIOCRUZ

## INTRODUÇÃO

Atualmente, o crescimento da taxa de resistência de patógenos aos antimicrobianos está extremamente alarmante, alavancando a morbidade, mortalidade e custos provenientes do aumento de infecções hospitalares. O elevado uso de antimicrobianos na profilaxia e como promotores de crescimento em animais de produção são causas desse quadro problemático. A utilização indiscriminada desses antibióticos exerce uma pressão seletiva sobre os micróbios, selecionando clones resistentes, uma ameaça à saúde das pessoas e animais.

Com as bactérias multirresistentes criando resistência aos principais antimicrobianos utilizados no seu combate, como os carbapenêmicos, houve uma reintrodução de polimixinas (B e E) para o tratamento de infecções por estes microrganismos. Em seguida, os patógenos também começaram a criar resistência a estes novos fármacos. Os mecanismos de resistência às polimixinas são codificados por genes cromossômicos e plasmidiais relacionados à modificações na estrutura da membrana externa. Assim, foi identificado um mecanismo de resistência em bactérias às polimixinas mediado pelo gene denominado *mcr-1* (mobile colistin resistance), e posteriormente, foram detectadas outras nove variantes dele. Uma alta incidência do gene *mcr* na avicultura tem sido registrada. Na maioria das vezes, este gene é identificado em amostras de *Escherichia coli*. Dentre os animais de produção que podem conter esse gene, os frangos são considerados potenciais reservatórios para ele, o que é preocupante para a saúde pública, já que o Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de carne de frango.

## OBJETIVO

Com o crescimento preocupante dos relatos de bactérias resistentes e a possibilidade de disseminação do gene *mcr*, torna-se imprescindível o monitoramento do gene na cadeia alimentar, para evitar sua propagação em grande escala. É fundamental, portanto, a identificação de amostras *mcr* positivas, com o intuito de monitorar a resistência antimicrobiana, prevenir que microrganismos positivos se alastrem e orientar terapias antimicrobianas mais adequadas.

## METODOLOGIA

**Amostragem:** o material fecal foi coletado, através da introdução de swab na cloaca, sendo este acondicionado em meio de transporte Cary Blair para posterior processamento no laboratório.

**Obtenção e identificação das colônias polimixina resistentes:** os swabs foram semeados num meio específico suplementado com polimixina, e as placas foram incubadas. Colônias polimixina resistentes foram identificadas por métodos fenotípicos até o nível de espécie, através de estratégias convencionais.

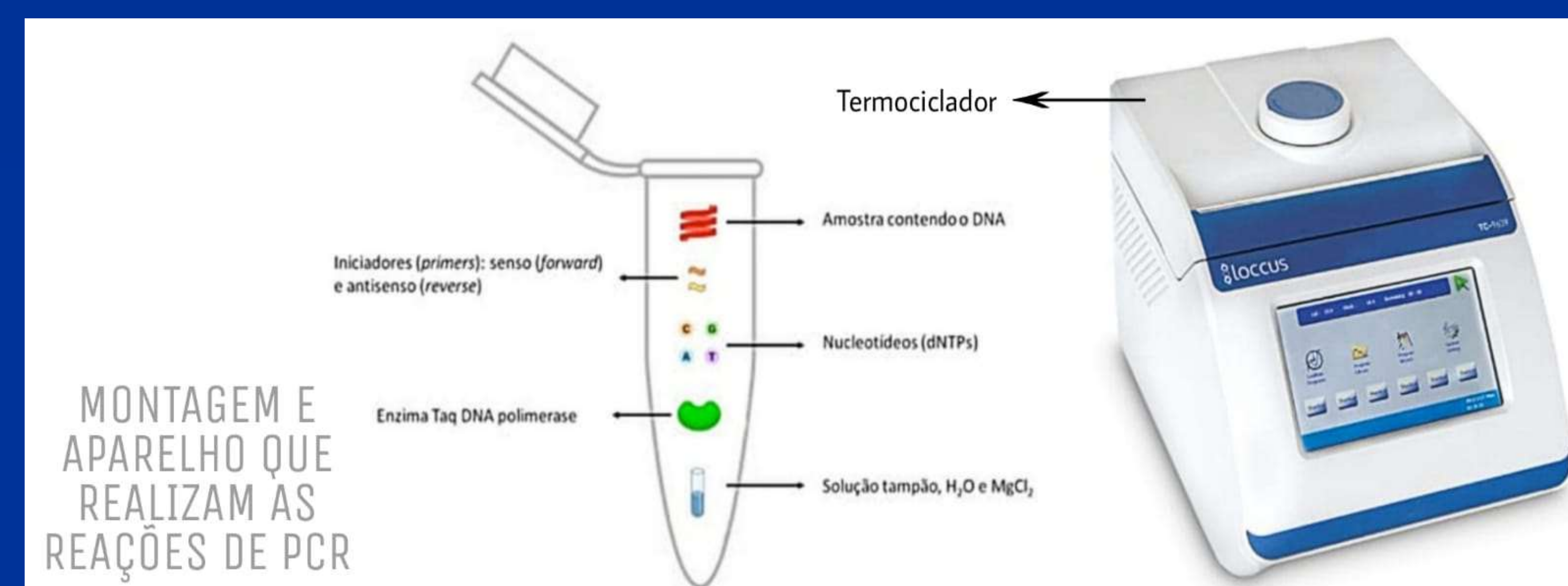


**Determinação da CIM para às polimixinas:** os isolados que apresentaram crescimento na presença de polimixina, foram submetidos ao teste de

microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de polimixina para impedir o desenvolvimento bacteriano.



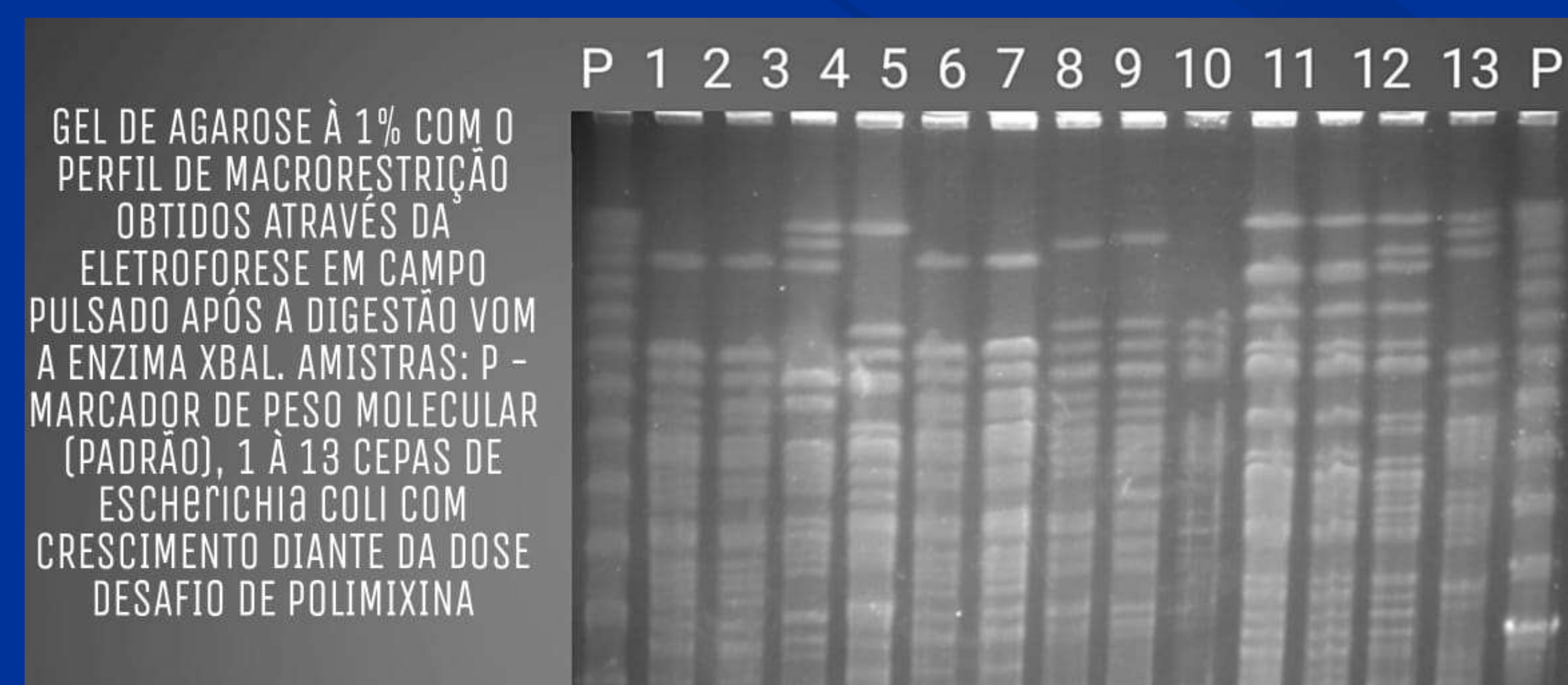
**Investigação dos genes plasmidiais envolvidos na resistência às polimixinas:** foi extraído o DNA total das colônias polimixina resistentes isoladas em meio seletivo, e foram feitas reações de PCR com o DNA extraído, utilizando primers específicos para a detecção do gene *mcr*.



**Determinação da diversidade genética:** As amostras foram submetidas à tipagem molecular pela técnica de PFGE e os resultados obtidos serão analisados através de dendrogramas confeccionados a partir da análise da imagem do gel no "software" BioNumerics 6.6 (Applied Maths). Vai ser utilizado o protocolo do PulseNet para preparação do DNA e digestão com a enzima XbaI. Para a separação dos fragmentos de restrição, será utilizado o sistema CHEF DR III, implantando-se condições de temperatura, ciclos, voltagem e tempos específicos. O gel será corado utilizando solução aquosa de Gel Red, subsequente lavagem e visualização em UV, e será feita, por fim, a digitalização da imagem.

## RESULTADOS PARCIAIS

Até o presente momento, 13 isolados de diferentes granjas do Rio de Janeiro apresentaram crescimento microbiano diante a concentração de 3µg/ml de polimixina. Estes foram submetidos à técnica de Eletroforese em campo pulsante para determinar a similaridade gênica entre eles.



Estas cepas serão inseridas em banco de dados do "Bionumerics 6.6" (Applied Maths), para geração de uma matriz, utilizando o coeficiente de Dice. Serão reunidos os padrões em grupos pelo método UPGMA o que resultará em um dendrograma e por fim, os clones serão definidos.

Diante do exposto, é clara a importância deste projeto, visto que a incidência e relevância do gene *mcr* no cenário mundial de resistência antimicrobiana são crescentes e existe uma necessidade urgente de se pensar a saúde de forma unificada (ambiente-animal-humano).