

## Anais do XX Simpósio de Iniciação Científica FACLEPP – UNOESTE

### Resumos com Resultados – Ciências Biológicas

DIVERSIDADE DE AVIFAUNA EM MARTINÓPOLIS, SÃO PAULO 3 INVENTÁRIO DE CORUJAS (STRIGIFORMES) NO OESTE DE SÃO PAULO, COM REGISTRO DOCUMENTADO DE ASIO FLAMMEUS E ASIO CLAMATOR EM TEODORO SAMPAIO .....	5
INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DA PROTEÍNA MRJP3 EM COLÔNIAS DE ABELHAS TETRAGONISCA ANGUSTULA.....	7
A ALBUMINA NÃO É UM BOM MARCADOR DE DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DURANTE O TRATAMENTO ANTITUBERCULOSE .....	9
ALFA-1-GLICOPROTEÍNA ÁCIDA COMO MARCADOR DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA DURANTE O TRATAMENTO ANTITUBERCULOSE.....	11
POLIMORFISMO IL17A (RS7747909) INFLUENCIA NAS MANIFESTAÇÕES DA TUBERCULOSE?.....	13
ANÁLISE DA SEQUENCIA GENICA DE E. COLI ISOLADA DE UM SURTO DE DIARREIA EM BEZERROS.....	15
AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO NASAL DE PROFISSIONAIS DE SAÚDE POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE À METICILINA .....	19
AVALIAÇÃO DA INFLUENCIA DE CONDIÇÕES ADVERSAS NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE MICROBIANOS EM BRÁQUETES ORTODÔNTICOS METÁLICOS. ....	24
CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE E. COLI ISOLADA DE CASO DE DIARREIA EM BEZERROS.....	28
DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS EM ISOLADOS DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS .....	30
DETECÇÃO FENOTÍPICA DE BIOFILME POR STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE MANIPULADORES DE ALIMENTO.....	31
CARACTERIZAÇÃO DO SOROGRUPO O DE AMOSTRAS DE ESCHERICHIA COLI ISOLADAS DE CRIANÇAS COM DIARREIA .....	33
DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME E DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS POR STAPHYLOCOCCUS ISOLADOS DE PACIENTES COM RINOSSINUSITE CRÔNICA.....	35
PERFIL DE VIRULÊNCIA DAS ESCHERICHIA COLI DIARREIOGÊNICAS ISOLADAS DE CRIANÇAS .....	37



---

## **DIVERSIDADE DE AVIFAUNA EM MARTINÓPOLIS, SÃO PAULO**

PABLO EDINI DAMIÃO EDINE DAMIÃO

WILTON FELIPE TEIXEIRA

PAULO ANTONIO DA SILVA

O município de Martinópolis está localizado no oeste do Estado de São Paulo, cerca de 541km distante da capital, apresentando variadas fitofisionomias, com predominância de Mata Atlântica Estacional Semidecídua e Cerrado/Cerradão. Na região há a presença de diversas espécies de aves, contudo não foram encontrados trabalhos científicos de catalogação em Martinópolis, portanto despertou-se o interesse pelo estudo local de avifauna, haja vista, a importância de geração de dados científicos para a conservação de espécies. O objetivo desse estudo foi realizar um levantamento ornitológico em áreas urbanas e rurais de Martinópolis, analisando o grau de conservação das espécies. Este trabalho encontra-se em andamento desde setembro de 2018, contabilizando até o presente tempo 56 horas de amostragens por meio de transecções lineares estão sendo realizadas análises quantitativas com a finalidade de averiguar a riqueza de aves do município. As saídas de campos são realizadas no período matutino e vespertino, em áreas rurais e resquícios de Mata Atlântica, empregando a metodologia de observações diretas com auxílio de gravadores e câmera para registros documentados. Para a realização de um check list completo, foi utilizado dado secundários consultado em plataformas online de banco de dados avifaunísticos, especificamente Wiki Aves, E-bird e Xeno-canto. Foram identificadas 105 espécies de aves, distribuída em 22 ordens e 42 famílias, correspondendo a 12% da avifauna paulista. Notou-se que da atual lista de aves do município, 76 espécies são nossos registros exclusivos, ao menos nas plataformas online analisadas. A maior parte de nossos registros está documentada no Wiki Aves ([www.wikiaves.com/municipio\\_3529203](http://www.wikiaves.com/municipio_3529203)). 5 espécies (5%) desse inventário constam na lista de fauna silvestre ameaçada no Estado de São Paulo; uma ameaçada: *Bartramia longicauda* e, quatro quase ameaçadas: *Rhynchotus rufescens*, *Penelope superciliaris*, *Bubo virginianus* e *Amazona aestiva*. Quanto a guilda alimentares a maioria das espécies são onívoras, exatamente 41 sp (39%), seguidos de carnívoras com 21 sp (20%), 20 sp insetívoras (19%), 10 sp granívoras (9%), 6 sp frugívoras (6%), 4 nectívoras (4%) e 3 detritívoras (3%). O trabalho apesar de ser incipiente demonstrou resultado significativo, diante do curto esforço amostral e pela quantidade de espécies conhecidas para a região do Pontal do Paranapanema. Com o aumento da área de estudos, pretende-se elevar o número de registros de espécies. No compêndio das aves de Martinópolis, foi constatada a presença de poucas espécies na lista de fauna ameaçadas no Estado de São Paulo, uma ameaçada e quatro quase ameaçadas. Protocolo CEUA: 35201.

---

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

---

**INVENTÁRIO DE CORUJAS (STRIGIFORMES) NO OESTE DE SÃO PAULO, COM REGISTRO DOCUMENTADO DE ASIO FLAMMEUS E ASIO CLAMATOR EM TEODORO SAMPAIO**

WILTON FELIPE TEIXEIRA  
PABLO EDINI DAMIÃO EDINE DAMIÃO  
PAULO ANTONIO DA SILVA

Suindaras, corujas, caburés e mochos são os nomes popularmente conhecidos dos rapinantes da ordem Strigiformes, a qual se divide em duas famílias, Tytonidae e Strigidae. Possuem ampla distribuição geográfica, exceto na Antártida, com 212 espécies, sendo o Brasil representado por 23 espécies. De acordo com Silveira e Uezu, no Estado de São Paulo ocorrem 16 espécies de corujas. Adicionalmente, *Megascops sanctaecatarinae*, registrada em 2014, soma a décima sétima espécie Strigiformes para o Estado, especificamente na região sudoeste e sul. A idealização desse estudo adveio da carência de trabalhos com corujas na região, e o intuito foi justamente aumentar a distribuição geográfica das espécies dessa família. O objetivo geral da pesquisa foi determinar a riqueza de corujas no Pontal do Paranapanema, especialmente em Teodoro Sampaio/SP através de check list. O objetivo específico foi registrar espécies inéditas nos municípios inventariados. Durante o mês de novembro de 2018, compilamos dados científicos adquiridos de nossas saídas de campo (2015-2018) em área urbana e rural de Teodoro Sampaio, juntamente com o compêndio que produzimos das espécies registradas no município. Procuramos por registros na literatura para a região, bem como nas bases de dados do E-bird, Wiki Aves e Xenocanto. O estudo em campo foi conduzido por meio de transecções lineares aleatórias, utilizando playback através de telefone móvel, lanternas para facilitação das observações, câmeras e gravadores para realização de registros fotográficos e auditivos. Doze espécies de Strigiformes pertencentes a oito gêneros foram registradas para o oeste paulista (*Tyto furcata*, *Megascops choliba*, *Megascops atricapilla*, *Pulsatrix koenigswaldiana*, *Bubo virginianus*, *Strix virgata*, *Strix huhula*, *Glaucidium minutissimum*, *Glaucidium brasilianum*, *Athene cunicularia*, *Asio clamator* e *Asio flammeus*). *Asio flammeus* e *Asio clamator* foi por nós registradas recentemente, espécies que nos trabalhos de Willis e Oniki teve registro em algumas regiões, entre elas São Carlos e São José do Rio Preto, mas não em Teodoro Sampaio. O primeiro contato com *Asio flammeus* ocorreu em 17 de agosto de 2018, na vicinal SPV-031 (22°27'18"S, 52°13'06" W) e, *Asio clamator* observada em 17 de novembro de 2018 na vicinal SPV-028 (22°27'18"S, 52°13'06"W). Ambas distante do Parque Estadual do Morro do Diabo (PEMD) cerca de 3 e 6km. Duas das espécies inventariadas, *Bubo virginianus* e *Asio flammeus* constam em listas de fauna ameaçada de extinção, contando com poucos registros no oeste do Estado. Nosso trabalho demonstra a importância de mais estudos ornitológicos na região do Pontal do

Paranapanema, sobretudo no PEMD, demonstrando que 70% dos Strigiformes observados no Estado podem ser encontradas em Teodoro Sampaio. Órgão de fomento financiador da pesquisa: O Pontal do Paranapanema, oeste paulista, abriga 32 municípios, inclusive os que possuem os maiores e mais importantes fragmentos de Floresta Estacional Semidecídua. Desse tipo de vegetação, a referência de área protegida é o Parque Estadual do Morro do Diabo (PEMD), localizado em Teodoro Sampaio, 656 km de distância da capital. O presente trabalho inventariou na região do Pontal do Paranapanema, as espécies de corujas (Strigiformes) através de dados primários de pesquisas realizadas entre os anos de 2015 e 2018, e secundários (literatura). O município com maior quantidade de espécies foi Teodoro Sampaio, representando 75% das corujas presentes no Estado de São Paulo. Foi catalogado por nós, duas espécies em Teodoro Sampaio, *Asio flammeus* e *Asio clamator*, que não estão listadas nos trabalhos de Willis e Oniki realizados na década de 1979 nessa região.. Protocolo CEUA: 35201.

---

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

---

## **INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DA PROTEÍNA MRJP3 EM COLÔNIAS DE ABELHAS TETRAGONISCA ANGUSTULA**

LEONARDO DE OLIVEIRA LOPES  
GABRIEL APARECIDO GODOY RIBEIRO  
ANA PAULA NUNES ZAGO OLIVEIRA

A abelha indígena sem ferrão *Tetragonisca angustula* é uma das espécies mais conhecidas na América Tropical. Por sua capacidade de adaptação, hábitos de nidificação, fáceis localização e manejo, ela é a espécie mais estudada pela academia brasileira. Em abelhas com ferrão, do gênero *Apis*, as operárias nutrizes alimentam suas larvas com geleia real constituída por diversos compostos, dentre eles, a família de proteínas principais da geleia real (MRJPs). Neste conjunto está inclusa a MRJP3, que apresenta alto polimorfismo e é um importante marcador molecular para genotipagem na produção de geleia real em colmeias. A pesquisa pretende aprimorar o melhoramento genético melipona, em razão da inexistência de informações na literatura sobre a possível presença de proteína MRJP3 no alimento larval. Devido a grande variabilidade genética no loco do gene *mrjp3* em *Apis mellifera* africanizadas, foi verificado se colmeias de *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca fiebrigi*, localizadas no Campus II da UNOESTE, também apresentam as MRJPs. Almejamos realizar identificação do genótipo das abelhas rainhas por meio da extração de DNA de abelhas operárias nutrizes para obtenção de genealogia das colônias e encontrar os alelos C, D e E, relacionados com uma melhor produção de geleia real, para que façamos seleção de linhagens. No Campus II, foram coletadas abelhas operárias jovens nutrizes de oito colmeias de *T. angustula* e *T. fiebrigi*, além de operárias de duas colmeias de *Trigona spinipes* e *Nannotrigona testaceicornis*. O DNA foi extraído do tórax e pernas traseiras de operárias, utilizando dois protocolos adaptados: um tradicionalmente utilizado em *Apis mellifera*, descrito por Bardacki e Skibinski (1994), e o outro em *Drosophila melanogaster*, por Gloor (1993). Em seguida, o material genético foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop Lite. Após extração de acordo com os protocolos, o DNA foi amplificado em termociclador por reação de PCR com Taq Platinum DNA Polimerase e primers específicos para o locus *mrjp3* (forward: 5' ATG TAA TTT TGA AGA ATG AAC TTG 3' e reverse: 5' TGT AGA TGA CTT AAT GAG AAA CAC 3'). O material foi submetido a gel de eletroforese, com 2% do volume de agarose, e com tampão TBE 5x, com 60W por 3 a 4 horas. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e as imagens capturadas sob luz ultravioleta. Para estimar o tamanho dos alelos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de bases. De acordo com o marcador molecular de 100 pares de bases e trabalhos anteriores relacionados a essa proteína, é possível perceber a presença de bandas de

MRJP3 e dos alelos C, D e E nas espécies *Tetragonisca angustula*, *T. fiebrigi*, *Trigona spinipes* e *Nannotrigona testaceicornis*. Atualmente, isso não havia sido comprovado em abelhas sem ferrão. São necessários mais estudos para ter maior resultado em relação a isso. Até então, não havia sido relatada a presença da proteína MRJP3 em abelhas sem ferrão. É possível que várias espécies a possuam e, conseqüentemente, produzam geleia real como alimento larval. A presença também pode ser relacionada com o tamanho do abdômen das rainhas e com a diferenciação de castas nas colônias.

---

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019



---

**A ALBUMINA NÃO É UM BOM MARCADOR DE DIAGNÓSTICO E  
ACOMPANHAMENTO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DURANTE O  
TRATAMENTO ANTITUBERCULOSE**

PAULO HENRIQUE GUILHERME BORGES  
GISLAINE DA SILVA RODRIGUES  
AMANDA APARECIDA SILVA DE AGUIAR  
CHRISTIANE MARTINEZ HUNGARO  
ELIANA PERESI LORDELO

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, onde em 2017 atingiu cerca de 10 milhões de pessoas, apresentando alto risco de mortalidade. A fagocitose é a resposta inicial contra o *Mycobacterium tuberculosis*, conduzindo à produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos, que em conjunto com o IFN- $\gamma$  produzido pelas células NK, induz uma intensa resposta inflamatória, com a produção de diversas citocinas como IL-6 e IL-1 $\beta$ , responsáveis por induzir a resposta de fase aguda. A albumina é uma das maiores proteínas que compõe o plasma humano, sendo sintetizada pelo fígado através da forma de pré-albumina, conhecida como biomarcador negativo de fase aguda, e está relacionada com várias situações em nosso organismo, como a regulação da pressão oncótica em processos inflamatórios, nos quais o nível dessa proteína sanguínea encontra-se diminuída no início da doença e tende a aumentar progressivamente conforme o tempo de tratamento. A avaliação de marcadores inflamatórios de fase aguda pode auxiliar no diagnóstico da tuberculose, principalmente em casos de baciloscopia e/ou cultura negativa e/ou biologia molecular, contribuindo para o fechamento do diagnóstico presuntivo de tuberculose, em associação com o histórico clínico-radiológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a albumina como marcador de fase aguda em pacientes com tuberculose durante o tratamento antituberculose e sua associação com parâmetros clínicos, laboratoriais e radiológicos da doença. Foram analisados pacientes com tuberculose, de ambos os sexos, maiores de 18 anos e não portadores de HIV/aids ou qualquer outra doença granulomatosa, recrutados no Ambulatório de Tisiologia do Centro de Saúde Integrado de Presidente Prudente (n=37) entre os anos de 2017 e 2018, em diferentes tempos do tratamento antituberculose: T1 (1 e 2 meses; n=16), T2 (3 e 4 meses; n=11) e T3 (5 e 6 meses; n=10). A dosagem da albumina foi realizada pela técnica de colorimetria e os dados clínicos, laboratoriais e radiológicos dos pacientes obtidos através da análise de prontuários. A comparação entre os diferentes tempos de tratamento antituberculose foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. A análise dos diferentes parâmetros de avaliação da tuberculose (baciloscopia, sintomas e diagnóstico por imagem) e os valores da  $\alpha$ -1 glicoproteína ácida foram calculados pelo teste de

Mann-Whitney. Foram considerados significativos resultados com  $p < 0,05$ . Este trabalho foi aprovado pelo CEP (86694318.8.0000.5515). Os pacientes com tuberculose apresentaram média de idade de 44,84 ( $\pm 15,67$ ) anos, com predominância do sexo masculino (78,37%). Quanto ao diagnóstico, houve predominância da forma pulmonar (70,27%), baciloscopia positiva (64,86%), febre associada a outros sintomas (tosse, fadiga, sudorese noturna e perda de peso) (54,05%) e diagnóstico por imagem sugestivo de TB (43,24%). Os valores de albumina dos pacientes se mantiveram predominantemente dentro dos valores de referência e não houve diferença entre os tempos de tratamento antituberculose. Não foi observada nenhuma associação quanto à avaliação da albumina em diferentes tempos do tratamento antituberculose e os parâmetros clínicos, laboratoriais e radiológicos da doença. A albumina não é um bom marcador de diagnóstico para pacientes com tuberculose e acompanhamento do tratamento antituberculose, entretanto estudos demonstram potencial para a sua dosagem quando associada à proteína C reativa, outra proteína de fase aguda, e a razão PCR/ALB foi descrita como um parâmetro inflamatório-nutricional, podendo ser um indicador de uma resposta inflamatória mais intensa. Para tanto, são necessários trabalhos futuros para determinar a utilidade da razão PCR/ALB na tuberculose. Protocolo CAAE: 86694318.8.0000.5515.

---

---

**ALFA-1-GLICOPROTEÍNA ÁCIDA COMO MARCADOR DE RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA DURANTE O TRATAMENTO ANTITUBERCULOSE**

PRISCILLA YUKARI UENO  
AMANDA APARECIDA SILVA DE AGUIAR  
PAULO HENRIQUE GUILHERME BORGES  
GISLAINE DA SILVA RODRIGUES  
CHRISTIANE MARTINEZ HUNGARO  
ELIANA PERESI LORDELO

A tuberculose consiste em uma doença infecciosa e com evolução crônica e sem um tratamento adequado pode ser fatal, acarretando a cada ano em cerca de 1,3 milhões de mortes. A infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* se inicia a partir do contato com os macrófagos alveolares, ativando o processo inflamatório local, que normalmente induz o recrutamento de linfócitos Th1, grandes produtores de IFN-gamma, citocina que estimula o macrófago a produzir elevadas concentrações de TNF-alfa, para a formação do granuloma, principal resposta protetora contra o bacilo. O processo inflamatório induzido por estas citocinas estimula a síntese hepática e o aumento do nível sérico de proteínas de fase aguda, como a alfa-1-glicoproteína ácida, entretanto os feitos fisiológicos desta proteína de fase aguda são poucos estudados, sendo necessária uma investigação dos efeitos que essa proteína pode causar em diferentes tipos de tecidos. Alguns estudos comprovam a relação da alfa-1-glicoproteína ácida com o processo inflamatório, em casos de artrite reumatoide, câncer e arteriosclerose, mas poucos trabalhos têm associado este marcador à infecção. O estudo de proteínas de fase aguda pode ser útil para identificar bons marcadores de diagnóstico e acompanhamento do tratamento antituberculose, principalmente em casos de baciloscopia e/ou cultura e/ou biologia molecular negativa, contribuindo para o fechamento do diagnóstico presuntivo de tuberculose, em associação com o histórico clínico-radiológico, entretanto, poucos avaliaram o potencial da alfa-1-glicoproteína ácida neste papel. Avaliar a alfa-1-glicoproteína ácida como marcador de resposta aguda em pacientes com tuberculose durante o tratamento antituberculose e sua associação com parâmetros clínicos e radiológicos da doença. Foram analisados pacientes com tuberculose, de ambos os sexos, maiores de 18 anos e não portadores de HIV/aids ou qualquer outra doença granulomatosa, recrutados no Ambulatório de Tisiologia do Centro de Saúde Integrado de Presidente Prudente (n=37) entre os anos de 2017 e 2018, em diferentes tempos do tratamento antituberculose: T1 (1 e 2 meses; n=16), T2 (3 e 4 meses; n=11) e T3 (5 e 6 meses; n=10). A dosagem da alfa-1 glicoproteína ácida foi realizada pela técnica de turbidimetria e os dados clínicos, laboratoriais e radiológicos dos pacientes obtidos através da análise de prontuários. A comparação entre os diferentes tempos de tratamento antituberculose foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste

de Dunn. A análise dos diferentes parâmetros de avaliação da tuberculose (baciloscopia, sintomas e diagnóstico por imagem) e os valores da alfa-1 glicoproteína ácida foram calculados pelo teste de Mann-Whitney. Foram considerados significativos resultados com  $p < 0,05$ . Este trabalho foi aprovado pelo CEP (71989317.6.0000.5515). A avaliação da alfa-1 glicoproteína ácida demonstrou que pacientes com tuberculose avaliados em diferentes tempos do tratamento antituberculose apresentaram a média dos valores dentro da faixa de referência. Quando comparados entre si, foi demonstrado que o grupo T1 apresentou níveis significativamente mais elevados, quando comparados com pacientes do grupo T2 ( $p=0,006$ ), sem diferença em relação ao grupo T3. Também não houve diferença entre os grupos T2 e T3. Quando avaliamos a associação entre os diferentes parâmetros de avaliação da tuberculose (baciloscopia, sintomas e diagnóstico por imagem) e os valores da alfa-1 glicoproteína ácida, não foram observados nenhum valor significativo. Entretanto, a avaliação da baciloscopia demonstrou um resultado interessante, embora não significativo, que pacientes com baciloscopia positiva tinham valores medianos acima dos valores de referência, enquanto pacientes com baciloscopia negativa apresentaram valores dentro da normalidade. A alfa-1 glicoproteína ácida pode ser utilizada como marcador de diagnóstico e monitoramento do tratamento antituberculose, demonstrando potencial para o acompanhamento da melhora do processo inflamatório conforme o tempo de tratamento. Por ser um marcador com possibilidade de dosagem por técnicas bem-conceituadas e de baixo custo, seu uso pode ser indicado para a triagem de pacientes com suspeita de tuberculose nos serviços de saúde pública, sem constituir um aumento significativo de gastos e com o benefício direto para o diagnóstico e acompanhamento do tratamento antituberculose. Protocolo CAAE: 71989317.6.0000.5515.

---

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

---

**POLIMORFISMO IL17A (RS7747909) INFLUENCIA NAS  
MANIFESTAÇÕES DA TUBERCULOSE?**

UALTER GUILHERME CIPRIANO ROSA  
ELIANA PERESI LORDELO  
AMANDA APARECIDA SILVA DE AGUIAR

A tuberculose é uma doença infecciosa de evolução crônica, tendo como agente etiológico a bactéria intracelular *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). A resposta imune frente ao bacilo é complexa, envolvendo diversas citocinas, como a IL-17A, que possui um papel protetor, ativando a inflamação e o recrutamento de leucócitos, como os linfócitos do tipo Th1, essenciais para a formação do granuloma e contenção do bacilo. Polimorfismos de base única (SNPs) são alterações de uma única base na sequência do gene e podem estar presentes nos genes das citocinas, podendo influenciar na quantidade ou na qualidade das respectivas proteínas codificadas, influenciando no desfecho da infecção pelo *M. tuberculosis*. Apesar do papel importante desta citocina no processo infeccioso, poucos estudos têm associado o gene da IL17A com doenças infecciosas, incluindo a tuberculose. Avaliar a associação do SNP IL17A (rs7747909) e com a tuberculose, além da sua relevância funcional na resposta imune contra o *M. tuberculosis*, através da associação com os parâmetros clínicos e radiológicos da doença. Foram avaliados 67 pacientes com tuberculose, maiores de 18 anos, atendidos no Ambulatório de Tisiologia do Centro de Saúde Integrado de Presidente Prudente (n=36) e no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (n=31), ambos no estado de São Paulo. Foram incluídos indivíduos que estavam em tratamento para tuberculose pulmonar ou extra-pulmonar, devidamente diagnosticada, pela presença de BAAR (bacilo ácido álcool resistente) e/ou quadro radiológico e clínico sugestivo de tuberculose em atividade. Foram incluídos indivíduos PVHA constituindo um grupo de 1,5% da população dos pacientes. Foram estudados como controles 55 indivíduos saudáveis, não portadores de tuberculose prévia ou outra doença infecciosa, maiores de 18 anos, recrutados no hemocentro da Santa Casa de Presidente Prudente (n=27) e na Faculdade de Medicina de Botucatu (n=28). A genotipagem do SNP IL17A (rs7747909) foi realizada pela técnica de discriminação alélica em PCR em tempo real. Os dados clínicos e radiológicos dos pacientes foram obtidos através da coleta de prontuário. As análises foram realizadas pelo teste de Fisher, considerando valores significativos  $p < 0,05$ . Houve prevalência do sexo masculino (76,12%) e da forma pulmonar (82%). O alelo G foi mais frequente (76,23%) que o alelo A (23,77%) em todas as amostras estudadas, assim como o genótipo GG (54,92%) e não houve associação quando avaliamos a distribuição dos alelos ( $p=0,4771$ ) e dos genótipos ( $p=0,1528$ ) entre os grupos de estudo. A associação de diferentes genótipos em relação à diferentes

estratificações da severidade da doença não demonstraram associação significativa com os diferentes genótipos em relação à avaliação clínica ( $p=0,5780$ ), presença do *M. tuberculosis* ( $p=0,7551$ ) e do diagnóstico por imagem ( $p=0,4039$ ). Não houve relação significativa de genótipos e alelos do polimorfismo IL17A (rs7747909) com a tuberculose. Houve predominância do alelo G em todos os grupos, e do genótipo GG em quase todas as populações, assim como, a avaliação da severidade da tuberculose não evidenciou associação entre os genótipos e as manifestações que cada categoria apresentou. A predisposição para a tuberculose é influenciada por interações complexas entre agente infeccioso, indivíduo e o meio ambiente, sendo importante averiguar o motivo de apenas alguns indivíduos desenvolverem tuberculose e outros não, já que grande parte da população já entrou em contato com a micobactéria, e não desenvolveu a doença. Desta forma, é necessário continuar a investigar a influência de outros SNPs no gene da IL17A e em outros fatores associados à resposta imune frente ao *M. tuberculosis*. Protocolo CAAE: 79732617.5.0000.5515.

---

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

---

**ANÁLISE DA SEQUENCIA GENICA DE E. COLI ISOLADA DE UM  
SURTO DE DIARREIA EM BEZERROS.**

ROBSON DIEGO SILVA GONCALVES

YARA FELIPPE BUENO CROSCIOLI

ROGÉRIA KELLER

HERMANN BREMER NETO

O Brasil é um dos maiores produtores de carne e leite bovino possuindo o maior rebanho comercial do mundo com 212,8 milhões de cabeças, sendo que desses, 37,3 milhões são de bovinos de leite. O Rio Grande do Sul possui um rebanho de 14,4 milhões de bovinos com cerca de 10% de cabeças destinadas a produção de leite (IBGE 2013). Diversos fatores interferem na cadeia produtiva de bovinos, como determinadas doenças que ocorrem no início da vida dos bezerros e podem interferir no desenvolvimento e produtividade desses animais quando adultos. Em bovinos de corte estas doenças podem levar ao atraso na idade de abate e nos bovinos leiteiros à queda na produtividade leiteira (CAMPBELL et al., 2008). Dentre as principais enfermidades que causam perdas nas fases iniciais do desenvolvimento de bezerros estão a tristeza parasitária bovina (TPB), as pneumonias, as doenças do sistema nervoso central (SNC) e as enterites (ASSIS-BRASIL et al., 2013). Diarreia em bezerros é uma das causas mais comuns e importantes de perdas econômicas na cadeia produtiva de bovinos. As perdas econômicas causadas pela diarreia estão ao redor de 20% a 52%, com custos totais em relação a doenças entéricas equivalentes a US\$ 33,46 bezerro/ano e com mortalidade podendo chegar até 34% (CAMPBELL et al., 2008). Estima-se que mais de 50% das mortes de bezerros estão relacionadas à diarreia (CHO et al., 2013) e a mortalidade de bezerros decorrente de distúrbios entéricos seja cerca de 2% (OLIVEIRA FILHO et al., 2007). Diarreia é um sinal clínico de uma disfunção do trato digestório, caracterizada pelo aumento do número de evacuações ou presença de fezes que podem variar de consistência levemente amolecida até líquida (MILLEMANN, 2009). Existem vários processos envolvidos na fisiopatologia da diarreia, mas os principais deles estão relacionados à secreção/hipersecreção intestinal, má absorção e má digestão de nutrientes. Esses processos podem ocorrer isoladamente ou, mais comumente pela combinação de dois ou mais fatores desses mecanismos (FOSTER; SMITH, 2009). Diarreias secretórias ocorrem devido a estímulos anormais às criptas da mucosa intestinal. Esses estímulos podem ser provocados pela ação de enterotoxinas e/ou ação de mediadores da inflamação como, por exemplo, a prostaglandinas que provocam um aumento da secreção normal, causando um desequilíbrio nos processos fisiológicos de secreção e reabsorção intestinal, levando a diarreia (ARGENZIO, 1985). Quando ocorre um dano na mucosa do intestino, como nos casos de infecções por vírus e protozoários,

há uma alteração na absorção intestinal e decorrência de lesão nas células intestinais, comprometendo a absorção normal dos nutrientes, fluidos e eletrólitos. Nesses casos, não ocorre alteração na secreção intestinal (FOSTER; SMITH, 2009). Nos processos diarreicos, ocorrem perdas de água, nutrientes e eletrólitos, normalmente as perdas de fluidos fecais são de aproximadamente 0,3% do peso corporal. Em casos de diarreias intensas, essas perdas podem atingir 13 a 18% do peso corpóreo em 24h (ARGENZIO, 1985). Bezerros possuem maior concentração de água em seu peso corpóreo e relação a animais adultos, correspondendo a 74% do peso total. Desses, 39% fazem parte do volume intracelular e 35% do ambiente extracelular (VARGAS-JÚNIOR, 2015). Diarreias em bezerros causam redução do volume de água corporal com redução do volume do fluido extracelular e uma pequena expansão do fluido intracelular. Diarreias crônicas podem levar a morte de bezerros devido a importantes perdas de líquidos e eletrólitos (BERCHTOLD, 1999). Os sinais clínicos dos distúrbios entéricos em bezerros são similares, independente da etiologia envolvida no processo. Cita-se como principais sinais clínicos diarreia, perda de peso, desidratação e acidose metabólica (DIEDERICHSEN DE BRITO et al., 2000). A pecuária bovina é um dos principais setores da economia brasileira. O mercado de bovinos tem um valor bruto de produção estimado em 74,38 bilhões neste ano, de acordo com levantamento do Ministério da Agricultura. Além disso, a área deve prosperar bastante nos próximos anos. Segundo projeção do ministério, a produção de carne bovina deve crescer 21% na próxima década, chegando a um volume de 10.236 mil toneladas em 2026 (ABIEC, 2016). O crescimento expressivo está ligado ao número de cabeças de gado do país, que formam o maior rebanho comercial do mundo, com 214 milhões de animais. Só neste ano, foram abatidas 30,6 milhões de cabeças em todo o Brasil, de acordo com dados do IBGE. Outros fatores que tornam o Brasil competitivo no mercado de carne são a diversidade das raças existentes no País e o desenvolvimento genético, que seleciona animais com desempenho superior para a pecuária de corte e a produção leiteira (ABIEC, 2016). A Diarreia representa mais de metade de toda a mortalidade de bezerros, causa perda de água e eletrólitos nos animais, o que resulta em desidratação, desequilíbrios eletrolíticos, acidose metabólica e morte. Os agentes patogênicos mais comuns associados à diarreia em bezerros são Rotavírus, Corona vírus, Salmonella spp., e a componente da microbiota intestinal Escherichia coli (FOSTER; SMITH, 2009). Escherichia coli, a espécie predominante na microbiota anaeróbica facultativa do intestino de animais homeotérmicos, desempenha um importante papel na manutenção da fisiologia intestinal. Alguns isolados são patogênicos e podem causar infecções entéricas (diarreia, disenteria, colite hemorrágica, uremia hemolítica e doença do edema (LEVINE, 1987). Este bacilo apresenta uma natureza tanto patogênica quanto comensal, além de possuir um alto grau de diversidade genética ocasionada por mutações, recombinações e transferências horizontal de DNA (BALDY-CHUDZIK; STOSIK, 2007). O habitat de E. coli é a mucosa intestinal de mamíferos, neste caso a bactéria caracteriza-se por ser um competidor. Entretanto, há isolados de E. coli altamente adaptados, que têm adquirido atributos de virulência específicos que conferem a habilidade de se adaptar a novos ambientes e então causar um grande espectro de doenças. A necessidade de diferenciar entre a E. coli comensal da patogênica levou ao desenvolvimento de ensaios bioquímicos que se tornou a base da taxonomia moderna bacteriana (NATARO; KAPER, 1998). As E. coli podem ser divididas com base na determinação dos seus antígenos superficiais "O" (somático), "K" (capsular) e "H" (flagelar) que por convenção foram identificados por números arábicos colocados em seguida a cada letra do antígeno estudado, permitindo numerosas combinações O:K:H. Esta forma de classificação sorológica se mostrou muito útil nos estudos



epidemiológicos e de patogênese da *E. coli* (ORSKOV; ORSKOV, 1992) & (NATARO; KAPER, 1998). Ainda, a presença destes antígenos em combinações variadas tem permitido estabelecer a correlação de isolados de *E. coli* com algumas doenças, principalmente com as enteropatias. As cepas de *E. coli* consideradas patogênicas podem ser classificadas em grupos ou patotipos de acordo com a produção de fatores de virulência e mecanismos pelos quais causam doença. Foram identificados cinco patotipos de *E. coli* associados à diarreia em bezerros: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC) (LUCENA et al., 2010). Outros patotipos diarreio gênicos para seres humanos, como *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) ainda não foram confirmados como causadores de diarreia em bezerros (LUCENA et al., 2010). Antes da identificação de fatores de virulência específicos de *E. coli* diarreio gênicas, a sorotipagem era o único método disponível para identificar cepas associadas à diarreia. Entretanto a determinação dos sorogrupos e sorotipos de *E. coli* a partir da identificação dos antígenos somáticos, capsulares e flagelares são importantes para a caracterização de isolados associados às infecções e para estudos epidemiológicos (NATARO; KAPER, 1998). Determinados sorogrupos podem ser associados a síndromes clínicas, pois correlacionam-se com certas linhagens virulentas e grupos específicos de *E. coli* diarreio gênicas. Entretanto, a sorotipagem é trabalhosa e realizada por poucos laboratórios, além desses marcadores não serem suficientes para caracterizar uma cepa como diarreio gênica (NATARO; KAPER, 1998). Muito vem sendo feito para prevenir a contaminação precoce dos bezerros com enteropatógenos, tais como: contato mínimo com muitas pastagens, pasteurização de colostro e práticas de controle das doenças (FRANTZ et al., 1987). Vários aspectos importantes da prevenção e tratamento da diarreia referem-se a *E. coli*. A vacinação das vacas antes do parto pode efetivamente fornecer anticorpos contra estirpes de *Escherichia coli* enterotoxigênica prevenindo também a diarreia neonatal (FRANTZ et al., 1987). Para manter a saúde animal, alguns programas sanitários que adotam medidas preventivas como vacinação são impostos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelos órgãos estaduais de defesa sanitária animal (MAPA, 2009). No entanto, nem todas as doenças estão incluídas em programas sanitários. Embora não exista a obrigatoriedade de medidas de controle de algumas doenças, há no mercado vacinas disponíveis para a maioria das enfermidades que acometem os rebanhos bovinos. (MAPA, 2009) A medida que é feita o sequenciamento do genoma de muitas espécies, a genômica comparativa assume grande importância e procedimentos computacionais para correlação entre organismos no nível molecular tornam-se essenciais. Pesquisas comparativas têm sido utilizadas para estudos funcionais do genoma, por exemplo da análise dos genes de bactérias *E. coli* patogênicas e não-patogênicas para identificação de genes relacionados às doenças que estes provocam (SANTOS; ORTEGA, 2003). Frente ao estudo este projeto terá como objetivo analisar a sequência genética obtida da amostra de *E. coli* isolada de surto de diarreia em bezerro com as demais sequências depositadas no GenBank para a procura de genes de virulência que possam ser futuramente utilizados na produção de vacinas. O projeto será continuidade do Projeto: "Análise Genômica da cepa de *Escherichia coli* isolada de surto de diarreia em bezerros" já aprovado no CPDI da Unoeste, com número de protocolo (4317). Sequenciamento da amostra de *E. coli*. O sequenciamento da amostra obtida como descrita no projeto (n. 4317) será realizado pelo sequenciamento de amplicons via NGS (sequenciamento de nova geração) que baseia-se no sequenciamento de amplicons da região V3-V4 do gene ribossomal 16S que será realizado através de

serviço terceirizado pela empresa NEOPROSPECTA pesquisa e consultoria S.A. Análise da sequencia. A sequência genética será analisada com as demais sequencias do Genbank através do programa BLAST Genomes. A análise será realizada de acordo com a assessoria da empresa NEOPROSPECTA a qual realizará o sequenciamento. As sequencias genicas obtidas de prováveis fatores de virulência serão utilizadas futuramente para ensaios fenotípicos e eventualmente utilizados para produção de vacina. Filogenia Quadruplex As amostras (#1 A e #2 A) foram submetidas a pesquisa de genes filogenéticos pela técnica de PCR multiplex e PCR convencional. Foram testados 4 marcadores gênicos no multiplex, onde pelo menos um marcador (TSPE) foi encontrado na cepa da amostra. Figura 1: Mostra o PCR multiplex onde foram testados os marcadores arpA, chuA, yjaA, TSPE. Tabela 2: O esquema abaixo mostra a descrição dos grupos filogenéticos encontrados na amostra. Cepa arpA chuA yjaA TSPE Grupo Amostral

1- Amostra 2 A	+	-	-	+	B1
2- Amostra 2 A	+	-	-	+	B1
3- Amostra 2 A	+	-	-	+	B1
4- Amostra 2 B	+	-	-	+	B1
5- Amostra 2 B	+	-	-	+	B1
6- Amostra 2 B	+	-	-	+	B1
7- Controle C600 (neg)	+	-	+	-	A/C
8- RS861	-	+	+	+	B/2
9- Vazio	-	-	-	-	-

Os resultados encontrados acima mostram que as amostras estudadas pertencem a classificação filogenética para o grupo B1. Dos produtos amplificados por PCR, somente aqueles realizados para detectar os genes Sta, Stx-1, Stx-2 e F5(K99) apresentaram o fragmento correspondente de 190, 555, 118 314 pb respectivamente, como ilustrado na figura 2 no controle positivo, sugerindo ausência desses genes nas amostras estudadas. Nas demais reações (canaleta 15 da figura A em diante e canaletas 2 a 16 da figura B). Não foi observado nenhum fragmento amplificado nos controles positivos, indicando uma falha na reação devendo ser realizada novamente. Uma análise geral dos resultados obtidos neste trabalho permite concluir que EPEC e EIEC apresentam uma diversidade de origem filogenética que se estende muito além do que se conhece atualmente da literatura. Também apresentam marcadores de virulência de ExPEC, mostrando que os mesmos podem estabelecer-se de forma estável em diferentes backgrounds genéticos, aqui simbolizados por diferentes grupos filogenéticos. Possuem marcadores específicos de ilhas patogenicidade isoladas de ExPEC e, mais especificamente E. coli uropatogênicas associadas entres si de forma diversas peculiaridades de cada grupo de cada sorotipo sugerem momentos evolutivos diversos

---

**AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO NASAL DE PROFISSIONAIS DE SAÚDE POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE À METICILINA**

ISABELLA CAROLINA RODRIGUES DOS SANTOS GOES  
VALERIA CATANELI PEREIRA

*Staphylococcus aureus* é considerado um patógeno oportunista e está frequentemente associado às infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar. As infecções causadas por *S. aureus* podem ser agravadas quando essas bactérias apresentam resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento dessas doenças. No ambiente hospitalar, os profissionais de saúde estão sujeitos à colonização por *S. aureus*, na condição de portadores, disseminadores e responsáveis por possíveis surtos de infecção. O Programa Saúde da Família (PSF), atualmente definido como Estratégia Saúde da Família (ESF), tem por finalidade atender as demandas de saúde da população que necessite de um tipo de cuidado menos complexo e podem incluir profissionais colonizados por *S. aureus*. Assim esse trabalho propõe a detecção e caracterização de *S. aureus* resistentes à meticilina isolados de profissionais de saúde atuantes em unidades do Estratégia Saúde da Família (ESF) de um Município do Oeste Paulista. Detecção e caracterização de MRSA isolados de profissionais de saúde em unidades ESF de um Município do Oeste Paulista.

1.1 Aspectos Éticos Trata-se de um estudo prospectivo de corte transversal, cadastrado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa, sob protocolo CAAE (50534015.4.0000.5515). Os participantes da pesquisa foram profissionais da área da saúde de 7 unidades do programa Estratégia Saúde da Família (ESF) de um Município do Oeste Paulista.

1.2 Amostras A obtenção das amostras bacterianas foi realizada no mês de Junho de 2017. As amostras foram isoladas de profissionais da área da saúde de 7 unidades diferentes de ESF de um município do Oeste Paulista, denominadas: ESF 1, ESF 2, ESF 3, ESF 4, ESF 5, ESF 6 e ESF 7. Foram obtidas amostras de 63 profissionais da área da saúde, que aceitaram participar do estudo, cuja as profissões e/ou funções desempenhadas foram classificadas de acordo com o padrão de contato com o paciente exercido na assistência em saúde. Realizaram-se as coletas em funcionários das ESFs, com o auxílio de um swab stuard estéril umedecido com solução salina (0,85%) introduzido nas cavidades nasais, com movimentos circulares delicados por três vezes. Após a coleta o material foi encaminhado ao Laboratório de Microbiologia da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), onde foi semeado em placas de Ágar Baird Parker e incubado em 37°C por 48 horas. Após esse período, as culturas bacterianas foram semeadas em Ágar Manitol, submetidas à coloração de Gram e ao teste de catalase e coagulase para a identificação e diferenciação entre *Staphylococcus aureus* e *Estafilococos Coagulase Negativa* (ECN). Após a identificação fenotípica as amostras foram congeladas a -70°C em caldo nutriente contendo 10% de

glicerol. 1.3 Coleta de dados demográficos e clínicos Após a coleta do espécime microbiológico, foi aplicado questionário aos sujeitos da pesquisa. Tal questionário incluiu: . Dados demográficos (gênero, idade); . Profissão; . Morbidade referida (incluindo doenças crônicas); . Utilização de serviços de saúde (incluindo internações e outros procedimentos nos últimos 12 meses); . Ocorrência de infecções nos últimos 12 meses; . Utilização de antimicrobianos nos últimos 12 meses; . Internação ou outros procedimentos nos últimos 12 meses; 1.4 Extração do DNA Para a extração do DNA bacteriano foi utilizado o Kit Illustra (GE healthcare), seguindo protocolo descrito por Pereira et al[34]. O DNA obtido foi congelado a -20°C. 1.5 Detecção genotípica de *Staphylococcus aureus* Foi realizada a técnica de PCR para a detecção do gene Sa442, específico para *S. aureus*. As reações de PCR foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Martineau et al[35]. Os primers utilizados foram Sa442-1 (5'-AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG-3') e Sa442-2 (5'-CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA-3') e a eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1%, e corado com Brometo de Etídeo. 1.6 Detecção do gene *mecA* pela técnica de PCR As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas conforme parâmetros descritos por Murakami et al[36]. Os primers utilizados foram *mecA1* (AAAATCGATGGTAAAGGTTGG) e *mecA2* (AGTTCTGCAGTACCGGATTTG). A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídeo. Em todas as reações serão utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923). 1.7 Detecção do gene *mecC* pela técnica de PCR As reações de PCR para a detecção do gene *mecC* foram conforme parâmetros de Garcia-Alvarez et al [19]. Os primers utilizados foram *mecC1* (TCACCAGGTTCAAC[Y]CAAAA) e *mecC2* (CCTGAATC[W]GCTAATAATATTTTC). A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídeo. 1.8 Caracterização do SCCmec A determinação do tipo de SCCmec foi realizado em MRSA por PCR multiplex, utilizando os primers se protocolo descritos por Oliveira et al.[37] e modificado por Milheiriço et al.[9]. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2%, corado com Brometo de Etídeo. 1.9 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pela técnica de disco-difusão O teste de sensibilidade à meticilina foi realizado pela técnica da difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo Clinical Laboratory Standards Institute-CLSI [38]. Os discos utilizados foram: Oxacilina (1 ?g) e Cefoxitina (30 ?g), Penicilina (10?g), Eritromicina (15?g), Clindamicina (2?g), Levofloxacina (5?g). A atividade do antimicrobiano foi avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através de interpretação em base das normas estabelecidas pelo CLSI[38,39]. 1.10 Detecção da formação do biofilme em Ágar Vermelho do Congo (CRA) As amostras foram semeadas em Ágar Vermelho Congo e após incubação das placas a 37°C por 24-48 horas, colônias produtoras de biofilme apresentaram coloração negra. Amostras que apresentaram cores vermelhas a bordô foram consideradas sem a capacidade de produzir essa estrutura [40]. 1.11 Detecção dos genes *icaA* e *icaD* As reações de PCR para a detecção dos genes envolvidos na formação do Biofilme foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Arciola et al (2005)[41]. Os primers utilizados foram descritos na Tabela 1. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com Saber Safe. Em todas as reações realizadas, foram utilizadas cepas de referência internacional com controle positivo e negativo, *S. epidermidis* ATCC 35985 (produtora de biofilme) e *S. epidermidis* ATCC 12228. Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR

para detecção dos genes *icaA* e *icaD*. Primer Sequencias de nucleotídeos 5'a 3' Pb  
Produto *icaA1* ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA 669 *icaA* *icaA2* GGA AAT GCC  
ATA ATG AGA AC *icaD1* ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG 198 *icaD* *icaD2*  
CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGCAA Arciola et al.[41]

### 1.12 Análise dos resultados

Os testes de avaliação de sensibilidade e especificidade[42], foram embasados na comparação entre os métodos fenotípicos para detecção de MRSA (disco-difusão com o disco de oxacilina e cefoxitina) e a técnica de PCR, para a detecção do gene *mecA*, padrão ouro na determinação de MRSA. Os testes aplicados para a avaliação de sensibilidade e especificidade foram assim descritos: - Sensibilidade (S): proporção de amostras positivas pela técnica de PCR e que foram positivas nos outros métodos fenotípicos. - Especificidade (E): proporção de amostras negativas pela técnica de PCR e que foram negativas pelos métodos fenotípicos. Para avaliar a concordância dos testes fenotípicos em relação a presença dos gene *mecA*, foi utilizado o teste de análise de concordância - Kappa (k)[43], conforme interpretação de valores: -k < 0: não concordância -k = 0 - 0,19: concordância mínima -k = 0,20 - 0,39: concordância razoável -k =0,40 - 0,59:concordância moderada -k =0,60 - 0,80: concordância substancial -k =0,81 - 1,00: concordância perfeita

O Programa Saúde da Família (PSF), atualmente denominado Estratégia Saúde da Família (ESF) tem como objetivo a desospitalização e o atendimento da população que necessite de cuidados menos complexos. Na qual trabalham diversos profissionais da área da saúde, como médicos, enfermeiros, auxiliar de enfermagem, agente comunitário de saúde entre outros. Os profissionais de saúde consistem em um grupo onde há uma maior probabilidade de colonização por *S. aureus* devido a maior exposição a esses patógenos (21). No presente estudo participaram 63 profissionais de saúde de 7 ESFs do município de Pirapozinho/SP dos quais 75,6% estavam colonizados por *S. aureus*, resultado superior a um estudo realizado com profissionais de saúde de um hospital geral em Minas Gerais, onde apenas 22% dos participantes estavam colonizados, assim como um estudo realizado no Nepal e no Irã onde respectivamente havia 27,13% e 22,7% portadores de *S. aureus*. Um estudo também realizado com profissionais de saúde de um hospital geral de Teresina demonstrou um índice de colonização ainda mais baixo, sendo apenas 1% dos participantes colonizados. Sabe-se que os índices de colonização e os diferentes genótipos das cepas de MRSA, são geograficamente distintos, ou seja, apresentando diferenças de país para país (19, 21), o que podemos observar neste trabalho, já que 69,5% das cepas de *S. aureus* eram MRSA, semelhante a um estudo realizado com profissionais de saúde de Minas Gerais, onde 70% dos participantes que estavam colonizados eram MRSA. Sendo estes, resultados bem superiores a dois estudos realizados na Arábia Saudita onde 21,8% (22) e 18% eram MRSA, e a um estudo realizado no Sudão onde 20,2% eram MRSA, que são dois países geograficamente próximos um do outro. Com relação ao método de identificação das cepas MRSA encontra-se uma diferença de técnica escolhida de país para país (25), por exemplo, um estudo de revisão bibliográfica no Nepal demonstrou que a maioria dos trabalhos utilizava o método de disco difusão em Ágar (25), enquanto os estudos realizados na Arábia Saudita utilizavam o método de PCR para detecção do gene *mecA*. Alguns estudos relatam que a utilização da técnica de disco difusão em Ágar pode ser falha devido a algumas cepas serem hiperprodutoras de penicilinase, causando uma não inibição e uma falha identificação de MRSA (34). Além disso, de acordo com a norma da CLSI de 2016 o método não é mais utilizado. Por isso, neste trabalho foi realizado o PCR para confirmação do gene *mecA*, sendo este considerado o padrão de ouro para a identificação de MRSA. Já com relação aos tipos de SCCmec encontrados o tipo IV foi o mais prevalente com 36,6%, seguido do tipo III com 34,1%, tipo I 24,4%. Resultados

semelhantes a estudos realizado no Irã onde em um deles 70,54% eram do tipo IV (23), e em outro estudo 82% eram tipo III e 6% tipo I (20). Os tipos de SCCmec da comunidade (CA-MRSA) como o tipo IV, costumam ser menos resistentes do que os tipos hospitalares (HA-MRSA), como tipo I e III (36), entretanto não foi o que verificamos neste estudo, já que a resistência a eritromicina para tipos I e III foi 13%, e 30,4% respectivamente e quanto ao tipo IV foi 56,6%. Quanto a clindamicina nenhuma cepa do tipo I foi resistente e do tipo III 25%, já para o tipo IV 75% foi resistente. A única discordância foi com relação a levofloxacina, nenhuma cepa do tipo I foi resistente a este antibiótico, entretanto o tipo III apresentou 75% de resistência e o tipo IV 25%. De acordo com a literatura as cepas de MRSA não são somente resistentes ao  $\beta$ -lactâmicos, mas também a diversas classes de antibióticos, como os aminoglicosídeos, macrolídeos e fluoroquinilonas. (22) No presente estudos as cepas apresentaram resistência a eritromicina (23/29), clindamicina (3/3) e levofloxacina (3/3). A eritromicina pertence a classe dos macrolídeos, a levofloxacina a classe das fluoroquinilonas, já clindamicina pertence a classe da lincosaminadas e seu mecanismo de ação é semelhante ao dos macrolídeos, podendo gerar resistência cruzada (34, 35). Esses resultados corroboram com um estudo realizado com pacientes de um Hospital Geral na Arábia Saudita, onde as cepas de MRSA eram resistentes as mesmas classes de antibióticos (22). Um estudo realizado no Nepal apresentou a maioria (2/3) das cepas MRSA também resistentes a eritromicina e clindamicina (24). Com relação à função desempenhada pela população de estudo, observou-se que os maiores índices foram dos auxiliares odontológicos, dentistas, farmacêuticos, e enfermeiros (100%), seguidos dos agentes comunitários de saúde (81%), atendente de farmácia (75%) e auxiliar de enfermagem (73%). Assemelhasse ao encontrado por Linardi (33) onde os enfermeiros apresentaram 71,4% de colonização, e funções não diretamente ligadas aos pacientes um índice acima de 50%. Esses resultados demonstram que as cepas de MRSA não se encontram em apenas uma área dentro das ESFs, e além disso os profissionais de saúde também não estão confinados em áreas específica, podendo carrear *S. aureus* para outros locais (26). Além disso, o maior índice de cepas CA-MRSA e suas evidências na literatura, demonstram que a população saudável e suas casas tornaram-se também um possível reservatório para cepas MRSA (30). Por isso é de extrema importância que os profissionais de saúde, estejam sempre atentos as medidas de biossegurança. Diante disto é de suma importância que os profissionais de saúde entendam a diferença entre colonização, quando há a presença de *S. aureus* assintomática em pessoas saudáveis, e a infecção propriamente dita, visto que a colonização persistente pode tornar estes profissionais de saúde um reservatório para a transmissão de *S. aureus* (21), além de ser um importante fator de risco para uma infecção (22). Sendo assim é necessário realizar medidas profiláticas, que envolvem a higienização correta das mãos, podendo inicia-ser com uma simples lavagem das mãos, sendo está uma medida efetiva (25). Um estudo realizado em Teresina, demonstrou que o álcool gel para a higienização das mãos de profissionais da saúde mostrou-se eficiente em 70% dos casos (32), sendo uma boa alternativa para evitar a contaminação. Um estudo realizado Rio de Janeiro, demonstrou também a eficácia do álcool em gel para a descolonização de estetoscópios sendo que 71,44% dos estetoscópios apresentaram uma descontaminação após o uso do álcool gel (29), demonstrando assim a importância das medidas profiláticas de higienização para fim de evitar a colonização por *S. aureus*. Além disso, os profissionais de saúde devem estar cientes das medidas de biossegurança, como a utilização correta dos Equipamento de Proteção Individual (EPIs) a troca de luvas, e utilização de jaleco somente no ambiente de trabalho, tendo a consciência de que trabalham para melhorar a saúde da população, mas que também podem funcionar como transmissores desses

patógenos. Protocolo CAAE: 50533401.5.4000.5515.

---

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

---

**AVALIAÇÃO DA INFLUENCIA DE CONDIÇÕES ADVERSAS NA  
FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE MICROBIANOS EM BRÁQUETES  
ORTODÔNTICOS METÁLICOS.**

KEROLAYNE PEREIRA FLORÊNCIO

1. INTRODUÇÃO 1.1. Biofilmes O primeiro relato dos biofilmes foi no século XVII quando Anton Von Leeuwenhoek quando observou agregados microbianos (agora conhecido por serbiofilmes) em raspados de placa bacteriana dos dentes. Entretanto, apenas em 1978 o termo biofilme foi consolidado (CHANDKI et al., 2011 GUPTA et al., 2015). Biofilme pode ser definido como uma comunidade de microrganismos organizado que vivem imergidos em uma matriz de substâncias poliméricas produzidos por eles. Estes microrganismos podem ser encontrados em quase todos os ambientes aderidos em superfícies do tipo bióticas e abióticas (GUPTA et al., 2015; PLESZCZYNSKA et al., 2016). A composição dos biofilmes pode ser bastante diversificada. Os biofilmes podem ser formados por comunidades microbianas homogêneas ou heterogêneas. A matriz de polímero extracelular substâncias (EPS) é formada principalmente por polissacarídeos, mas outras biomoléculas tais como proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos também podem estar presentes (GUPTA et al., 2015; TELES, TELES; 2009). Os biofilmes podem ser organizados em monocamadas ou em múltiplas camadas, dependendo da interação entre a superfície e as células constituintes. A força de repulsão da superfície das bactérias é uma característica fundamental na estruturação do biofilme. A formação das multicamadas no biofilme está relacionada com o tipo de microrganismo que é o constitui, e em muitas vezes a força de repulsão entre os microrganismos deve ser neutralizada. Entretanto, em um biofilme de camada única é observado que as interações entre células e de superfície são mais proeminentes que as interações entre as células constituintes (GUPTA et al., 2015; SADEKUZZAMAN et al., 2015). A formação de um biofilme é um processo complexo e possui fases distintas. O crescimento de biofilme é guiado por uma série de processos biológicos, físicos, químicos e se desenvolve por meio de cinco etapas: adesão inicial reversível, adesão irreversível, crescimento, maturação fase e dispersão (GUPTA et al., 2015; MARSH, 2006; ZIJNGE et al., 2010). Os biofilmes tem despertado uma crescente preocupação devido à sua natureza ubíqua e por ser difícil de erradicá-los. A presença de biofilmes tem sido relacionada com implantes médicos e cateteres urinários. Além disso, muitas doenças têm sido relacionadas com a presença de células na forma de biofilmes como a endocardite, fibrose cística, periodontite, rinosinusite e osteomielite. O estudo da formação básica de um biofilme, o processo de sinalização entre as células e a descoberta de possíveis mecanismos de resistência aos medicamentos nesta estrutura é muito importante para que sejam desenvolvidas técnicas para sua erradicação de maneira eficaz (GUPTA et al., 2015). 1.2. Influência dos



biofilmes microbianos na saúde bucal A cavidade oral é um ambiente aberto que oferece diversos habitats para várias espécies de microrganismos. A capacidade de aderir às superfícies dos dentes e se multiplicar em locais, como bolsas periodontais e fendas de dentes é um fator primordial na formação do biofilme oral, também conhecido por placa dental (MARSH, 2006; ZIJNGE et al., 2010). A presença do biofilme oral é a principal causa de duas doenças orais mais comuns: cárie dentária e doença periodontal. A formação de placa dental é um processo complexo que envolve a participação de vários componentes salivares. Para o seu desenvolvimento é necessário uma colonização inicial da cavidade oral por um microrganismo comensal. Apesar da maioria dos organismos comensais serem benéficos a saúde humana, alguns também podem ser patogênicos (NIKITKOVA et al., 2013). Uma grande diversidade de microrganismos já foi observada na cavidade oral. Os principais agentes envolvidos nos estágios iniciais de formação de biofilmes subgingival são *Actinomyces* e *Streptococcus*, enquanto que na etapa de maturação podem ser encontrado *Porphyromonas gingivalis*, *Tannarella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus (Aggregatibacter) actinomycetemcomitans* (RODE et al., 2012; CARDOSO et al., 2012; NIKITKOVA et al., 2013). As bactérias do grupo *Streptococcus* são pioneiras em colonizar a cavidade oral e são as mais abundantes na placa dentária. Elas estão envolvidas na colonização dos dentes recém-erupcionados, por anexarem a película salivar nos dentes recentemente limpos e por favorecer a colonização do biofilme por outras espécies. Muitos estudos relatam que *Streptococcus* do grupo viridans, principalmente a grupos *S. salivarius* e *S. mitis* estão associados com a saúde bucal, enquanto a espécie *Streptococcus mutans* está associada com a cárie dentária (CARDOSO et al., 2012 NIKITKOVA et al., 2013). Os *Streptococcus mutans* são acidogênicos e acidúricos. Estas características favorecem a formação de grande quantidade de biofilme dentário, e permitem a produção de ácido, mesmo na ausência de fontes exógenas de sacarose (CARDOSO et al., 2012 NIKITKOVA et al., 2013). Os biofilmes não calcificados podem ser removidos por adoção de higiene oral de rotina ou com o auxílio profissional de um dentista. A calcificação do biofilme dentário faz com que ele se transforme em cálculo dentário tornando a sua remoção ainda mais difícil. Assim, os biofilmes representam um grande desafio para o seu controle clínico e erradicação de doenças associadas ao biofilme como a cárie dentária e doença periodontal (CHANDKI et al., 2011).

1.3. Controle e remoção dos biofilmes Embora o biofilme dental não possa ser completamente eliminado, sua patogenicidade pode ser diminuída por meio de medidas de higiene oral eficaz. Escovação diária, limpeza interdental, e o uso de quimioterápicos antimicrobianos tópicos são algumas das estratégias que o paciente pode realizar para reduzir o biofilme bacteriano que resultam em cárie dental, gengivite e doenças periodontais (GURENLIAN, 2007). Estudos relatam que a remoção do biofilme oral somente por meio do método mecânico é ineficiente. A dificuldade em controlar a placa dental por métodos mecânicos levou os cientistas a procurarem agentes antimicrobianos químicos que poderiam ajudar a inibir a formação de biofilmes na superfície dos dentes (TELES, TELES; 2009).

2. JUSTIFICATIVA As doenças orais são conhecidas por serem multifatoriais. A presença da placa dentária é conhecida como um dos fatores etiológicos mais importantes. Este fato motiva os profissionais envolvidos com a saúde bucal em buscar uma solução eficaz contra os biofilmes (CHANDKI et al., 2011; MEZZARI et al., 2012). Os biofilmes são difíceis de localizar, remover e possuem uma grande capacidade adaptativa para criar um ambiente próprio. Ainda hoje, o controle da formação dos biofilmes orais é realizado mecanicamente por meio da escovação eficiente e auxiliares de limpeza dental por serem de fácil acesso e baratos (CHANDKI et al., 2011;

MEZZARI et al., 2012). Relatos da literatura demonstram que os indivíduos usuários de aparelhos ortodônticos retêm mais biofilme dental nos elementos constituintes destes aparelhos em comparação com aqueles que não os usam (CORGHI et al., 2014; MEZZARI et al., 2012). O biofilme pode ser controlado por meio dos métodos mecânico e químico; entretanto o mais eficiente é a ação conjunta dos métodos de higienização, a fim de obter um controle mais adequado do biofilme (CORGHI et al., 2014; MEZZARI et al., 2012; CARDOSO et al., 2012; MARINHO et al., 2007). Entre os compostos químicos ativos mais utilizados em antisépticos bucais temos a clorexidina, cloreto de cetilpiridíneo e triclosan, além de óleos essenciais. A clorexidina é um dos biocidas mais utilizados em formulações anti-sépticas, é uma biguanida catiônica que age principalmente sobre bactérias Gram-positivas. Diante deste contexto, fica demonstrada a importância de estudos que aprofundem o conhecimento sobre condições adversas que influenciam a fisiologia dos biofilmes orais formados em bráquetes metálicos ortodônticos, uma vez que a remoção do biofilme dentário é um fator importante na prevenção da cárie dentária e da doença periodontal. Avaliar a influência de condições adversas na formação de biofilmes de *S. mutans* em bráquetes ortodônticos metálicos.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1. Preparo da cultura bacteriana

Para a avaliação da adesão microbiana em bráquetes foi utilizada *Streptococcus mutans* ATCC 25175 pertencente a coleção de bactérias da Universidade do Oeste Paulista. Onde se preparou uma suspensão da cepa teste em solução salina estéril, a qual foi padronizada de acordo com o tubo 0,5 da Escala Mc Farland correspondendo à concentração de aproximadamente  $1,5 \cdot 10^8$  Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL).

##### 4.2. Adesão microbiana em bráquetes ortodônticos

A aderência bacteriana foi avaliada em bráquetes ortodônticos metálicos. Os bráquetes foram autoclavados (121°C, 20 min.) previamente à realização do experimento. Em tubos de microcentrifuga foram adicionados três bráquetes, mais 1 mL de meio de cultivo (Tabela 1) e também foi adicionado 100 µL de inóculo bacteriano preparado conforme o item 4.1. Este processo foi realizado em triplicata para cada meio de cultivo (Tabela 1). Os tubos foram incubados na estufa bacteriológica por 24h/37°C, em microaerofilia. Condições avaliadas como potenciais interferentes da adesão microbiana em bráquetes ortodônticos: Controle (BHI); BHI + 10% sacarose; BHI pH 5,0; BHI + 10% NaCl; BHI + 10% enxaguatório bucal A; BHI + 10% enxaguatório bucal B; BHI + 10% enxaguatório bucal C; Tocoferol 10%. Após o tempo de incubação o meio que continha junto ao bráquete foi retirado e desprezado. Para cada tubo de microcentrifuga com meio foi preparado seis tubos com salina autoclavadas, um tubo com salina é utilizado para lavagem do bráquete e o restante para realizar a diluição. O bráquete foi transferido para um microtubo de centrifugação com 1mL de salina autoclavada para lavagem. Após a lavagem o bráquete foi transferido para outro tubo de salina para dar início à diluição. O tubo foi agitado por 1 minuto em agitador eletrônico a 250rpm. A partir desta suspensão foi realizada diluição decimal. Realizada a diluição, em placas de BHI foram adicionadas uma alíquota de 0,1mL de cada diluição inoculada. As placas foram incubadas a 37°C por 48h em microaerofilia, lembrando que todo o experimento foi realizado em triplicata. Após o tempo de incubação foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) (BABONI 2008; SOUZA et al., 2013). Biofilme pode ser definido como uma comunidade de microrganismos organizados que vivem imersos em uma matriz de substâncias poliméricas produzidos por eles. A formação de um biofilme é um processo complexo e possui fases distintas. A capacidade de aderir às superfícies dos dentes e se multiplicar em locais, como bolsas periodontais e fendas de dentes é um fator primordial na formação do biofilme oral, também conhecido por placa dental. *Streptococcus mutans* é um dos principais

microrganismos responsáveis pelo biofilme oral. A presença do biofilme oral é a principal causa de duas doenças orais mais comuns: cárie dentária e doença periodontal. Escovação diária, limpeza interdental, e o uso de quimioterápicos antimicrobianos tópicos são algumas das estratégias que o paciente pode realizar para reduzir o biofilme bacteriano que resultam em cárie dental, gengivite e doenças periodontais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de condições adversas na formação de biofilmes de *S. mutans* em bráquetes ortodônticos metálicos. Dentre as condições adversas foi avaliada a influência da sacarose 10%, cloreto de sódio 10%, pH 5,0, enxaguatórios bucais 10 % e tocoferol 10 % em alterar a formação de biofilmes por *Streptococcus mutans*. Para adesão microbiana foi utilizada *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a qual foi padronizada com a Escala Mc Farland 0,5. A aderência bacteriana foi testada em bráquetes ortodônticos metálicos acondicionados em meio de cultivo nas condições previamente descritas por 24h/37°C. Após a incubação foi realizada a contagem padrão em placa das células aderidas. Os resultados obtidos demonstraram que apenas pH 5,0 foi capaz de reduzir a formação de biofilmes por *S. mutans* em bráquetes metálicos ( $p < 0,05$ ). Os dados apontam que a formação dos biofilmes por *S. mutans* sofrem pouca influência pelas condições adversas testadas, demonstrando o potencial deste microrganismo em causar prejuízos na saúde bucal. Dentre as condições estudadas, apenas a presença de pH 5,0 reduziu significativamente as células aderidas, entretanto, esta condição aplicada in situ poderá acarretar em desmineralização do esmalte do dente. Desta forma, deve ser estimulados estudos sobre a fisiologia da formação dos biofilmes por *S. mutans* para o desenvolvimento de novas medidas de controle e prevenção da formação do biofilme. Biofilme pode ser definido como uma comunidade de microrganismos organizados que vivem imergidos em uma matriz de substâncias poliméricas produzidos por eles. A formação de um biofilme é um processo complexo e possui fases distintas. A capacidade de aderir às superfícies dos dentes e se multiplicar em locais, como bolsas periodontais e fendas de dentes é um fator primordial na formação do biofilme oral, também conhecido por placa dental. *Streptococcus mutans* é um dos principais microrganismos responsáveis pelo biofilme oral. A presença do biofilme oral é a principal causa de duas doenças orais mais comuns: cárie dentária e doença periodontal. Escovação diária, limpeza interdental, e o uso de quimioterápicos antimicrobianos tópicos são algumas das estratégias que o paciente pode realizar para reduzir o biofilme bacteriano que resultam em cárie dental, gengivite e doenças periodontais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de condições adversas na formação de biofilmes de *S. mutans* em bráquetes ortodônticos metálicos. Dentre as condições adversas foi avaliada a influência da sacarose 10%, cloreto de sódio 10%, pH 5,0, enxaguatórios bucais 10 % e tocoferol 10 % em alterar a formação de biofilmes por *Streptococcus mutans*. Para adesão microbiana foi utilizada *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a qual foi padronizada com a Escala Mc Farland 0,5. A aderência bacteriana foi testada em bráquetes ortodônticos metálicos acondicionados em meio de cultivo nas condições previamente descritas por 24h/37°C. Após a incubação foi realizada a contagem padrão em placa das células aderidas. Os resultados obtidos demonstraram que apenas pH 5,0 foi capaz de reduzir a formação de biofilmes por *S. mutans* em bráquetes metálicos ( $p < 0,05$ ).

## **CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE E. COLI ISOLADA DE CASO DE DIARREIA EM BEZERROS**

YARA FELIPPE BUENO CROSCIOLI  
ROBSON DIEGO SILVA GONCALVES  
ROGÉRIA KELLER  
HERMANN BREMER NETO

Surtos de diarreia são comuns em fazendas brasileiras, sendo a maior responsável desse quadro a bactéria *Escherichia coli*. Tais distúrbios entéricos geram perda econômica para os produtores de leite e carne. A diarreia em bezerros é resultante da interação de diversos fatores como imunidade do animal, ambiente de criação, nutrição do bezerro e micro-organismos patogênicos sendo os cuidados e proteção maiores na primeira semana de vida devido a elevada susceptibilidade do bezerro a infecções. Estima-se, mundialmente, que a perda econômica causada por diarreia esteja entre 20% a 52% tendo custo aproximado de US\$33,5 de animais leiteiros ao ano podendo a mortalidade chegar a 34%. Surtos de diarreia têm sido presentes em diferentes fazendas brasileiras sendo uma destas presente na região do Oeste Paulista e objetivada nesse estudo. Dentre as safras de 2016 - 2018 a fazenda estudada teve uma perda econômica de R\$162.186,00 representante da morte de 106 e tratamento de 793 cabeças de bezerro. À necropsia foram observadas congestão da mucosa intestinal, espessamento da mucosa intestinal, espessamento da mucosa do intestino delgado e congestão pulmonar. A amostra em questão foi identificada como *E.coli* e foi encaminhada para nós para a realização desse estudo. O trabalho tem como justificativa evitar a perda econômica de bezerros neonatos. Os objetivos do trabalho consistem em realizar a análise e caracterização da amostra de *E. coli* isolada do surto de diarreia em bezerros de uma fazenda do oeste paulista através do re-isolamento e identificação bioquímica, avaliação da produção de alfa-hemolisina e identificação do perfil de resistência a drogas antimicrobianas. (Protocolo no SGP: 4480) A amostra de *E. coli* foi re-isolada em ágar MacConkey e, as colônias foram submetidas aos testes bioquímicos convencionais (TSI, Citrato, SIM, Fenilalanina, Lisina) para a confirmação do enteropatógeno. Em seguida, realizou-se o teste de produção de hemolisinas com cultivo em ágar sangue de carneiro a 5% e teste de sensibilidade a antimicrobianos através da difusão em disco. Os testes bioquímicos das amostras isoladas das fezes de bezerros diarreicos apresentaram os seguintes resultados: TSI A/A; Citrato negativo, produção de H<sub>2</sub>S negativa, Motilidade positiva, Produção de gás Indol positiva, Fenilalanina negativa, Lisina positiva e produção de Gás, além das colônias serem fermentadoras de lactose. Sendo a amostra confirmada bioquimicamente como *E. coli*. A amostra foi negativa para avaliação da produção de hemolisinas. A bactéria foi caracterizada como resistente aos antibióticos Penicilina, Cloranfenicol e Tetraciclina, Ampicilina, Sulbactam e

Gentamicina. Concluiu-se que a amostra isolada desse surto se trata de E. coli com múltipla resistência a drogas antimicrobianas. Testes adicionais para a caracterização do perfil de virulência dessa E. coli deverão ser realizados para uma melhor compreensão dos potenciais fatores de virulência dessa amostra.

---

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

## **DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCICAS EM ISOLADOS DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS**

GIOVANA DO NASCIMENTO PEREIRA

RAFAEL DA SILVA ROSA

DIEGO JUNIOR SANTOS GONCALVES

VALERIA CATANELI PEREIRA

A cozinha piloto é um departamento beneficiado pelo Programa Nacional de Alimentação Escolar onde as refeições são preparadas e posteriormente distribuídas para as escolas municipais. Além dos aspectos nutricionais, as condições higiênico-sanitárias são essenciais para a proteção e promoção da saúde dos estudantes, uma vez que a incidência de Doenças Transmitidas por Alimentos tem crescido mundialmente de modo a serem consideradas um problema de saúde pública preocupante. A contaminação por origem bacteriana é uma das fontes que contribui para a alta incidência de doenças veiculadas por alimentos, sendo que a ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas nos alimentos está envolvida em grande maioria dos casos. O presente estudo teve como objetivo a identificação de espécies de *Staphylococcus* isolados de profissionais de cozinhas piloto localizadas em municípios do Oeste Paulista, assim como a detecção molecular dos genes das enterotoxinas estafilocócicas clássicas. Foram realizadas duas coletas, onde ocorreu a identificação fenotípica através da coloração de Gram, catalase e coagulase e identificação genotípica pela amplificação do gene Sa442 através da PCR convencional, método que também foi utilizado para detecção dos genes de enterotoxinas clássicas. Foram obtidas 52 amostras bacterianas e identificadas 49 (98%) como *S. aureus*. Em relação a presença do genótipo para produção de enterotoxinas, observou-se positividade em 48 amostras, onde o gene sea apresentou uma frequência de 92%, o seb 16%, o sec 40% e o sed 32%. O estudo demonstrou alta prevalência de *S. aureus* em amostras de fossas nasais e inferior das unhas de manipuladores de alimento de cozinhas piloto e maior frequência dos genes sea e sec-1, além da detecção do gene seb. Dessa forma neste ambiente de manipulação de alimentos as medidas de biossegurança devem ser priorizadas, visto que há risco de contaminação alimentar e este pode ser aumentado devido ao acúmulo de funções. Protocolo CAAE: 59635316.6.0000.5515.

---

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

## **DETECÇÃO FENOTÍPICA DE BIOFILME POR STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE MANIPULADORES DE ALIMENTO**

RAFAEL DA SILVA ROSA  
GIOVANA DO NASCIMENTO PEREIRA  
DIEGO JUNIOR SANTOS GONCALVES

As cozinhas piloto são responsáveis por elaborar e distribuir refeições em todas as escolas públicas. Porém, esses alimentos estão sujeitos à contaminação bacteriana através das falhas de higienização dos manipuladores de alimentos. Por fazer parte da microbiota humana, as bactérias do gênero *Staphylococcus* são um dos agentes patogênicos mais frequentes encontrados nesse ambiente, já que esses funcionários podem facilitar a disseminação dessas bactérias aos alimentos e superfícies tornando-se fontes potenciais para a formação de biofilme. O estudo tem como objetivo fazer uma avaliação microbiológica dos funcionários da cozinha piloto de Regente Feijó, a fim de caracterizar a presença de *S. aureus* nas fossas nasais e na parte inferior das unhas desses funcionários e determinar fenotipicamente a produção de biofilme dessas amostras. O estudo foi aprovado pelo CEP com Protocolo CAAE: 59635316.6.0000.5515 da Plataforma Brasil. Foram coletadas amostras das unhas e narinas de 13 profissionais de uma cozinha piloto de um município do Oeste Paulista. As amostras foram identificadas através dos seguintes métodos fenotípicos: Coloração de Gram, catalase e coagulase para determinação de *S. aureus* e *Estafilococos* coagulase negativas (ECN) e também submetidas a testes de adesão em tubos de borossilicato e ágar vermelho Congo (CRA) para verificar a produção de biofilme. Das 26 amostras coletadas, 22 eram *Staphylococcus*, confirmadas pelo crescimento em Ágar Baird Parker, meio de cultura seletivo para bactérias desse gênero e 4 amostras isoladas das unhas não houveram crescimento. De acordo com a identificação fenotípica, apenas 22,73% eram *S. aureus* e os outros 77,27% bactérias (ECN). Com relação à detecção de biofilme, o CRA constatou crescimento em 95,65%, já a aderência em tubos de borossilicato foi verificada em 50% e foram classificadas de acordo com o nível de aderência onde 45,44% foram fracos aderentes, 36,36% médios aderentes e 18,18% fortes aderentes. O método que mostrou melhores resultados na detecção de biofilme foi o CRA. Os dados apontam que todos profissionais que atuam na cozinha piloto estão colonizados por *S. aureus* e ECN com capacidade de produção de biofilme, o que pode dificultar a remoção dessas bactérias do ambiente e auxiliar na disseminação de bactérias patogênicas que podem contaminar o alimento, enfatizando a importância das normas de biossegurança nesses locais. Protocolo CAAE: 59635316.6.0000.5515.





---

**CARACTERIZAÇÃO DO SOROGRUPO O DE AMOSTRAS DE  
ESCHERICHIA COLI ISOLADAS DE CRIANÇAS COM DIARREIA**

DAIANY RIBEIRO PAZ DE LIRA  
GABRIELA SUMICO AFONÇO HANAMOTO  
INAE DE OLIVEIRA GARCIA  
MELISSA DE SOUZA SILVA  
IRANILDO DO AMARANTE FERNANDES  
LUCAS JOSE DA COSTA  
ROGÉRIA KELLER  
HERMANN BREMER NETO  
ROBSON DIEGO SILVA GONCALVES

A *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo anaeróbico facultativo que coloniza o trato gastrointestinal e pode provocar diarreia em seu hospedeiro. As doenças diarreicas são um problema sério de saúde pública e a segunda maior causa de mortalidade infantil, especialmente em países em desenvolvimento. A *E. coli* diarreiogênica (DEC) é classificada de acordo com o antígeno O. Estes antígenos são importantes fatores de virulência e altamente imunogênicos, apresentam especificidade antigênica única para cada cepa, além disso, servem como biomarcadores para a identificação dos O-types, pois constituem o lipopolissacarídeo (LPS) no envelope celular. O objetivo do presente estudo, é caracterizar o sorogrupo dos patótipos de *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC), de crianças com diarreia, com até 5 anos de idade, residentes nas regiões da Alta Paulista e do Oeste Paulista, São Paulo, Brasil. Este estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. Foram estudadas 101 amostras de *E. coli* obtidas de crianças menores de 5 anos de idade com diarreia, moradoras das regiões da Alta Paulista e do Oeste Paulista do Estado de São Paulo, no período entre 2018 e março de 2019. Essas amostras, anteriormente, foram doadas de laboratórios de análises clínicas e já faziam parte da coleção de bactérias estocadas a -20° C e a -80° C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNOESTE, portanto não foi necessária análise do Comitê de Ética em Pesquisa (TCLE) A identificação dos antígenos somáticos (O) foi realizada por testes de aglutinação em laminas com antissoros específicos anti-soros O26, O28, O29, O55, O86, O111, O112, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, O157 e O158, PROBRAC do Brasil. Das 101 amostras testadas, o sorogrupo mais prevalente foi o O158 com 10 (10%) amostras, o segundo mais prevalente foi O55 com 9 (9%) e em terceiro lugar foi a O86 com 7 (7%). Obtivemos 6 (6%) sorogrupadas como O112 e 6 (6%) de O125, 5 (5%) O142, 4 (4%) de O28, 4 (4%) O111, 4 (4%) O114 e 4 (4%) O126. 3 (3%) aglutinaram sem o soro, portanto, são classificados como rugosa. Além disso, 1 (1%) das amostras testadas pertencem ao grupo O29, O119, O127

e O128. Das amostras testadas 35 (34%) não reagiram com os soros disponíveis no laboratório. As amostras estudadas foram sorogrupadas e pertencem a categorias tanto de EPEC e STEC, quanto de EAEC. No entanto para classifica-las definitivamente essas amostras dentro das categorias de DEC estudos futuros precisam ser realizados, tais como o padrão de adesão as células epiteliais, fatores de virulência e determinação do antígeno H, os quais estão sendo realizados em nosso laboratório.

---

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

---

**DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME E DA  
SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS POR  
STAPHYLOCOCCUS ISOLADOS DE PACIENTES COM RINOSSINUSITE  
CRÔNICA**

THAÍSA PICHININI DE SOUZA  
ANDRESSA CORTES CAVALLERI  
VALERIA CATANELI PEREIRA

**Introdução** As bactérias do gênero *Staphylococcus* são encontradas comensalmente na pele, nasofaringe, trato digestivo e trato urogenitário. O destaque, porém, é para as fossas nasais e orofaringe, que são consideradas os principais sítios pela bactéria *Staphylococcus aureus*, que mesmo sendo parte da microbiota saudável do indivíduo, podem produzir infecções oportunistas, devido a capacidade de produção de fatores de virulência (LINA et al., 2003). Durante a colonização nasal, *S. aureus* pode estimular uma resposta inflamatória com a produção local de imunoglobulinas E (IgE). Essa resposta inflamatória estão associadas às rinossinusites, que são doenças inflamatórias dos seios paranasais e cavidades nasais, que podem apresentar poliposes nasais (KIM; CHO, 2017). Para uma efetiva colonização de *S. aureus* na cavidade nasal, a bactéria deve ser capaz de produzir substâncias associadas a adesão, como o biofilme, que é definido como uma interação complexa de microrganismos incorporados em uma matriz extracelular de polissacarídeo, proteínas e ácido nucleico (MOLLOY, 2012), que confere proteção aos microrganismos envolvidos e lhes permitem fugirem do sistema imune do hospedeiro durante a infecção (DE OLIVEIRA et al., 2016). Considerando que as rinossinusites são de difícil tratamento devido às inúmeras recorrências, é de grande importância determinar os fatores de colonização e permanência de estafilococos em pacientes com rinossinusites crônicas. **Objetivos** Identificar estafilococos em amostras nasais de pacientes com rinossinusite crônica e detectar a produção do biofilme e a susceptibilidade aos antimicrobianos por esses microrganismos. **Materiais e métodos** Este estudo está vinculado ao trabalho " Investigação de imunodeficiência e caracterização de *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* em pacientes com rinossinusite crônica em um serviço de referência no Estado de São Paulo", (cpdi: 4785) já aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa sob protocolo CAAE 91934418.3.0000.5515, responsável pela coleta das amostras bacterianas e obtenção dos dados clínicos. Foram estudadas bactérias isoladas das cavidades nasais e orofaringe de trinta e quatro pacientes, com 18 anos ou mais, atendidos no ambulatório de otorrinolaringologia do Hospital Regional de Presidente Prudente/SP (HR), diagnosticados previamente com RSC (diagnóstico clínico, tomográfico e endoscópico). Foram excluídos da pesquisa aqueles que fizeram uso de antibióticos até um mês antes da data da coleta, pacientes menores de 18 anos e que apresentaram diagnóstico prévio

de imunodeficiência primária ou adquirida. As amostras bacterianas foram analisadas no Laboratório de Microbiologia, situado no Campus 1 da UNOESTE, Presidente Prudente/SP, onde foram inoculadas em Ágar sangue de carneiro mantidas por 24 h a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após o crescimento das colônias, as amostras foram coradas pelo método de GRAM e submetidas ao teste de catalase para diferenciação dos gêneros *Staphylococcus* (Gram positivos e catalase positiva) e *Streptococcus* (Gram positivos e catalase negativa). Os isolados de *S. aureus* serão congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  em caldo nutriente contendo 10% de glicerol. Os estafilococos foram semeados em Ágar Vermelho Congo para a verificação da produção de biofilme. Após incubação das placas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24-48 horas, colônias produtoras de biofilme apresentaram coloração negra. (FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989). Os estafilococos foram testados quanto a susceptibilidade aos antimicrobianos, em Ágar Mueller Hinton, utilizando os seguintes discos: oxacilina, cefoxitina, amoxicilina com ácido clavulânico, penicilina, tetraciclina, linezolida, eritromicina, claritromicina e levofloxacina. Resultados Foram obtidas amostras de 34 pacientes com diagnóstico de rinosinusite crônica com polipose nasal. Destes, foram isoladas 32 amostras bacterianas da mucosa nasal e 33 da orofaringe. A identificação através da coloração de Gram e teste de catalase das amostras da orofaringe apontou 36,4% de estafilococos, 12,1% de estreptococos, 36,4% de estreptococos e estafilococos, 9,1% de estafilococos e bacilos Gram - negativos e 6,1% de estafilococos, estreptococos e bacilos Gram-negativos. Já as amostras nasais apontaram 71,9% de estafilococos, 15,6% de estafilococos e estreptococos, 9,4% de estafilococos e bacilos e 3,1% de estafilococos, estreptococos e bacilos. Os 46 estafilococos isolados foram produtores de biofilme e a determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada em 30 estafilococos, onde 60% foram resistentes à penicilina, 36,7% à amoxicilina com ácido clavulânico, 10% à cefoxitina, 6,7% à tetraciclina e 3,3% à claritromicina. Conclusões Os estafilococos foram os microrganismos mais frequentes, tanto nas amostras nasais quanto nas da orofaringe dos pacientes com rinosinusites, sendo comprovada a capacidade de produção de biofilme por todos isolados. Apesar da resistência à alguns antimicrobianos utilizados, os dados da susceptibilidade apontam antimicrobianos que podem ser aplicados no tratamento das infecções estafilocócicas. Protocolo CAAE: 91934418.3.0000.5515.

---

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

---

**PERFIL DE VIRULÊNCIA DAS ESCHERICHIA COLI  
DIARREIOGÊNICAS ISOLADAS DE CRIANÇAS**

GABRIELA SUMICO AFONÇO HANAMOTO  
DAIANY RIBEIRO PAZ DE LIRA  
INAE DE OLIVEIRA GARCIA  
MELISSA DE SOUZA SILVA  
ROBSON DIEGO SILVA GONCALVES  
LUCAS JOSE DA COSTA  
IRANILDO DO AMARANTE FERNANDES  
ROGÉRIA KELLER  
HERMANN BREMER NETO

O gênero *Escherichia* pertence à família *Enterobacteriaceae* composta por bacilos gram-negativos anaeróbicos facultativos, colonizam o intestino de seres humanos e animais de sangue quente. A *Escherichia coli* pode causar doenças intestinais, bastante comum em países em desenvolvimento devido a condições precárias e falta de saneamento, sendo a diarreia infantil a mais comum, principalmente em crianças de 0-5 anos de idade. As cepas de *Escherichia coli* diarreio gênicas (DEC), podem ser classificadas em sete categorias de acordo com o perfil clínico, epidemiológico e características específicas conforme o perfil de virulência em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregante (EAEC), *E. coli* aderente difusa (DAEC) e *E. coli* aderente invasiva (AIEC). O foco desse trabalho busca investigar quais as categorias de DEC estão presentes nas regiões da Alta Paulista e do Oeste Paulista do Estado de São Paulo para que possíveis medidas profiláticas mais efetivas possam ser aplicadas para essas regiões. O objetivo do presente estudo é investigar por PCR a presença dos genes *eae*, *stx1* e *ltA* nas amostras de *Escherichia coli* diarreio gênicas (DEC) isoladas de crianças de até 5 anos de idade com diarreia, moradoras das regiões da Alta Paulista e do Oeste Paulista do Estado de São Paulo, no período entre 2018 e março de 2019. Coleta das amostras Este estudo foi realizado no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular (UNOESTE), na cidade de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. Foram estudadas 50 amostras de *E. coli* obtidas de crianças menores de 5 anos de idade com diarreia, moradoras das regiões da Alta Paulista e do Oeste Paulista do Estado de São Paulo, no período entre 2018 e março de 2019. Essas amostras foram doadas por laboratórios públicos e privados das regiões em estudo e encontram-se estocadas a -20° C e a -80° C no Laboratório de Microbiologia da UNOESTE. Preparo do Lisado As amostras bacterianas foram plaqueadas em ágar nutriente para obtenção de colônias isoladas. A seguir, 5 colônias foram transferidas para tubos eppendorfs contendo 100ul de água deionizada estéril. Os eppendorfs foram

colocados em banho-maria por 5min a 98°C em seguida no gelo durante 5min. Em seguida, os lisados são congeladas e estocadas a -20°C. Reação de PCR Nas reações de PCR, foram utilizadas a mistura Master GoTaq Green com 0,34 µM de cada primers e 1,0µL lisado bacteriano, seguindo as instruções do fabricante (Promega Madison, WI, EUA) e as condições descritas na literatura. Os produtos do PCR foram visualizados após eletroforese em géis de agarose a 1,5% em tampão Trisborato-EDTA (TBE), corados com Brometo de Etídio (Invitrogrn, Carlsbad, CA, EUA) e os fragmentos amplificados foram identificados de acordo com o tamanho esperado do produto. Em todos os experimentos, utilizou-se as estirpes de patótipos E2348/69, H10407e O157: H7 EDL933, utilizadas como controle positivo para as pesquisas da EPEC, ETEC, e STEC, respectivamente. A E. coli DH5alfa foi empregada como controle negativo em todas as reações de PCR. Das 50 amostras testadas para o gene stx1, três apresentaram o gene para a toxina e uma amostra também apresentou o gene eae. Enquanto que sete amplificaram somente para o gene eae. Em relação ao gene ltA nenhuma amostra apresentou essa toxina. Os resultados obtidos revelam a que 6% das amostras são STEC (eae, stx1), 12% são EPEC (eae) e nenhuma amostra foi isolada como ETEC. Esses dados estão de acordo com os dados da literatura onde revelam um maior índice de EPEC e STEC entre os isolados de DEC.

---

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

