

Patrícia Luciana de Oliveira

Ocorrência de *integrons* em amostras de *Escherichia coli*
diarreiogênica e espécimes fecais de crianças
com e sem doença diarreica

Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2017

Patrícia Luciana de Oliveira

Ocorrência de *integrons* em amostras de *Escherichia coli*
diarreiogênica e espécimes fecais de crianças
com e sem doença diarreica

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Microbiologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutora
em Microbiologia

Orientadora: Paula Prazeres Magalhães

Coorientadores: Luiz de Macêdo Farias

Andréa Maria Amaral Nascimento

Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2017

043

Oliveira, Patrícia Luciana de.

Ocorrência de *integrons* em amostras de *Escherichia coli* diarreio gênica e espécimes fecais de crianças com e sem doença diarreica [manuscrito] / Patrícia Luciana de Oliveira. - 2017.

122 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Paula Prazeres Magalhães. Co-orientadores: Luiz de Macêdo Farias, Andréa Maria Amaral Nascimento.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. *Escherichia coli* - Teses. 2. Disenteria 3. Resistência antimicrobiana 4. Integron. 5. Cassete gênico. I. Magalhães, Paula Prazeres. II. Farias, Luiz de Macêdo. III. Nascimento, Andréa Maria Amaral. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 575



UFMG
Microbiologia

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

ALUNA: PATRÍCIA LUCIANA DE OLIVEIRA

Nº matrícula: 2013710709

Programa de Pós-graduação em Microbiologia - NÍVEL DOUTORADO

Defesa de Tese: 26 de junho de 2017

Título: "Ocorrência de integrons em amostras de Escherichia coli diarreiogênica e espécimes fecais de crianças com e sem doença diarreica"

Co-orientadores: Prof. Luiz de Macêdo Farias; Profa. Andréa Maria Amaral Nascimento

Suplente externo: Dra. Mireille Angela Bernardes Sousa

A Tese foi submetida à apreciação da Profa. Dra. Elisabeth Neumann que emitiu parecer favorável.

Profa. Magna Cristina de Paiva

Examinadora

Magna Cristina de Paiva

Aprovada: *Sim*

Profa. Patrícia Costa Lima da Silva

Examinadora

Patrícia Costa Lima da Silva

Aprovada: *Sim*

Prof. Jacques Robert Nicoli

Examinador

JR

Aprovada: *Sim*

Profa. Sílvia Beleza de Moura

Examinadora

Sílvia Beleza de Moura

Aprovada: *Sim*

Profa. Paula Prazeres Magalhães

Orientadora

PM

Aprovada: *Sim*

Flávio
Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

COLABORAÇÃO

Anna Gabriella Guimarães Oliveira

Carolina Peconik Silva

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios

Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG

APOIO FINANCEIRO

CNPq

FAPEMIG

CAPES

PRPq/UFMG

Ao meu esposo, Cristiano
Aos meus pais, Raimundo e Vera
Ao meu irmão, Marcelo

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela oportunidade de estudá-la. Obrigada, Senhor, por Sua constante presença em minha vida. Obrigada por tudo que sou e que tenho. Obrigada pelas pessoas e oportunidades maravilhosas que colocou no meu caminho!

Aos meus pais, Vera e Raimundo, por estarem sempre presentes em minha vida, torcendo por minhas conquistas e me apoiando nas minhas dificuldades. Muito obrigada pelos incentivos, por acreditarem no meu trabalho e por não medirem esforços para me ajudar. Não há palavras para agradecer! Esta tese também é de vocês!

Ao meu esposo, Cristiano, por ter aparecido em minha vida, deixando-a bonita! Obrigada por todo apoio e carinho que tem me dado. Obrigada por sua enorme paciência, dedicação e por entender os meus momentos de ausência. Sua parceria me faz chegar mais longe! Te amo!

Ao Marcelo, meu irmãozinho querido! Muito obrigada pela companhia, amizade, carinho e paciência. Obrigada pelo apoio e pelas inúmeras consultorias tecnológicas!

Aos meus demais familiares, que torceram por mim e vibraram com minhas vitórias.

À minha orientadora, Prof.^a Paula, pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Obrigada pela atenção, disponibilidade, dedicação e pelo carinho com o qual você me orienta. A sua confiança em meu trabalho me incentiva a fazer sempre o meu melhor! Obrigada pelo exemplo de profissional e por fazer parte da minha formação.

Ao meu coorientador, Prof. Luiz, pela presença, atenção e assistência em todos os momentos. Sempre preocupado com o andamento dos trabalhos e nunca medindo esforços para que tudo corresse bem. Sua dedicação é um exemplo! Muito obrigada por tudo!

À minha coorientadora, Prof^a. Andrea, pela disposição em contribuir com este trabalho, abrindo caminhos para o desenvolvimento do mesmo. Sua contribuição foi muito valiosa para o andamento desta tese e para minha formação.

A todos do Laboratório de Genética de Microrganismos, em especial à Mariana e à Cris, pela ajuda e boa vontade em todos os momentos em que pedi socorro.

Aos Profs. Jacques, Magna, Patrícia e Sílvia, pela disponibilidade em participar da banca examinadora deste trabalho, e à Prof.^a Beth, suplente, pela emissão do parecer.

À Mireille e ao Rodrigo, que me acompanharam durante minha iniciação científica. Obrigada pela oportunidade de trabalhar com vocês e pelos valiosos ensinamentos.

Às Prof.^{as} Simone e Dodora, pelo exemplo de profissionalismo. Muito obrigada pelo carinho demonstrado durante todo o período em que trabalhei no Laboratório.

À Carol, minha “filhota”, por toda dedicação. Sempre disponível e super eficiente! Obrigada pela valiosa ajuda neste trabalho. Sem você ficaria tudo muito mais difícil! Muito sucesso para você!!!

À Anna, companheira de bancada desde o mestrado. Obrigada por me ensinar qPCR e pelas proveitosas discussões sobre resultados e experimentos. Sua contribuição foi imensurável! Continue sendo essa pessoa que transborda alegria!

À Natália, por sempre dispor de um tempinho para me ajudar. Muito obrigada pela companhia, pelas conversas gostosas e pela valiosa ajuda em vários momentos. E muito obrigada por organizar nossa festinha pós-defesa! Torço muito por você, garota! Você vai longe!

Ao João, pelas valiosas conversas sobre *integron* que muito enriqueceram meu trabalho. É muito bom trabalhar com você!

Ao Samir, pelas preciosas idéias e dicas, seja em relação ao trabalho, seja em relação à vida. Obrigada pela sua amizade!

Ao Sérgio e à Luzia, mesmo já longe do MOA a um tempinho, eu devo um agradecimento eterno a vocês, por tudo que contribuíram para o trabalho de tantas pessoas! Muito obrigada! Sempre!

Aos demais colegas do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios. Todos com os quais convivi nestes dez anos de caminhada. Muito obrigada por toda ajuda, companheirismo e momentos de descontração. Vocês são uma segunda família! Tudo fica muito mais fácil quando estamos cercados de pessoas produtivas, responsáveis, companheiras, amigas... Ainda bem que continuo na UFMG e não preciso me despedir de ninguém! Se me permitirem, serei sempre uma MOA!!!

À Lucrécia, por entender como é difícil trabalhar e fazer doutorado ao mesmo tempo. Seu companheirismo foi fundamental para que eu conseguisse terminar meus experimentos e escrever esta tese. Obrigada também pelas caronas que foram fundamentais para que me sobrasse um pouquinho mais do tão valioso tempo.

Às Profas. Susana e Edel, o meu muito obrigada pelo apoio e compreensão que me foram fundamentais para a finalização do doutorado.

À UFMG, em especial aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

À CAPES, ao CNPq, à FAPEMIG, à PRPq/UFMG e a TWAS, pelo auxílio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para esta conquista, o meu muito obrigada!

“Vivendo, se aprende; mas o que se aprende,
mais, é só a fazer outras maiores perguntas.”

ROSA, João Guimarães. Grande Sertão: Veredas.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 <i>INTEGRONS</i>	21
1.1.1 CLASSIFICAÇÃO	24
1.2 DROGAS ANTIMICROBIANAS	28
1.2.1 A RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIMICROBIANOS	29
1.2.1.1 Tipos de resistência a drogas antimicrobianas	32
1.2.1.2 Microbiota intestinal e resistência a drogas antimicrobianas	33
1.2.1.3 <i>E. coli</i> e resistência a drogas antimicrobianas	34
1.3 ENTERITE INFECCIOSA AGUDA	35
1.4 <i>Escherichia coli</i>	39
1.4.1 PATOTIPOS DIARREIOGÊNICOS DE <i>E. coli</i>	40
1.4.1.1 EPEC	40
1.4.1.2 STEC/EHEC	45
1.4.1.3 ETEC	45
1.4.1.4 EAEC	46
1.4.1.5 EIEC	47

1.4.1.6	DAEC	49
1.4.1.7	AIEC	49
2	JUSTIFICATIVA	51
3	OBJETIVOS	53
3.1	OBJETIVO GERAL	54
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1	PESQUISA DE <i>INTEGRONS</i> EM AMOSTRAS DE <i>Escherichia coli</i> ISOLADAS DE ESPÉCIMES FECAIS DE CRIANÇAS COM E SEM DIARREIA	56
4.1.1	GRUPO DE ESTUDO	56
4.1.2	EXTRAÇÃO DE DNA	57
4.1.3	PESQUISA DE <i>INTEGRONS</i> E CASSETES GÊNICOS NAS AMOSTRAS DE <i>E. COLI</i>	58
4.1.4	SEQUENCIAMENTO DOS CASSETES GÊNICOS	59
4.1.5	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIMICROBIANAS	63
4.1.6	ESTATÍSTICA	64
4.2	PESQUISA DE <i>INTEGRONS</i> EM ESPÉCIMES FECAIS DE CRIANÇAS COM E SEM DIARREIA	64
4.2.1	GRUPO DE ESTUDO	64
4.2.2	EXTRAÇÃO DE DNA	64
4.2.3	QUANTIFICAÇÃO DE <i>INTEGRONS</i> EM AMOSTRAS FECAIS: QPCR	64
4.2.4	ESTATÍSTICA	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68

5.1	PESQUISA DE <i>INTEGRONS</i> EM AMOSTRAS DE <i>Escherichia coli</i> ISOLADAS DE ESPÉCIMES FECAIS DE CRIANÇAS COM E SEM DIARREIA	69
5.1.1	PESQUISA DE <i>INTEGRONS</i> E CASSETES GÊNICOS NAS AMOSTRAS DE <i>E. COLI</i>	69
5.1.2	SEQUENCIAMENTO DOS CASSETES GÊNICOS E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIMICROBIANAS	74
5.2	PESQUISA DE <i>INTEGRONS</i> EM ESPÉCIMES FECAIS DE CRIANÇAS COM E SEM DIARREIA	90
6	SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES	96
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXO I	114
ANEXO II	118

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura básica de um <i>integron</i> e seus elementos.	23
Figura 2	Esquema da patogênese dos patótipos diarreiogênicos de <i>Escherichia coli</i>	44
Gráfico 1	Frequência de <i>integrans</i> classes 1 e 2 em amostras de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica, <i>E. coli</i> enterotoxigênicas e <i>E. coli</i> da microbiota indígena.	70
Figura 3	Discriminação de produtos de amplificação de cassetes gênicos (<i>integrans</i> classe 2) em gel de agarose 1,5%.	73
Gráfico 2	Distribuição de <i>integrans</i> e cassetes gênicos em amostras de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica, <i>E. coli</i> enterotoxigênicas e <i>E. coli</i> da microbiota indígena.	73
Figura 4	Esquema dos cassetes gênicos de <i>integrans</i> classe 1 e 2 sequenciados, frequência de cada configuração detectada e variações dos genes encontrados.	75
Gráfico 3	Frequência de suscetibilidade, resistência intermediária e resistência considerando todos os grupos de amostras (<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica, <i>E. coli</i> enterotoxigênicas e <i>E. coli</i> da microbiota indígena) e todos os antimicrobianos testados.	82
Gráfico 4	Frequência de resistência, resistência intermediária e suscetibilidade de amostras de <i>Escherichia coli</i> frente aos diferentes antimicrobianos testados.	83
Gráfico 5	Curvas padrão para a quantificação dos marcadores gênicos pesquisados.	115
Gráfico 6	Perfis de amplificação observados para os marcadores gênicos pesquisados.	116

Gráfico 7	Curvas de <i>melting</i> observadas para os marcadores gênicos pesquisados.	117
Gráfico 8	Log da média do número dos genes <i>int1</i> clínico, <i>int1</i> e <i>int2</i> por grama de fezes de crianças com e sem diarreia.	92

LISTA DE TABELAS

1	Principais características dos antibacterianos utilizados na atualidade.	30
2	Principais agentes etiológicos de diarreia aguda.	37
3	Resumo das principais características dos patotipos diarreiogênicos de <i>Escherichia coli</i>	42
4	Iniciadores para pesquisa de <i>integrons</i> e cassetes gênicos associados à resistência a drogas antimicrobianas.	60
5	Protocolo das reações para pesquisa de <i>integrons</i> e cassetes gênicos associados à resistência a antimicrobianos.	61
6	Iniciadores e condições de reação para amplificação e obtenção de sequencias internas de alguns cassetes gênicos.	62
7	Iniciadores para quantificação de bactérias e <i>integrons</i> em amostras de fezes de crianças com e sem diarreia por meio de qPCR.	67
8	Relação de amostras positivas para <i>int1</i> , respectivos cassetes gênicos (quando encontrados) e perfil de resistência e suscetibilidade a antimicrobianos.	76
9	Relação de amostras positivas para <i>int2</i> , respectivos cassetes gênicos e perfil de resistência e suscetibilidade a antimicrobianos.	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AAF	<i>aggregative adherence fimbriae</i>
A/E	<i>attaching and effacing</i>
Afa	<i>afimbrial adhesin</i>
AMC	amoxicilina-clavulanato
AMI	amicacina
AMP	ampicilina
ATM	aztreonam
AIEC	<i>Escherichia coli</i> aderente invasora
BFP	<i>bundle-forming pili</i>
CAZ	ceftazidima
CEACAM6	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6</i>
CFA	<i>colonization factor antigen</i>
CFs	fatores de colonização
CFO	cefoxitina
CFZ	cefazolina
CIM	concentração inibitória mínima
CIP	ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CPM	cefepime
CRO	ceftriaxona
CRX	cefuroxima
CS	<i>coli surface antigen</i>

CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
CTT	cefotetam
CTX	cefotaxima
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DAF	<i>decay accelerating factor</i>
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarrreio gênica
DNA	ácido desoxirribonucleico
DOR	doripenem
Dr	fimbrial adhesin
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST1	<i>enteroaggregative E. coli ST</i>
EAF	<i>EPEC adherence factor</i>
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enteremorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ETP	ertapenem
ExPEC	<i>E. coli</i> patogênica extraintestinal
GEN	gentamicina
IMP	imipenem
ITU	infecção do trato urinário
LEE	<i>locus of enterocyte effacement</i>
LEV	levofloxacina

LT	<i>heat-labile enterotoxin</i> /enterotoxina termolábil
MER	meropenem
MNEC	<i>Escherichia coli</i> agente de meningite neonatal
MRSA	SARM; <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NAL	ácido nalidíxico
NaCl	cloreto de sódio
ORF	<i>open reading frame</i> /fase de leitura aberta
PCF	<i>putative colonization factor</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> /reação de polimerização em cadeia
Pet	<i>plasmid-encoded toxin</i>
PIP	piperacilina
PPT	piperacilina-tazobactam
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> /reação de polimerização em cadeia quantitativa
Sat	<i>secreted autotransporter toxin</i>
SBA	ampicilina-sulbactam
SDS	dodecil sulfato de sódio
ShET 1	<i>Shigella enterotoxin 1</i>
SHU	síndrome hemolítico-urêmica
SUT	sulfametoxazol-trimetoprima
ST	<i>heat-stable enterotoxin</i> /enterotoxina termoestável
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina shiga
Stx	toxina Shiga
SST3	sistema de secreção tipo III

TIC	ticarcilina-clavulanato
Tir	<i>translocated intimin receptor</i>
Tris-HCl	<i>trizma hydrochloride</i>
TOB	tobramicina
TSA	<i>trypticase soy agar/ágar triptona de soja</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica

RESUMO

A espécie *Escherichia coli* abriga microrganismos extremamente diversificados dos pontos de vista fenotípico e genotípico. Estes podem ser agrupados, a princípio, em dois grandes grupos, quais sejam amostras incluídas na microbiota indígena e amostras exógenas. *E. coli* é um microrganismo muito importante como agente de infecções relacionadas à assistência à saúde e infecções comunitárias. Entre as doenças associadas, merece destaque a doença diarreica aguda. A resistência a antimicrobianos é considerada um enorme problema de saúde pública. Esta propriedade é comumente codificada por genes presentes em elementos genéticos “móveis”, como cassetes gênicos. Estes estão comumente inseridos em *integrons*, unidades genéticas eficientes em capturar e promover a expressão gênica. O objetivo deste estudo é caracterizar *integrons* e cassetes gênicos em amostras de *E. coli* diarreiogênicas (ECD) e membros da microbiota indígena (EMI), bem como avaliar a presença de *integrons* diretamente em amostras de fezes de crianças acometidas ou não pela doença diarreica. O grupo de estudo incluiu 170 amostras bacterianas: 92 ECD (57 ETEC e 41 EPEC) e 72 EMI. Também incluiu 40 espécimes fecais de crianças com (20) e sem (20) diarreia. A pesquisa de *integrons* classe 1, 2 e 3 em *E. coli* foi realizada por PCR e, então, amostras positivas foram empregadas para investigação da presença de cassetes gênicos. Produtos de amplificação sugestivos de cassetes gênicos foram sequenciados para avaliar a presença de marcadores de resistência. As amostras bacterianas também foram submetidas a antibiograma. *Integrons* classes 1 e 2 foram detectadas em 20,6% e 7,1% das amostras, respectivamente. Em 2,4% das amostras, ambas as classes de *integron* foram detectadas simultaneamente. Não foi detectado *integron* classe 3 em nenhuma amostra. Cassetes gênicos foram observados na maioria (71,4%) das amostras positivas para *integron* classe 1 e em todas as amostras positivas para *integron* classe 2. Foram detectados genes que conferem resistência a β-lactâmicos, estreptomicina, espectinomicina, trimetoprima e estreptotricina. Os espécimes fecais, por sua vez, foram submetidos à qPCR para quantificação de Bacteria, *int1*, *int1* clínico e *int2*. Independentemente do grupo de estudo (crianças com ou sem diarreia), foram encontrados, aproximadamente, 10⁹ cópias de cada marcador de integrase (*int1*, *int1* clínico e *int2*) por grama de fezes. Todas as amostras de fezes albergavam *integrons*. Em conjunto, os resultados destacam a importância dos *integrons* e da microbiota indígena como reservatório e na disseminação da resistência bacteriana, além de enfatizar a necessidade de se adotar procedimentos que controlem este processo.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, diarreia aguda, resistência antimicrobiana, *integron*, cassete gênico.

ABSTRACT

Escherichia coli is a highly diverse species both phenotypically and genotypically. Two groups may be clearly recognized, one of them comprising those strains that are members of the indigenous microbiota and the other one gathering exogenous microorganisms. *E. coli* is frequently implicated in the etiopathogenesis of healthcare associated infections as well as community acquired infections. Among them acute diarrhea should be highlighted. Antimicrobial drug resistance is considered as a public health problem. The property is commonly acquired via mobile genetic elements such as gene cassettes. These units are frequently inserted into integrons defined as genetic elements that allow efficient capture and expression of exogenous genes. This study aimed at characterizing integrons and gene cassettes in diarrheagenic *E. coli* (DEC) and *E. coli* isolates from the indigenous microbiota (EEC). We also evaluated the presence of *integron*sin fecal specimens of children with or without diarrhea. The study group included 170 *E. coli* isolates [92 DEC (57 ETEC and 41 EPEC) and 72 EEC] and 40 fecal specimens obtained from children with (20) and without (20) diarrhea. PCR was employed to search for classes 1, 2, and 3 integrons and then positive isolates were employed for gene cassettes investigation. Gene cassettes amplicons were sequenced in order to evaluate the occurrence of genes coding for antimicrobial resistance. Additionally the antimicrobial susceptibility profile of *E. coli* isolates was determined. Classes 1 and 2 integrons were detected in 20.6% and 7.1% of the bacterial strains, respectively. Both classes of integron were detected simultaneously in 2.4% of the isolates. The detected frequency of integrons and antimicrobial resistance in EEC arises great concerns. No class 3 integron was detected. Gene cassettes were observed in the majority (71.4%) and in all strains positive for class 1 and 2 integrons, respectively. Genes that code for β -lactams, streptomycin, spectinomycin, trimetoprim, and steptotrycin were detected. Fecal specimens were assayed by qPCR in order to quantify Bacteria, *int1*, *int1* clínico, and *int2*. Regardless the study group (children with or without diarrhea) about 10^9 copies of each integron marker by gram of feces were detected. Integrons were detected in all fecal specimens. Taken together our results highlight the importance of integrons and of the indigenous microbiota as a reservoir and in the dissemination of antimicrobial resistance reinforcing the need for designing protocols aiming to control this process.

Keywords: *Escherichia coli*, acute diarrhea, antimicrobial resistance, integron, gene cassette.

1 INTRODUÇÃO

1.1 INTEGRONS

Integrans são unidades genéticas observadas em diversas espécies bacterianas, caracterizadas pela sua habilidade de capturar elementos móveis pequenos, denominados cassetes gênicos, por meio de recombinação sítio-específica, e de transformá-los em genes funcionais, promovendo a sua expressão (MAZEL, 2006; HALL, 2012; GILLINGS, 2014). Descritos no final da década de 1980 (STOKES & HALL, 1989), os *integrans* foram, inicialmente, identificados em decorrência do seu papel relevante na disseminação de genes de resistência a drogas antimicrobianas (STOKES & HALL, 1989; RECCHIA & HALL, 1995; HALL, 2012). Estes elementos genéticos são encontrados em bactérias de uma grande diversidade de ambientes, como solos de florestas e desertos, sedimentos de rios, biofilmes aquáticos, superfícies de plantas, esgoto e microbiota de animais, dentre outros, albergando os mais diversos genes (MOURA *et al.*, 2007; DOMINGUES *et al.*, 2012; GILLINGS, 2014; RAVI *et al.*, 2014). Estudos empregando abordagem de bioinformática demonstraram que entre 10 e 15% dos genomas bacterianos já sequenciados apresentam estas estruturas, atestando que elas não estão limitadas ao contexto clínico (BOUCHER *et al.*, 2007; DOMINGUES *et al.*, 2012; GILLINGS, 2014).

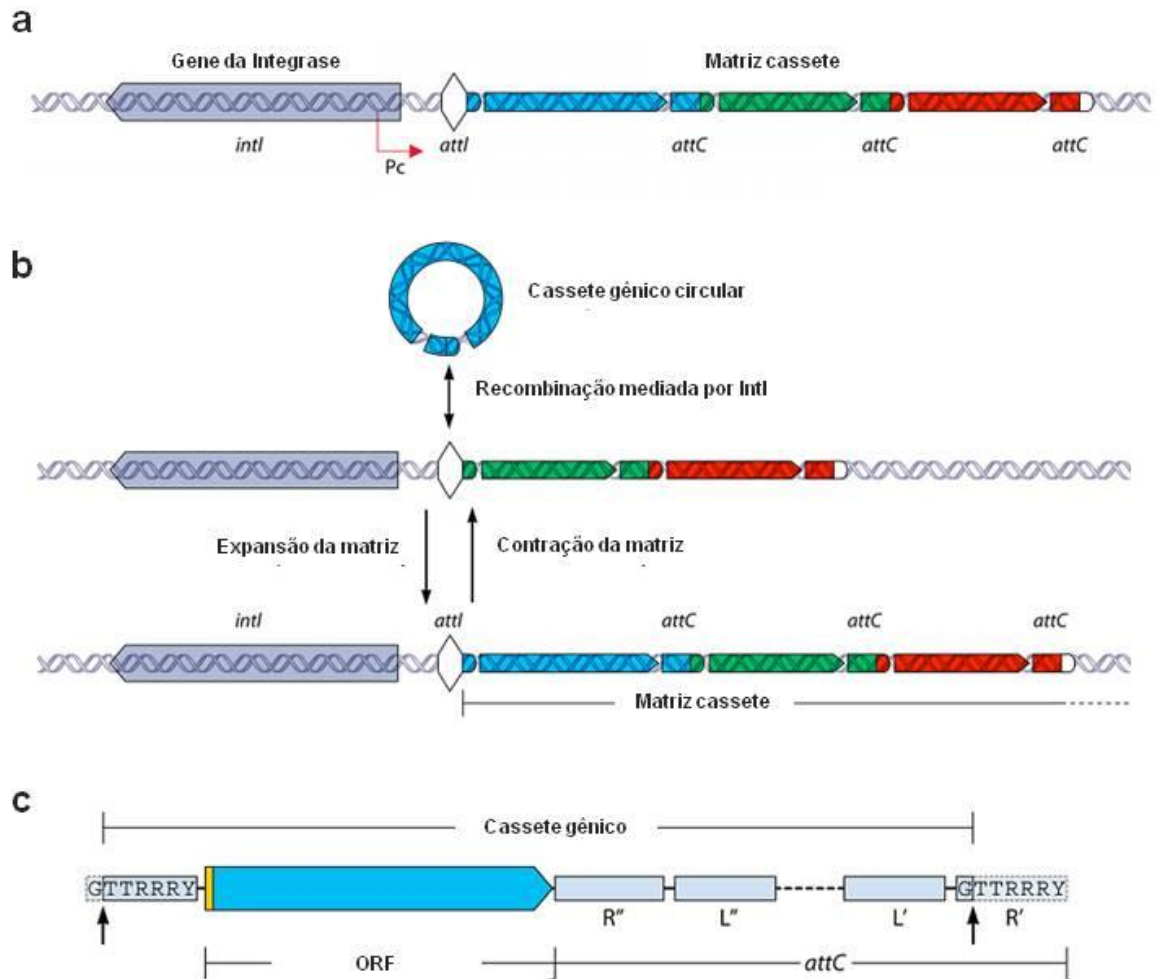
A habilidade dos *integrans* em adquirir cassetes gênicos é uma forma rápida de gerar diversidade adaptativa. Dessa forma, *integrans* contribuem para a adaptação de bactérias a *habitats* e nichos específicos, codificando funções relevantes, por exemplo, envolvidas em interações simbióticas ou no metabolismo de diversas substâncias. Assim, não é uma surpresa que *integrans* tenham um papel fundamental na adaptação bacteriana frente à antibioticoterapia (GILLINGS, 2014; GILLINGS *et al.*, 2017). Na década de 70, a ocorrência de bactérias multirresistentes era, comumente, associada à presença de plasmídios, passíveis de transferência intercelular com relativa facilidade. A importância dos *integrans* na aquisição e disseminação de genes de resistência a drogas antimicrobianas só foi reconhecida muito mais tarde, na década de 1980 (STOKES & HALL, 1989; MAZEL, 2006; CAMBRAY *et al.*, 2010). Atualmente, a relevância destes elementos como um poderoso vetor de multirresistência a

antimicrobianos, especialmente em bactérias Gram negativas, está bem estabelecida (PARTRIDGE *et al.*, 2009; CAMBRAY *et al.*, 2010).

Um *integron* é constituído por três elementos básicos: (1) o gene *intI*, que codifica uma integrase sítio-específica pertencente à família tirosina recombinase, que catalisa a excisão e a integração específica dos cassetes gênicos; (2) o sítio de recombinação *attI*, intimamente ligado ao gene *intI*, onde ocorre a ligação do cassete gênico; e (3) o promotor Pc, que garante a expressão dos genes integrados e pode estar associado ao gene *intI*, ao sítio *attC* ou a um cassete gênico (FIG. 1a; MAZEL, 2006; HALL *et al.*, 2007; CAMBRAY *et al.*, 2010, GILLINGS, 2014).

Todos os cassetes gênicos já identificados inseridos em um *integron* compartilham características estruturais específicas. Geralmente, apresentam um gene ou ORF (*open reading frame*/fase de leitura aberta) e um sítio de recombinação, denominado *attC* (*59-base element*) (FIG. 2c; RECCHIA & HALL, 1995; MAZEL, 2006). A maioria dos cassetes gênicos apresenta apenas uma ORF, orientada da esquerda para a direita. Entretanto, cassetes com duas ou mais ORFs, nenhuma ORF, ou ORF na orientação reversa já são conhecidos (GILLINGS, 2014). Já os sítios *attC* formam uma família de sequências de nucleotídeos que funcionam como sítio de reconhecimento para as integrases (MAZEL, 2006). Cassetes gênicos também podem ser encontrados como moléculas livres de DNA circular. Entretanto, habitualmente, são encontrados na forma linear, inseridos em um *integron* (FIG. 1b; RECCHIA & HALL, 1995; HALL & COLLINS, 1998; GILLINGS, 2014). Cada *integron* pode apresentar vários cassetes gênicos e aqueles mais próximos de Pc são expressos com maior frequência do que os que apresentam localização distal (ROWE-MAGNUS & MAZEL, 2002). *Integrans* com promotores fracos geralmente apresentam uma integrase com atividade de excisão elevada (JOVÉ *et al.*, 2010).

Figura 1. Estrutura básica de um *integron* e seus elementos.



Legenda: **a.** Estrutura do *integron*. A plataforma básica de um *integron* consiste em *intl*, gene que codifica a integrase; Pc, promotor que garante a expressão dos genes integrados; *attI*, sítio de recombinação do *integron*; e cassetes genéticos, sequencialmente inseridos através de recombinação entre *attI* e *attC*.

b. Aquisição de cassetes genéticos. *Integrans* adquirem cassetes genéticos através da recombinação entre o sítio *attC* de um cassete circular e o sítio *attI* de um *integron*. Os cassetes são inseridos na posição proximal ao gene da integrase. A matriz pode ser expandida, pela aquisição de novos cassetes genéticos, ou contraída, pela saída de cassetes circulares.

c. Cassete genético mostrado em sua forma linear. Da esquerda para direita: sítio de recombinação conservado, GTTRRY; *start codon*, ORF codificada pelo cassete; e sítio *attC*, contendo os sítios de ligação da integrase R'', L'', R' e L'.

Fonte: Adaptado de GILLINGS, 2014.

Os *integrons* são muito eficientes na exploração da genética microbiana, podendo ser encontrados em transpósons, plasmídios, ilhas genômicas e cromossomos bacterianos (HALL, 2012). A localização dos *integrons* em cromossomos ou em “elementos móveis” tem consequências evolucionárias e funcionais importantes, já que a “mobilidade” permite a disseminação para novos *taxa*, enquanto que a localização cromossômica fornece sítios para a geração de complexidade genômica e de diversidade fenotípica (GILLINGS, 2014).

Segundo Gillings (2014), o sistema *integron* apresenta duas vantagens para a evolução do genoma bacteriano. A primeira delas, porque um novo material genético pode ser integrado ao DNA bacteriano em um sítio específico de recombinação (*attI*), não alterando genes previamente existentes. Além disso, o novo gene integrado é expresso pelo promotor do *integron* (*Pc*) e, portanto, esta instantaneamente pronto para ser submetido à seleção natural.

1.1.1 CLASSIFICAÇÃO

A classificação dos vários tipos de *integrons* ainda não é claramente estabelecida. Grande parte dos artigos disponíveis na literatura menciona uma classificação baseada na homologia entre as integrases (CARATTOLI, 2001; ROWE-MAGNUS & MAZEL, 2002; FLUIT & SCHMITZ, 2004; CAMBRAY *et al.*, 2010; HALL, 2012; GILLINGS, 2014) ou baseada na localização do *integron* e na quantidade de cassetes gênicos que apresenta (“móveis” ou cromossômicos; *superintegrons*) (MAZEL, 2006; CAMBRAY *et al.*, 2010).

Cinco tipos diferentes de *integrons* podem ser distinguidos, considerando a similaridade entre as sequências das integrases codificadas pelos mesmos (ROWE-MAGNUS & MAZEL, 2002; BOUCHER *et al.*, 2007; CAMBRAY *et al.*, 2010; HALL, 2012). Entretanto, segundo Hall (2012), na última década, estas cinco classes aumentaram para cerca de 100, cada uma com um gene *intI* diferente. Recuperados de amostras bacterianas de origem clínica resistentes a drogas antimicrobianas, todos os membros destas classes apresentam predominantemente, mas não exclusivamente, cassetes contendo genes associados a esta característica (HALL, 2012). Segundo Mazel (2006), todas

essas classes estão ligadas ao que se denomina, comumente, de elementos “móveis”, como plasmídios conjugativos, transpósons e sequências de inserção.

Os *integrons* pertencentes à classe 1 apresentam a estrutura mais comum e a maioria dos componentes dessa classe são caracterizados pela presença de dois segmentos conservados, denominados 5' (5'-SC) e 3' (3'-SC). 5'-SC possui o gene *intl*, o sítio *attI* e o promotor, enquanto que 3'-SC carrega o gene *sul1*, que confere resistência a sulfonamidas, e o gene *qacEΔ1*, associado à resistência a compostos quaternários de amônio, utilizados como desinfetantes. Cassetes gênicos relacionados com resistência a agentes antimicrobianos são integrados entre 5'-SC e 3'-SC no sítio *attI* (CARATTOLI, 2001; MAZEL, 2006; CAMBRAY *et al.*, 2010; GILLINGS, 2014).

Juntos, os *integrons* classe 1 acumulam mais de 130 cassetes gênicos que, em conjunto, conferem resistência à maioria das classes de drogas antimicrobianas descritas (GILLINGS *et al.*, 2017). Já foi demonstrada a presença de sete cassetes gênicos em um mesmo *integron* classe 1. Também já foi observada a presença de mais de um *integron* classe 1 em uma mesma amostra bacteriana (CARATTOLI, 2001). Estes *integrons* são os mais abundantes e os que apresentam maior importância clínica, detectados entre 22 e 59% das amostras clínicas de bactérias Gram negativas e, ocasionalmente, identificados também em bactérias Gram positivas (CAMBRAY *et al.*, 2010). São os mais prevalentes entre populações bacterianas multirresistentes (ROWE-MAGNUS & MAZEL, 2002) e estão associados a transpósons funcionais ou não funcionais derivados de Tn402, que podem, ainda, ser incorporados em transpósons maiores, como o Tn21 (ROWE-MAGNUS & MAZEL, 2002; MAZEL, 2006; CAMBRAY *et al.*, 2010).

Os genes que codificam a integrase de todos os *integrons* classe 1 de origem clínica são essencialmente idênticos. Tal fato sugere que todos estes *integrons* são descendentes recentes de um único evento evolutivo envolvendo apenas um representante entre as diversas variações de sequências de *intl* presentes em ambientes naturais. Estes *integrons* estavam “pré-adaptados” para responder quando os seres humanos tentaram controlar as populações bacterianas com agentes antibacterianos: eram abundantes em bactérias que ocupavam diversos ambientes de interseção com a cadeia alimentar humana;

eram relativamente móveis, movendo-se entre regiões cromossômicas e entre espécies (devido à sua associação com transpósons); eram capazes de receber diversos cassetes gênicos presentes em organismos ambientais; e comumente apresentavam cassetes gênicos para bombas de efluxo, capazes de conferir fenótipo de resistência. Acredita-se, ainda, que a presença do gene *qacE* em *integrons* classe 1 é um evento ancestral na evolução da estrutura. Isto pode ser explicado pela utilização de compostos quaternários de amônio como desinfetantes em hospitais na década de 1930, antes do uso clínico de drogas antimicrobianas. Além disso, é importante destacar que os primeiros antibióticos verdadeiros foram as sulfonamidas, introduzidas durante a metade final da década de 1930. Acompanhando seu uso, como esperado, iniciou-se a seleção de microrganismos resistentes ao antimicrobiano. Por isso, não é de se estranhar que o próximo evento na evolução desta classe de *integrons* envolva um gene que confere resistência à sulfonamida. A entrada de *qacE* e *sul1* geraram, então, 3'-SC, característico dos *integrons* classe 1, como já mencionado (DOMINGUES *et al.*, 2012; GILLINGS, 2014; GILLINGS *et al.*, 2015).

Adicionalmente, Gillings e colaboradores (2015) propõem que o gene da integrase de *integron* classe 1, *intl1*, seja usado como um marcador genérico de poluição humana. Tal consideração deve-se, dentre outros, ao fato de que *intl1* presente em amostras clínicas apresenta, como já citado, uma sequência de DNA uniforme e altamente conservada, está normalmente associado a genes de resistência a drogas antimicrobianas, desinfetantes e metais pesados, bem como está presente no genoma de diversas bactérias membros da microbiota indígena ou associadas à etiopatogenia de doenças em seres humanos e animais domésticos. Conseqüentemente, *intl1* é abundante em esgoto e dejetos humanos e pouco encontrado em ambientes não impactados. Os autores ainda destacam que existe uma pequena variação na composição das sequências de *intl1* encontrado em amostras clínicas quando comparado à mesma classe de *integrons* encontrada em amostras ambientais, o que permitiria uma distinção entre as amostras de origem do *integron*.

Os *integrons* classe 2, por sua vez, estão associados à família de transpósons Tn7 (CARATTOLI, 2001; ROWE-MAGNUS & MAZEL, 2002; FLUIT & SCHMITZ, 2004; CAMBRAY *et al.*, 2010 GILLINGS, 2014). Estudos

desenvolvidos empregando-se abordagem metagenômica detectaram genes que codificam integrases funcionais de *integrons* classe 2 em ambientes agrícolas. Alguns destes *integrons*, inclusive, apresentavam cassetes gênicos com genes de função desconhecida, o que é esperado para amostras ambientais. Por outro lado, genes que codificam integrases de *integrons* classe 2 de origem clínica são inativados por um *stop codon* interno e estão associados com cassetes que conferem resistência a antimicrobianos. Como todas estas integrases possuem a mesma mutação, é possível afirmar que todas apresentam uma mesma origem. Assim sendo, como *intl2* de amostras clínicas é inativo, a habilidade dos *integrons* em adquirir e perder cassetes gênicos é restrita. Dessa forma, o arranjo de cassetes gênico é altamente conservado e a sua variedade é limitada em comparação com *integrons* classe 1. Entretanto, alguma variação nas matrizes de cassetes é conhecida. Este rearranjo pode ser mediado por uma integrase em trans ou através da supressão do *stop codon* interno (GILLINGS, 2014).

Já os *integrons* pertencentes à classe 3 são localizados em transpósons presentes em plasmídios e são ainda menos prevalentes que aqueles incluídos na classe 2 (MAZEL, 2006; CAMBRAY *et al.*, 2010). Segundo Gillings (2014), foram inicialmente descritos no contexto clínico no Japão, onde são relativamente comuns, mas não são comumente observados em outras partes do mundo. Assim como as classes 1 e 2, *integrons* classe 3 também podem ser encontrados em amostras da microbiota indígena e ambientais. Da mesma forma que a classe 1, a classe 3 também parece estar associada ao transpóson Tn402, mas, em orientação inversa. *Integrons* classe 3 não carregam uma grande diversidade de cassetes gênicos, talvez porque *intl3* não seja tão ativo quanto os genes que codificam as integrases das outras classes (GILLINGS, 2014).

As outras duas classes de *integrons*, classes 4 e 5, foram identificadas graças ao seu envolvimento na resistência à trimetoprima em espécies de *Vibrio*. A classe 4 é componente de um subconjunto de elementos SXT, “elementos genéticos móveis” relacionados à resistência a drogas antimicrobianas, presentes em *Vibrio cholerae*, e a classe 5 está localizada em um transpóson composto, presente no plasmídio pRSV1 de *Aliivibrio salmonicida* (MAZEL, 2006; CAMBRAY *et al.*, 2010). Segundo Rowe-Magnus & Mazel (2002), estas duas classes de *integrons* possuem, cada uma, apenas um cassete gênico relacionado à

resistência a antimicrobianos, seguido por vários outros cassetes gênicos cujas funções parecem ser diferentes.

Outro grupo de *integrons*, diferenciado com base no outro critério de classificação discutido, que leva em consideração localização e quantidade de cassetes gênicos incorporados, corresponde aos *superintegrons* cromossômicos. Em 1990, foi descrito um tipo particular de *integron* em *V. cholerae*. Este *integron* codifica uma integrase específica, VchInt1A, semelhante às integrases codificadas pelas outras classes de *integrons* já conhecidas, mas apresenta duas características próprias: (i) a presença de um grande número de cassetes gênicos e um grau elevado de identidade (>80%) observada entre os seus sítios *attC* e (ii) a localização cromossômica e não em “elementos móveis”, como ocorre para as demais classes (MAZEL, 2006; CAMBRAY *et al.*, 2010). Entretanto, o termo *superintegron* é muito criticado por alguns autores, que afirmam que, embora possam ser encontrados em transpósons, plasmídios e cromossomos bacterianos, todos os *integrons* apresentam as mesmas propriedades básicas (gene *intl* e sítio *attI*), que os permitem capturar cassetes gênicos. Além disto, este termo gera confusão, uma vez que é aplicado aos *integrons* localizados no cromossomo, mesmo que a maioria destes não apresente um grande número de cassetes gênicos (HALL & STOKES, 2004; HALL *et al.*, 2007; HALL, 2012).

1.2 DROGAS ANTIMICROBIANAS

Substâncias com características antimicrobianas já são conhecidas há milhares de anos, embora nem sempre na sua forma purificada. A artemisinina, por exemplo, encontrada em uma planta denominada *Artemisia annua*, popularmente conhecida como Qinghao, já era usada para tratamento de pacientes com doenças causadas por protozoários na medicina tradicional chinesa há, aproximadamente, dois mil anos (OLDFIELD & FENG, 2014). No século 19, observações feitas por renomados microbiologistas, como Robert Koch e Louis Pasteur, mostravam a presença de atividade antagonista entre

populações microbianas (O'CONNELL *et al.*, 2013). Algum tempo depois, em 1929, Alexander Fleming observou que um fungo contaminante impedia a multiplicação de *Staphylococcus aureus* em placas de cultura. Assim, deu-se a descoberta da penicilina (FLEMING, 1929). Desde então, antimicrobianos mais eficazes vem sendo descobertos e desenvolvidos, inclusive por meio de modificações na molécula de um fármaco previamente existente (KOHANSKI *et al.*, 2010).

É de grande importância ressaltar que os antimicrobianos representam uma das mais bem sucedidas formas de tratamento da medicina moderna. Seu uso tem reduzido a mortalidade e aumentado a expectativa de vida (MARTINEZ, 2014; BLAIR *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2015). A TAB. 1 traz um resumo das principais características das classes de antibacterianos empregados atualmente.

1.2.1 A RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIMICROBIANOS

A resistência a drogas antimicrobianas é um importante problema de saúde pública e um dos poucos exemplos de evolução visível em tempo real (MARTINEZ, 2014). A importância do uso de antimicrobianos quando indicados é indiscutível. Entretanto, o número de infecções causadas por bactérias multirresistentes e infecções de difícil tratamento vem aumentando drasticamente. Devido ao uso generalizado de drogas antimicrobianas na medicina humana, medicina veterinária, pecuária, horticultura, apicultura, produção de tintas e em laboratórios clínicos e de pesquisa, é grande a pressão evolutiva para a disseminação da resistência antimicrobiana. E este é um fenômeno natural, já que as bactérias foram “evoluindo” para resistir à ação de produtos antibacterianos na natureza durante bilhões de anos, muito antes do uso destas substâncias pelo homem (BLAIR *et al.*, 2015).

Tabela 1. Principais características dos antimicrobianos utilizados na atualidade.

Classe da droga	Exemplos	Mecanismo de ação	Espectro de ação
β -lactâmico			
Penicilinas	Penicilina, ampicilina, oxacilina	Inibição da síntese da parede celular por bloqueio da ligação cruzada de unidades de peptidoglicano catalisada por PBPs (proteínas de ligação à penicilina ou transpeptidases)	Bactérias aeróbias, facultativas e anaeróbias, Gram positivas e Gram negativas
Combinação de β -lactâmico/Inibidor de β -lactamase	Uma penicilina + ácido clavulânico ou sulbactam ou tazobactam		
Cefens	Cefazolina, cefoxitina, ceftriaxona, cefepime		
Carbapenes	Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem		
Monobactams	Aztreonam		
Glicopeptídios	Vancomicina	Inibição da síntese da parede celular atuando na síntese do peptidoglicano, através da ligação de unidades peptidoglicano e do bloqueio de atividade das transglicosilase e PBPs.	Bactérias Gram positivas
Aminoglicosídeos	Gentamicina, tobramicina, estreptomina	Inibem a síntese proteica bacteriana em nível ribossômico (ribossomo 30S)	Bactérias aeróbias e facultativas Gram positivas e Gram negativas e <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Macrolídeos	Eritromicina, azitromicina	Inibem a síntese proteica bacteriana em nível ribossômico (ribossomo 50S)	Bactérias aeróbias, facultativas e anaeróbias, Gram positivas e Gram negativas

Tabela 1. Continuação.

Classe da droga	Exemplos	Mecanismo de ação	Espectro de ação
Tetraciclinas	Tetraciclina	Inibem a síntese proteica bacteriana em nível ribossômico (ribossomo 30S)	Bactérias aeróbias e facultativas Gram positivas e Gram negativas
Quinolonas	Ácido nalidíxico, ciprofloxacino, levofloxacino	Inibição da síntese de DNA por meio da inibição da atividade da DNA-girase	Bactérias aeróbias e facultativas Gram positivas e Gram negativas, <i>M. tuberculosis</i>
Inibidores da via metabólica do folato	Trimetoprima, Sulfonamidas	Antagonista do ácido fólico, inibindo sua formação pela bactéria e, conseqüentemente, inibidor da síntese de DNA.	Bactérias aeróbias e facultativas Gram positivas e Gram negativas,
Rifamicinas	Rifamicina, rifampina, rifapentina	Inibidor da síntese de RNA por meio da inibição de atividade da RNA-polimerase dependente de DNA	Bactérias Gram positivas e Gram negativas, <i>M. tuberculosis</i>
Lipopeptídios	Daptomicina, polimixina B	Afeta a integridade estrutural celular por afetar a estrutura e induzir a despolarização da membrana celular	Bactérias Gram positivas (daptomicina) e Gram negativas (polimixinas)
Streptograminas	Quinupristina, dalfopristina	Inibem a síntese proteica bacteriana em nível ribossômico (ribossomo 50S)	Bactérias aeróbias, facultativas e anaeróbias, Gram positivas e Gram negativas
Anfenicóis	Cloranfenicol	Inibem a síntese proteica bacteriana em nível ribossômico (ribossomo 50S)	Algumas espécies Gram positivas e Gram negativas

Fonte: KOHANKI *et al.*, 2010

Doenças infecciosas causadas por amostras bacterianas resistentes a antimicrobianos estão associadas a taxas de mortalidade mais elevadas, ao aumento dos custos do tratamento, à maior propagação e à duração mais longa da doença. Inicialmente, microrganismos multirresistentes eram mais frequentemente encontrados no ambiente hospitalar, onde o uso de antimicrobianos é mais amplo. Mas, a frequência de bactérias resistentes na comunidade tornou-se, também, bastante elevada, predominando em infecções respiratórias e intestinais, causas importantes de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento (OKEKE *et al.*, 2005).

As décadas de 50 e 60 foram uma "idade de ouro" no que se refere à descoberta de antimicrobianos. No entanto, durante este mesmo período, descrições importantes de resistência a drogas ocorreram. Podemos citar, como exemplo, a detecção de *S. aureus* resistente a metilina (SARM ou MRSA/*methicillin resistant Staphylococcus aureus*), *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente ou extensivamente resistente e vários casos de infecções relacionadas à assistência à saúde com etiologias diversas (*Clostridium difficile* e bactérias Gram negativas, tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*), dentre outros. Estes episódios são correlacionados com a introdução de novos agentes antibacterianos (OLDFIELD & FENG, 2014).

Avanços científicos recentes vêm permitindo e ainda promoverão um maior entendimento da resistência microbiana. Esta informação, se usada adequadamente, auxiliará na descoberta e desenvolvimento de novos agentes que poderão contornar ou neutralizar mecanismos de resistência existentes (BLAIR *et al.*, 2015).

1.2.1.1 Tipos de resistência a drogas antimicrobianas

Algumas bactérias apresentam resistência intrínseca a certos antimicrobianos, resultado de uma característica estrutural ou funcional inerente, como a ausência de alvo ou a baixa permeabilidade a uma droga específica. Do ponto de vista clínico, uma espécie bacteriana é considerada intrinsecamente resistente a uma determinada droga antimicrobiana se a concentração inibitória

mínima (CIM) de todas as amostras esta acima de um ponto de corte previamente estabelecido. Este tipo de resistência não precisa de uma relação evolutiva entre a bactéria e o antimicrobiano (MARTINEZ, 2014; BLAIR *et al.*, 2015).

Por outro lado, as bactérias também podem adquirir resistência por meio de mutações ou transferência horizontal de genes (MARTINEZ, 2014; BLAIR *et al.*, 2015; SCHAIK, 2015). Deve-se considerar que, embora uma mutação seja relevante, num primeiro momento, somente para a bactéria que a sofreu, a presença de um gene de resistência potencialmente transferível pode ser importante para a disseminação da resistência entre os membros da população (MARTINEZ *et al.*, 2014).

Em geral, a resistência pode ser mediada por vários mecanismos, classificados em quatro grupos diferentes. O primeiro inclui aqueles que minimizam a concentração intracelular da droga, seja dificultando a penetração do fármaco, seja por ação de bombas de efluxo, que bombeiam ativamente o antimicrobiano do meio intracelular para o meio extracelular. Estudos de genômica sugerem a presença de uma grande variedade de sistemas de efluxo nas bactérias e cada célula pode apresentar várias bombas de efluxo de diferentes famílias. O segundo grupo inclui mecanismos que modificam o alvo do antimicrobiano, seja por mutações, seja por modificações pós-traducionais. O terceiro grupo, por sua vez, corresponde a mecanismos que modificam a via metabólica para contornar a ação do antimicrobiano, seja pelo uso de uma via metabólica alternativa, seja pela produção aumentada do metabólito essencial. E, por fim, em um quarto grupo, aqueles que inativam a droga por hidrólise ou modificação molecular. Um exemplo é a produção bacteriana de β -lactamases, enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico e, conseqüentemente, correspondem a um importante mecanismo para a resistência frente a este grupo de antimicrobianos (SCHMIEDER & EDWARDS, 2011; BLAIR *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2015).

1.2.1.2 Microbiota intestinal e resistência a drogas antimicrobianas

O intestino humano abriga uma população microbiana diversa, que desempenha papel importante na saúde e no desenvolvimento de doenças em

seu hospedeiro. Estas bactérias são, em sua imensa maioria, anaeróbias obrigatórias, destacando os filos Bacteroidetes e Firmicutes. Exercem funções importantes para o hospedeiro, como a produção de vitaminas, digestão de certos carboidratos e maturação do sistema imunológico, dentre outras. Por sua vez, membros das famílias Enterobacteriaceae e Enterococcaceae, bactérias anaeróbias facultativas, também fazem parte da microbiota indígena intestinal, mas em níveis populacionais consideravelmente inferiores. Entretanto, estas famílias merecem interesse particular porque membros destes grupos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, vem se destacando, nos últimos anos, como patógenos nosocomiais multirresistentes (SCHAIK, 2015).

É possível afirmar que a microbiota indígena, especialmente a intestinal, desempenha papel importante na resistência antimicrobiana. A densidade bacteriana extremamente elevada e o enorme conjunto de genes dos organismos presentes combinados com a frequente exposição a drogas antimicrobianas, decorrente do uso intensivo na medicina humana e veterinária, são fundamentais para a seleção de amostras resistentes da microbiota indígena (FRANCINO, 2016; TENAILLON *et al.*, 2010). A transferência horizontal de genes, incluindo genes de resistência, através de conjugação e transdução, é um evento relativamente frequente na microbiota intestinal (FRANCINO, 2016; SCHAIK, 2015). Conseqüentemente, microrganismos exógenos que se relacionam, de alguma maneira, com a microbiota indígena, podem adquirir os marcadores de resistência carregados por estas bactérias (TENAILLON *et al.*, 2010). Além disto, patógenos oportunistas intestinais multirresistentes podem causar doença cruzando a barreira intestinal ou após a contaminação fecal da pele, bem como de outros sítios corporais, por meio de catéteres ou via intravenosa (SCHAIK, 2015).

1.2.1.3 *E. coli* e resistência a drogas antimicrobianas

A resistência a antimicrobianos é um problema mundial emergente, de grandes proporções, observado em diversos grupos bacterianos, inclusive *E. coli*. Esta espécie expressa índices elevados de resistência a fármacos como

ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprima, tetraciclina, cloranfenicol e ácido nalidíxico (MOSQUITO *et al.*, 2010). *E. coli* destaca-se, inclusive, pela produção de β -lactamases e carbapenemases, bem como pela presença de diversos mecanismos, mutacionais ou não, que geram resistência a quinolonas (VILA *et al.*, 2016). Tudo isso dificulta o estabelecimento de antibioticoterapia eficaz, quando necessária.

Como será discutido posteriormente, *E. coli* corresponde a uma pequena (porém funcional) fração da microbiota do trato intestinal humano. Entretanto, é um reservatório importante de marcadores de resistência a antimicrobianos. Vários estudos já destacaram o índice elevado de resistência antimicrobiana destas amostras. Adicionalmente, outros estudos focaram na detecção de *integrons* carregados por esta espécie bacteriana e em genes de resistência que eles albergavam (CORREIA *et al.*, 2003; SHIBATA *et al.*, 2003; SHEHABI *et al.*, 2006; SU *et al.*, 2006; KADLEC & SCHWAR, 2008; LAPIERRE *et al.*, 2008; VINUÉ *et al.*, 2008; SEPP *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009; BAILEY *et al.*, 2010; BAKHSHI *et al.*, 2014; KARGAR *et al.*, 2014; MOURA *et al.*, 2014; ZEIGHAMI *et al.*, 2015).

1.3 ENTERITE INFECCIOSA AGUDA

Aproximadamente 9 L de fluidos atravessam o intestino do ser humano adulto diariamente, dos quais cerca de 7 L correspondem a secreções gastrointestinais. Entre 98 e 99% do montante é absorvido, aproximadamente 7,5 L pelo intestino delgado e cerca de 1 L pelo cólon (McCLARREN *et al.*, 2011). O balanço aquoso intestinal resulta de uma regulação complexa, envolvendo mediadores inflamatórios, hormônios, neuropeptídeos, integridade da parede intestinal e eficiência do sistema circulatório e do sistema nervoso entérico (BALDI *et al.*, 2009). A diarreia consiste, então, na disfunção deste balanço e eliminação de fezes que apresentam diminuição da consistência, geralmente, acompanhada de aumento da frequência evacuatória (ARANDA-MICHEL & GIANNELLA, 1999;

GUERRANT *et al.*, 2001; BALDI *et al.*, 2009). É uma resposta a diferentes condições intestinais, incluindo infecção, reações adversas a drogas, doença inflamatória intestinal e isquemia (ARANDA-MICHEL & GIANNELLA, 1999).

De acordo com o período de duração, é possível discriminar três tipos de diarreia: aguda, persistente e crônica. A diarreia aguda, que apresenta até 14 dias de duração, é, frequentemente, de natureza infecciosa e autolimitada. A diarreia persistente prolonga-se por duas a quatro semanas e, geralmente, está associada à infecção agravada pela presença de desnutrição, injúria da mucosa ou imunocomprometimento. A diarreia crônica, por sua vez, estende-se por mais de um mês e, habitualmente, decorre de defeitos congênitos associados a digestão e absorção (GUERRANT *et al.*, 2001; McCLARREN *et al.*, 2011; PAULA, 2012).

A enterite infecciosa aguda ainda é considerada um grave problema de saúde pública. Acomete, principalmente, crianças de países menos desenvolvidos, nos quais a falta de higiene e o acesso limitado à água potável e à rede de esgoto facilitam sua disseminação. Fatores como má nutrição e carência de intervenção médica adequada contribuem, de forma importante, para os índices elevados de mortalidade da doença (SUR *et al.*, 2004; SCHROEDER & HILBI, 2008; TORMO *et al.*, 2008; PENG *et al.*, 2010). Em todo o mundo ocorrem, aproximadamente, três a cinco bilhões de casos anualmente, sendo que cerca de dois milhões evoluem para óbito. Estima-se que 20% das mortes de crianças com menos de cinco anos sejam decorrentes da doença diarreica aguda (GRIMWOOD & FORBES, 2009).

A enterite infecciosa aguda está associada a uma ampla variedade de vírus, bactérias e parasitas (TAB. 2), adquiridos, mais comumente, pela rota fecal-oral, por meio do consumo de alimentos ou água contaminados (TORMO *et al.*, 2008; POSFAY-BARBE, 2012). Embora a maioria dos casos da doença seja de natureza infecciosa, somente na minoria das vezes o agente etiológico é identificado (ARANDA-MICHEL & GIANNELLA, 1999; McFARLAND, 2008).

As diarreias infecciosas podem ser diferenciadas, ainda, em inflamatória ou não inflamatória. Na diarreia não inflamatória, também denominada aquosa, o órgão alvo principal é o intestino delgado. Frequentemente, os microrganismos associados ao quadro produzem toxinas que interferem nos processos de absorção e secreção, resultando na eliminação de grande volume de fezes muito

amolecidas ou aquosas. Habitualmente, o paciente não apresenta febre e, nos casos mais graves, pode ocorrer desidratação profunda. Como exemplos de agentes bacterianos de diarreia aquosa, mencionam-se os patótipos enterotoxigênico e enteropatogênico de *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae* (ARANDA-MICHEL & GIANELLA, 1999; McCLARREN *et al.*, 2011).

Na diarreia de natureza inflamatória, por sua vez, comumente observa-se acometimento do intestino grosso. Os microrganismos agentes da doença apresentam, com frequência, capacidade de invasão ou de produção de citotoxinas, desencadeando resposta inflamatória significativa. Os pacientes, geralmente, apresentam febre, tenesmo e cólicas e evacuam, várias vezes ao dia, pequeno volume de fezes acompanhadas de sangue e muco. Microrganismos como *Shigella*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter* e alguns patótipos de *E. coli* podem ser agentes do processo (ARANDA-MICHEL & GIANELLA, 1999; PODEWILS *et al.*, 2004; McCLARREN *et al.*, 2011).

Tabela 2. Principais agentes etiológicos de diarreia aguda.

Vírus	Bactérias	Protozoários
<i>Rotavirus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Norovirus</i>	<i>Shigella</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Mastadenovirus</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Cryptosporidium</i>
<i>Calicivirus</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Cyclospora</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Yersinia</i>	
	<i>Clostridium</i>	
	<i>Vibrio cholerae</i>	
	<i>Aeromonas</i>	
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	

Fonte: Adaptado de ARANDA-MICHEL & GIANNELLA, 1999

As bactérias diarreiogênicas exibem uma ampla variedade de estratégias sofisticadas para colonizar o epitélio intestinal. Em geral, expressam habilidades envolvidas na resistência a defesas não específicas do hospedeiro, como acidez gástrica, peristaltismo, esfoliação da mucosa, mucinas intestinais e bacteriocinas e na colonização do epitélio intestinal. A colonização pode envolver ou não invasão celular. Quando ocorre invasão mais profunda, a bactéria pode alcançar outras regiões e, mesmo, persistir no organismo hospedeiro (REIS & HORN, 2010).

A prevenção é a maneira mais adequada de controle da doença diarreica infecciosa aguda. Medidas sanitárias simples, porém eficientes, como utilização de água tratada, saneamento básico e cuidados de higiene pessoal e dos alimentos, são essenciais para a diminuição da transmissão da doença (DENNEHY, 2005). Além disto, algumas vacinas contra infecções entéricas já foram desenvolvidas e muitas outras devem ser propostas, com o advento de novas tecnologias. A vacina contra rotavirose, por exemplo, já faz parte do calendário básico de vacinação da criança no Brasil (NATARO, 2004; PODEWILS *et al.*, 2004; O'RYAN *et al.*, 2005; POSFAY-BARBE, 2012; Portal da saúde, Ministério da saúde, acessado em 09/11/2015).

É importante destacar que a doença diarreica é, geralmente, autolimitada, sendo, a reidratação, a base do tratamento. A indicação de antibioticoterapia depende de diversos fatores, como gravidade do quadro, condições imunológicas do paciente e probabilidade de transmissão da infecção. Estudos vêm demonstrando que o uso de antimicrobianos pode reduzir o período de manifestação de alguns tipos de diarreia (WHO/CDS/SR/DRS/2001.8, 2001; PODEWILS *et al.*, 2004; NIYOGI, 2005; LUBERT, 2016). Um tratamento alternativo que tem despertado interesse é a utilização de probióticos. Vários estudos indicam que os probióticos aceleram a recuperação dos pacientes acometidos pela doença e reduzem o risco de infecção recorrente (PODEWILS *et al.*, 2004; SZAJEWSKA & MRUKOWICZ, 2005; McCLARREN *et al.*, 2011).

1.4 *Escherichia coli*

E. coli, descrita em 1885 por Theodor Escherich, é a espécie bacteriana mais bem estudada (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002; CROXEN *et al.*, 2013). O microrganismo é um bastonete Gram negativo, anaeróbio facultativo, membro da microbiota indígena de seres humanos e de outros animais (GORDON & COWLING, 2003; TENAILLON *et al.*, 2010). É a bactéria anaeróbia facultativa predominante na microbiota intestinal de seres humanos (NATARO & KAPER, 1998; TENAILLON *et al.*, 2010). Como pode transitar em água e sedimentos, é utilizada como indicador de contaminação fecal (TENAILLON *et al.*, 2010).

A espécie *E. coli* abriga microrganismos extremamente diversificados dos pontos de vista fenotípico e genotípico. Estes podem ser agrupados, a princípio, em dois grandes grupos, quais sejam amostras incluídas na microbiota indígena do ser humano e amostras exógenas. As amostras indígenas de *E. coli*, denominadas equivocadamente de comensais, mantêm com o hospedeiro uma relação de benefício mútuo, exceto em condições especiais, como, por exemplo, imunocomprometimento e rompimento de barreira intestinal (NATARO & KAPER, 1998; KAPER *et al.*, 2004).

Por outro lado, as amostras exógenas da bactéria adquiriram, ao longo do tempo, diversas habilidades de patogenicidade específicas, divergindo ao longo da evolução do grupo, sendo reconhecidas como mais virulentas que as amostras da microbiota intestinal do ser humano. Desta forma, as combinações de marcadores de patogenicidade de maior sucesso persistiram e determinam patotipos específicos de *E. coli*, que são capazes de causar doenças em indivíduos previamente saudáveis. Hoje, a associação de *E. coli* com diversas doenças graves e prevalentes é reconhecida. Dois subgrupos de *E. coli* podem ser discriminados com base na presença de fatores de patogenicidade e na associação com as diferentes doenças relacionadas à bactéria, quais sejam, *E. coli* diarreiogênica (DEC) e *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC). Dentre as ExPEC, merecem destaque *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* agente de meningite neonatal (MNEC) (NATARO & KAPER, 1998; KAPER *et al.*, 2004).

No que se refere aos patotipos diarreio gênicos de *E. coli*, seis grupos são bem conhecidos e claramente definidos. São eles, *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina shiga/enteremorrágica (STEC/EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (NATARO & KAPER, 1998; KAPER *et al.*, 2004). Há ainda o grupo denominado *E. coli* aderente invasiva (AIEC), mais recentemente descrito, associado à doença de Crohn. Relacionada a uma doença inflamatória crônica, AIEC não é considerada agente de diarreia aguda, como os demais patotipos diarreio gênicos de *E. coli* (CROXEN *et al.*, 2013).

As habilidades de patogenicidade que caracterizam cada um dos patotipos de *E. coli* são, frequentemente, codificadas por elementos genéticos que podem ser, não raro, mobilizados, de forma a criar novas combinações de fatores de virulência, o que resulta, em última análise, em novos patotipos do organismo (KAPER *et al.*, 2004). Um exemplo claro da situação é o surgimento do patotipo *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina shiga (STEAEC), responsável por um surto de doença diarreica associada à síndrome hemolítico-urêmica (SHU) originado na Alemanha, em 2011 (FRANK *et al.*, 2011; MORA *et al.*, 2011; CLEMENTS *et al.*, 2012).

1.4.1 PATOTIPOS DIARREIO GÊNICOS DE *E. coli*

A TAB. 3 lista e a FIG. 2 esquematiza as principais características dos patotipos diarreio gênicos de *E. coli* descritos até o momento.

1.4.1.1 EPEC

EPEC foi o primeiro patotipo de *E. coli* descrito. A bactéria está associada ao desenvolvimento de uma lesão histopatológica intestinal característica, conhecida como *attaching and effacing* (A/E). A bactéria adere-se intimamente a enterócitos do intestino delgado, levando a alterações do citoesqueleto celular, incluindo acúmulo de actina polimerizada diretamente abaixo da região de ligação

da bactéria. As microvilosidades intestinais são “achatadas” e forma-se uma espécie de pedestal sobre o qual se situa a bactéria (KAPER *et al.*, 2004; CROXEN *et al.*, 2013).

A lesão A/E é codificada pela ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*). Esta ilha de patogenicidade codifica uma proteína chamada intimina, que está relacionada à ligação de EPEC às células epiteliais intestinais, à resposta imune Th1 e à hiperplasia das criptas intestinais. LEE também codifica o sistema de secreção tipo III (SST3) e algumas proteínas efetoras, como a Tir (*translocated intimin receptor*) que, uma vez no citoplasma da célula hospedeira, funciona como receptor para intimina. Esta, por sua vez, estimula o acúmulo de actina polimerizada e, conseqüentemente, a formação do pedestal (KAPER *et al.*, 2004; CLEMENTS *et al.*, 2012; CROXEN *et al.*, 2013).

Outras proteínas efetoras também são translocadas para o interior das células hospedeiras, intermediando reações que levam a modificações no citoesqueleto celular, desestabilização de junções celulares e alterações na função mitocondrial, dentre outras (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002; KAPER *et al.*, 2004; CLEMENTS *et al.*, 2012; CROXEN *et al.*, 2013).

Amostras de EPEC são classificadas em típicas e atípicas de acordo com a presença ou ausência do plasmídio EAF (*EPEC adherence factor*) que codifica BFP (*bundle-forming pil*). EPEC típica é capaz de formar microcolônias, por meio de interações bactéria-bactéria, que resultam em um padrão de ligação conhecido como aderência localizada (CLEMENTS *et al.*, 2012; CROXEN *et al.*, 2013).

Tabela 3. Resumo das principais características dos patotipos diarreio gênicos de *Escherichia coli*.

Patotipo	Apresentação clínica	Alteração principal	Sítio de colonização	Principais fatores de virulência	Marcadores genéticos
EPEC	Diarreia aquosa	Lesão A/E	Intestino delgado	BFP, intimina, SST3, proteínas efetoras	<i>eae</i> ⁺ , <i>bfp</i> ⁺ (tEPEC), <i>stx</i> ⁻
STEC/EHEC	Diarreia inflamatória, sanguinolenta (possível complicação SHU)	Colite hemorrágica e necrose em casos graves, lesão A/E (EHEC)	Íleo distal, cólon	Stx e intimina, SST3, proteínas efetoras (EHEC)	<i>eae</i> ⁺ (EHEC), <i>stx</i> ⁺
EAEC	Diarreia persistente	Inflamação, alterações nos enterócitos	Intestino delgado e/ou cólon	AAFs, dispersina, EAST1, Pet, ShET1	<i>aatA</i> ⁺ , <i>aaiC</i> ⁺
ETEC	Diarreia aquosa	Alteração dos processos de absorção e secreção	Intestino delgado	Enterotoxinas LT, ST e fatores de colonização	CFs, LT, ST

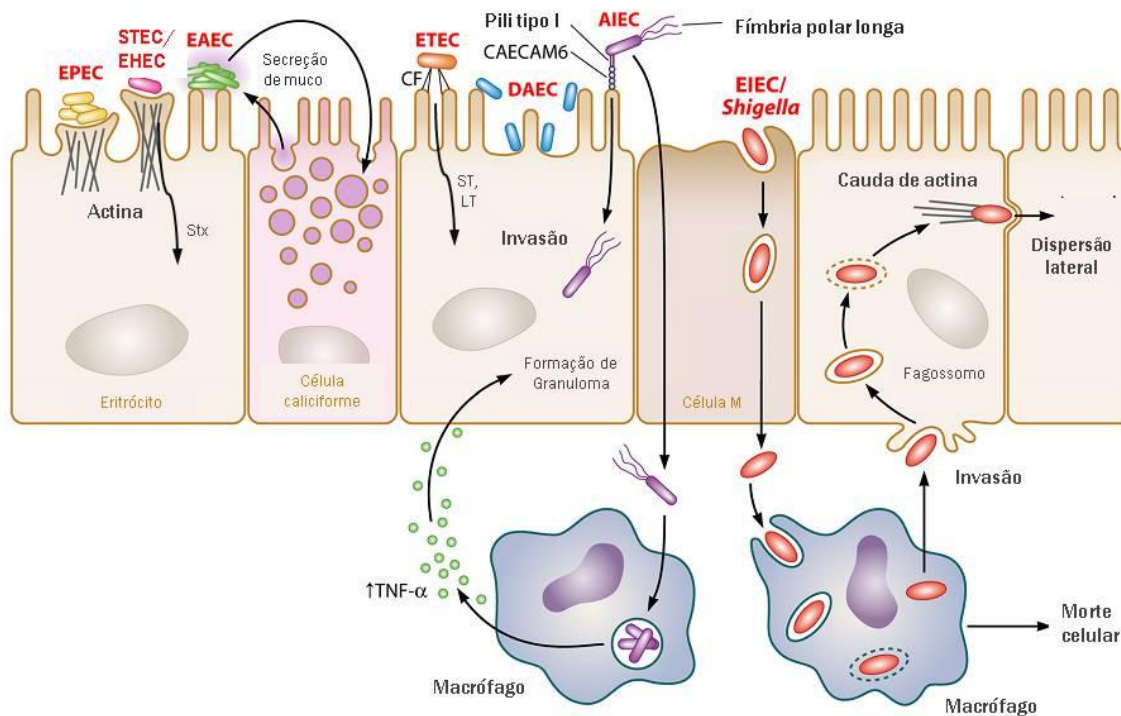
Tabela 3. Continuação

Patotipo	Apresentação clínica	Alteração principal	Sítio de colonização	Principais fatores de virulência	Marcadores genéticos
EIEC	Diarreia inflamatória (Disenteria)	Inflamação e destruição da mucosa intestinal	Cólon	SST3, proteínas efetoras, ShET1 e 2	<i>ipaH⁺</i> , <i>ial⁺</i> , <i>stx⁺</i> (<i>S. dysenteriae</i>)
DAEC	Diarreia aquosa	Indução de longas projeções na superfície celular	Intestino (localização não caracterizada)	Adesinas Dr e Afa, Sat	Sem marcadores específicos
AIEC	Doença de Crohn	Inflamação e destruição da mucosa intestinal	Intestino delgado	Pili tipo I, vesículas de membrana externa, proteínas efetoras	Não caracterizado

Legenda: EPEC. <i>E. coli</i> enteropatogênica	STEC. <i>E. coli</i> produtora de toxina shiga	EHEC. <i>E. coli</i> enteremorrágica
ETEC. <i>E. coli</i> enterotoxigênica	EAEC. <i>E. coli</i> enteroagregativa	EIEC. <i>E. coli</i> enteroinvasora
DAEC. <i>E. coli</i> difusamente aderente	AIEC. <i>E. coli</i> aderente invasiva	E/A. <i>attaching and effacing</i>
SHU. síndrome hemolítico-urêmica	BFP. <i>bundle-forming pili</i>	SST3. sistema secretor tipo 3
Stx. toxina Shiga	AAFs. <i>aggregative adherence fimbriae</i>	EAST1. <i>enteroaggregative E. coli ST</i>
Pet. <i>plasmid-encoded toxin</i>	ShET1. <i>Shigella enterotoxin 1</i>	LT. <i>heat-labile enterotoxin</i>
Dr. <i>fimbrial adhesin</i>	Afa. <i>afimbrial adhesin</i>	Sat. <i>secreted autotransporter toxin</i>

Fonte: NATARO & KAPER, 1998; ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002; KAPER *et al.*, 2004; CLEMENTS *et al.*, 2012; CROXEN *et al.*, 2013.

Figura 2. Esquema da patogênese dos patótipos diarreio-gênicos de *Escherichia coli*.



Legenda: Amarelo: EPEC (*Escherichia coli* enteropatogênica). Adere-se aos enterócitos do intestino delgado, promovendo a destruição das microvilosidades e formação da lesão *attaching and effacing* (A/E).

Rosa: STEC (*Escherichia coli* produtora de toxina shiga). É produtora de toxina shiga (Stx) e, quando portadora da ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*, EHEC), também promove a formação da lesão A/E.

Verde: EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa). Promove a adesão ao epitélio intestinal, formação de biofilme e secreção de enterotoxinas e citotoxinas.

Laranja: ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigênica). Adere-se ao epitélio intestinal por meio dos fatores de colonização (CF) e sintetiza enterotoxinas termolábeis (LT) e/ou termoestável (ST).

Azul: DAEC (*Escherichia coli* difusamente aderente). Adere-se de forma difusa na superfície das células intestinais e induz a formação de projeções que envolvem a bactéria.

Roxo: AIEC (*Escherichia coli* aderente invasora). Coloniza o epitélio intestinal de pacientes com doença de Crohn e multiplica-se no interior de macrófagos.

Vermelho. EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasora). É capaz de promover a invasão celular, lise do fagossomo e movimentação através das células, usando microfilamentos de actina.

Fonte: Modificado de CROXEN *et al.*, 2013.

1.4.1.2 STEC/EHEC

STEC está classicamente associada à diarreia sanguinolenta, mas, também pode causar diarreia aquosa. A doença pode evoluir para SHU (síndrome hemolítico-urêmica), uma complicação rara, mas, grave da enterite causada pelo organismo (KAPER *et al.*, 2004; CLEMENTS *et al.*, 2012; CROXEN *et al.*, 2013). Apresenta, como principal fator de virulência, a toxina shiga (Stx). Inicialmente identificada em *Shigella dysenteriae*, esta toxina é produzida no cólon e, além de causar lesão local, pode, via corrente sanguínea, atingir os rins, onde causa danos às células endoteliais e oclusão da microcirculação. Assim, por meio de uma combinação de efeitos tóxicos diretos e indução de produção local de citocinas e quimiocinas, Stx provoca inflamação renal. Este dano pode levar à SHU, caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda, potencialmente fatal (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002; KAPER *et al.*, 2004; CROXEN *et al.*, 2013).

EHEC, que pode ser considerada como um subgrupo de STEC, foi descrita como agente infeccioso para seres humanos em 1982. O patotipo expressa Stx e carrega a ilha de patogenicidade LEE, que codifica o SST3, e proteínas efetoras homólogas àquelas produzidas por EPEC. Assim, são capazes de produzir lesão A/E, mas, diferentemente de EPEC, as células afetadas são aquelas do epitélio de revestimento do cólon (KAPER *et al.*, 2004).

1.4.1.3 ETEC

ETEC é um agente de diarreia aquosa bastante prevalente. O microrganismo coloniza o epitélio do intestino delgado e produz enterotoxinas, que interferem nos processos de absorção e secreção intestinal (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002; KAPER *et al.*, 2004; CROXEN *et al.*, 2013). A colonização por ETEC é mediada por um ou mais fatores de colonização (CFs) fibrilares proteicos, característicos do grupo, definidos como CFA (*colonization factor antigen*), CS (*coli surface antigen*) ou PCF (*putative colonization factor*). Mais de 20 CFs antigenicamente diferentes já foram descritos (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002; KAPER *et al.*, 2004; CLEMENTS *et al.*, 2012).

Duas variedades de enterotoxinas, denominadas LT (*heat-labile enterotoxin/toxina termolábil*) e ST (*heat-stable enterotoxin/toxina termoestável*), podem ser secretadas por ETEC. Amostras deste patotipo podem produzir apenas uma ou ambas as classes de enterotoxinas. LT é muito semelhante à enterotoxina colérica, tanto no que se refere à estrutura como ao mecanismo de ação. LT apresenta estrutura AB₅ clássica, que consiste em uma subunidade A associada a cinco subunidades B idênticas. As subunidades B promovem a ligação da toxina com os gangliosídios GM1 e GD1b da superfície da célula hospedeira e a subunidade A, por sua vez, é responsável pela atividade enzimática da toxina. Uma vez no citoplasma celular, a subunidade A ativa a adenilato ciclase, resultando em acúmulo de AMPc, que altera o transporte de eletrólitos pelos enterócitos. Observa-se aumento da secreção de íons cloreto pelas células da cripta e redução da absorção de sódio e íons cloreto pelas células das vilosidades, o que culmina com o acúmulo de eletrólitos no lúmen intestinal. Como consequência, a água, que acompanha o gradiente osmótico, também se acumula no lúmen intestinal. Se o volume de fluido ultrapassa a capacidade absorptiva do intestino, o excesso é eliminado na forma de diarreia (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002; KAPER *et al.*, 2004; CROXEN *et al.*, 2013).

ST, por sua vez, é uma molécula pequena, que corresponde a um único peptídeo (aproximadamente 19 resíduos de aminoácidos), classificada como STa e STb, que diferem entre si na estrutura e no mecanismo de ação. Amostras produtoras de STa estão associadas à etiopatogenia da doença diarreica aguda em seres humanos. A toxina liga-se à guanilato ciclase presente em enterócitos do intestino delgado, estimulando sua atividade, levando a um aumento dos níveis de GMPc intracelular, cujo efeito é semelhante ao descrito para acúmulo de AMPc (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002; KAPER *et al.*, 2004).

1.4.1.4 EAEC

EAEC é um patotipo de *E. coli* associado ao desenvolvimento de um quadro de diarreia mais persistente. Segundo Kaper e colaboradores (2004), o grupo inclui amostras diarreiogênicas de *E. coli* que não secretam LT ou ST e

aderem-se a células HEp-2 em um padrão conhecido como autoagregativo, no qual as bactérias aderem-se entre si em uma configuração semelhante a uma parede de tijolos.

A estratégia básica de EAEC no processo de infecção inclui a colonização da mucosa intestinal, predominantemente do cólon, seguida pela secreção de enterotoxinas e citotoxinas. A alteração histopatológica mais importante causada pela bactéria, observada em modelos animais, é a presença de uma espessa camada de bactérias agregadas entre si aderida à superfície mucosa. Estruturas fimbriais, conhecidas como AAF (*aggregative adherence fimbriae*), e proteínas, como a dispersina, estão envolvidas neste processo (KAPER *et al.*, 2004).

Várias toxinas já foram descritas para EAEC. Dentre elas, podemos citar ShET 1 (*Shigella enterotoxin 1*), que contribui para a diarreia secretória que acompanha infecções por EAEC e *Shigella*. Outra enterotoxina produzida por EAEC é a EAST1 (*enteroaggregative E. coli ST*), que também contribui para a diarreia aquosa. Entretanto, o gene que codifica esta toxina também está presente em amostras de *E. coli* da microbiota intestinal indígena, o que torna confuso o entendimento de seu papel no estabelecimento da doença. Merece destaque, ainda, Pet (*plasmid-encoded toxin*), uma toxina autotransportadora que apresenta atividade enterotóxica e pode levar a alterações do citoesqueleto e arredondamento da célula epitelial (KAPER *et al.*, 2004).

1.4.1.5 EIEC

EIEC é capaz de invadir as células epiteliais e se replicar no interior das mesmas, o que resulta em inflamação grave e destruição tecidual. O processo culmina com manifestações clínicas características, tais como ulceração da mucosa, dor de cabeça, desconforto, presença de sangue, muco e pus nas fezes, cólicas abdominais e tenesmo. Entretanto, na maioria das vezes, EIEC provoca uma diarreia aquosa indistinguível daquelas ocasionadas por outros patótipos de *E. coli* (KAPER *et al.*, 2004).

Durante o processo de invasão, as amostras de EIEC cruzam o epitélio intestinal através das células M, células especializadas que continuamente apresentam partículas do lúmen ao tecido linfóide adjacente, onde a resposta

imune pode ser iniciada. Diversos genes, localizados em um grande plasmídio de virulência, são essenciais para a penetração da bactéria nas células hospedeiras. Estes genes codificam proteínas estruturais do SST3 e proteínas efetoras. Uma vez no citoplasma, as proteínas efetoras induzem projeções da membrana celular, levando à fagocitose da bactéria e, posteriormente, à lise do vacúolo fagocítico. Além disso, algumas proteínas efetoras podem modular a resposta imune do hospedeiro. EIEC sobrevive à fagocitose por meio de uma rápida indução de apoptose (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002; SCHROEDER & HILBI, 2008; CROXEN *et al.*, 2013).

Após escape dos macrófagos, EIEC invade os enterócitos pela superfície basolateral. Uma vez no citoplasma da célula, o microrganismo rompe o fagossomo e é capaz de se multiplicar e se disseminar horizontalmente, invadindo as células epiteliais adjacentes. Para isto, acumula actina polimerizada em um de seus polos, formando uma espécie de *cauda*, que a propulsiona através do citoplasma. Entretanto, esta estratégia não é completamente vantajosa para a bactéria, uma vez que a invasão das células epiteliais também estimula uma forte resposta inflamatória. Como consequência da invasão tecidual, as células epiteliais secretam uma série de citocinas que, juntamente com a resposta desencadeada pela presença da bactéria, atraem leucócitos polimorfonucleares da camada subepitelial para o lúmen intestinal. Desta forma, a morte dos macrófagos, a destruição da camada epitelial e o grande fluxo de células polimorfonucleares exacerbam a infecção bacteriana e a lesão tecidual. A grave destruição tecidual interfere nos processos de absorção de água, nutrientes e solutos, o que causa diarreia relativamente aquosa, assim como a presença de sangue e muco nas fezes, característica típica da doença (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002; SCHROEDER & HILBI, 2008; CROXEN *et al.*, 2013). Ainda, EIEC é capaz de produzir toxinas, como ShET1 e 2. Estas toxinas podem alterar o movimento de fluidos no intestino, estando associadas à fase aquosa da diarreia (SCHROEDER & HILBI, 2008; CLEMENTS *et al.*, 2012).

Amostras de EIEC são bioquímica, genética e patologicamente muito semelhantes a *Shigella*. As bactérias podem ser distinguidas por alguns testes bioquímicos, mas, compartilham fatores de patogenicidade essenciais (KAPER *et al.*, 2004; CLEMENTS *et al.*, 2012). A doença causada por EIEC não pode ser

diferenciada daquela causada por *Shigella flexneri*, mas, é bem menos grave do que o quadro associado a *Shigella dysenteriae*, única espécie de *Shigella* produtora de toxina shiga (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002). EIEC é considerada uma bactéria menos virulenta que *Shigella*, observando-se menor eficiência na morte de macrófagos, menor disseminação entre as células epiteliais e menor indução de resposta inflamatória do hospedeiro (CROXEN *et al.*, 2013).

1.4.1.6 DAEC

As amostras classificadas como DAEC exibem a habilidade de adesão de forma difusa à monocamada de células HEp-2, na maioria dos casos, devido à expressão de adesinas fimbriais (Dr) ou afimbriais (Afa). Estas adesinas interagem com uma proteína de superfície celular chamada DAF (*decay accelerating factor*) e desencadeiam efeito citopático característico (NATARO & KAPER, 1998; KAPER *et al.*, 2004; CLEMENTS *et al.*, 2012).

Segundo Clements e colaboradores (2012), Sat (*secreted autotransporter toxin*) é o único fator secretado associado à patogenicidade de DAEC. Esta molécula induz o rearranjo de algumas proteínas de junção, levando à permeabilidade intercelular.

1.4.1.7 AIEC

AIEC, como já mencionado, está associada à doença de Crohn, um tipo de doença inflamatória intestinal, cuja origem está relacionada a uma combinação de fatores genéticos, microbiota intestinal, fatores ambientais e patógenos entéricos. AIEC pode desencadear a doença, assim como contribuir para a inflamação crônica. Este patotipo não expressa fatores de patogenicidade comuns encontrados em várias outras *E. coli* patogênicas e a base genética para seu fenótipo pró-inflamatório e invasivo não é completamente entendido (CROXEN *et al.*, 2013).

O patotipo AIEC é caracterizado pela sua capacidade de aderir e invadir células epiteliais e de se replicar no interior das mesmas e de macrófagos. Inicialmente, AIEC coloniza o epitélio por meio da ligação de seu *pili* tipo I ao

receptor CEACAM6 (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6*), que é superexpresso na mucosa do íleo de pacientes com doença de Crohn, ou por meio de uma fímbria que se liga às células M nas placas de Peyer. AIEC secreta vesículas de membrana externa contendo proteínas efetoras e promove a invasão das células do epitélio intestinal. AIEC sobrevive e replica-se dentro de fagossomos de macrófagos infectados na lâmina própria, resultando no aumento de secreção de TNF- α , o que pode ocasionar a inflamação associada à doença de Crohn (CLEMENTS *et al.*, 2012; CROXEN *et al.*, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

Como mencionado, *integrons* são unidades genéticas presentes em uma ampla gama de grupos bacterianos, caracterizados pela sua habilidade de capturar elementos móveis pequenos, denominados cassetes gênicos, que, muitas vezes, carregam genes que codificam resistência a drogas antimicrobianas. Estes elementos genéticos constituem um poderoso vetor de multirresistência a antimicrobianos, especialmente em bactérias Gram negativas. Considerando o crescente desafio que representa o controle da resistência a antimicrobianos, a pesquisa e a caracterização de *integrons* e cassetes gênicos em amostras bacterianas, principalmente agentes etiológicos de doenças infecciosas, são de grande relevância. Tendo em conta a prevalência da doença diarreica aguda, parece-nos oportuno o estudo da diversidade destes elementos genéticos em amostras bacterianas isoladas de fezes e em espécimes fecais de crianças, principal grupo etário acometido pela doença. A alta prevalência de *E. coli* como agente diarreiogênico sustenta a escolha do organismo para o estudo. Assim, a relevância da disseminação da resistência a drogas antimicrobianas, de *integrons* e cassetes gênicos associados à mesma, da enterite aguda, da microbiota intestinal como reservatório de resistência antimicrobiana e de *E. coli* como agente diarreiogênico justifica esta proposta, que visa contribuir para o conhecimento básico relativo ao tema.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e caracterizar *integrons* e cassetes gênicos associados à resistência a drogas antimicrobianas em amostras de *E. coli* e em espécimes fecais de crianças com doença diarreica aguda e sem diarreia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas de amostras de ETEC e EPEC isoladas de espécimes fecais de crianças com doença diarreica aguda e de amostras de *E. coli* isoladas de espécimes fecais de crianças sem diarreia.
- Investigar a presença de *integrons* classes 1, 2 e 3 e cassetes gênicos nas amostras de *E. coli* incluídas no estudo.
- Caracterizar os cassetes gênicos detectados no que se refere à presença de marcadores de resistência a drogas antimicrobianas.
- Avaliar a existência de associação entre presença de cassetes gênicos e expressão de resistência a drogas antimicrobianas por *E. coli*.
- Quantificar Bacteria, *integrons* classe 1, *integrons* classe 1 clínico e *integrons* classe 2 em espécimes fecais de crianças com doença diarreica aguda e sem diarreia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi dividido em duas etapas, com diferentes abordagens, detalhadas a seguir. Foram empregadas amostras fecais e de *E. coli* obtidas de crianças atendidas no Hospital Infantil João Paulo II/FHEMIG, durante a realização do estudo “Etiologia da diarreia infecciosa aguda em Belo Horizonte-MG e em Teresina/PI: estudo clínico e laboratorial”, entre 2004 e 2007. As crianças recrutadas para o estudo eram de nível socioeconômico baixo e não haviam feito uso de drogas antimicrobianas nos últimos 15 dias que antecederam à coleta. As amostras fazem parte da coleção do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG e encontram-se criopreservadas a -80 °C. No que se refere às bactérias, as amostras vêm sendo mantidas em Brucella Broth¹ acrescido de glicerol² 10%. A identificação das amostras de *E. coli* foi realizada por meio de provas bioquímico-fisiológicas e testes genotípicos para pesquisa de marcadores de patogenicidade que caracterizam os diferentes patótipos de DEC.

4.1 PESQUISA DE INTEGRONS EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE ESPÉCIMES FECAIS DE CRIANÇAS COM E SEM DIARREIA

4.1.1 GRUPO DE ESTUDO

Neste estudo, foram empregadas 170 amostras de *E. coli*, 57 amostras de ETEC e 41 amostras de EPEC, recuperadas de espécimes fecais de crianças com doença diarreica aguda, e 72 amostras não diarreio gênicas de *E. coli* isoladas de crianças sem diarreia. As crianças tinham até 69 meses de idade.

¹ BBL, Sparks, MD, EUA

² Sciavicco, Belo Horizonte, MG, Brasil

4.1.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA das amostras bacterianas foi extraído pelo método descrito por Fox e colaboradores (1994) com algumas modificações. Após cultivo em meio TSA³, por 24 h, a 37 °C, as culturas bacterianas foram diluídas em água Milli-Q^{®4} estéril e o material foi centrifugado a 10.000 g por 10 min. O *pellet* celular obtido foi dissolvido em 100 µL de tampão STET (Sacarose⁵ 8%, Tris-HCl⁶ 50 mM, EDTA⁷ 50 mM, Triton X-100⁸ 0,1%; pH 8,0). Em seguida, foram adicionados 30 µL de SDS⁹ 10% e 10 µL de RNase¹⁰ a 0,5 mg/mL. Uma vez homogeneizada, a suspensão foi incubada por 1 h a 37 °C e, em seguida, foram adicionados 15 µL de proteinase K¹¹ a 10 mg/mL. A suspensão foi, então, novamente homogeneizada e incubada a 37 °C *overnight*. Em seguida, após adição de 10 µL de NaCl¹² 5 M e 30 µL de solução CTAB¹³ 5% p/v/NaCl 0,7 M, a solução foi gentilmente agitada e incubada por 10 min a 56 °C, em banho-maria. O DNA foi extraído adicionando-se à amostra 200 µL de fenol¹⁴ (equilibrado em Tris-HCl 500 mM, pH 8,0) e 200 µL de clorofórmio¹⁵; a seguir, a mistura foi homogeneizada e centrifugada em baixa rotação por 4 min. A fase superior foi removida e transferida para outro tubo. O procedimento foi repetido por cerca de três vezes. O DNA foi, então, precipitado a -20 °C, *overnight*, pela adição de 30 µL de acetato de sódio¹⁶ e 400 µL de etanol absoluto¹⁷. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 12000 g, por 75 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 400 µL de etanol 70%. A suspensão foi novamente centrifugada a 12.000 g, por 25 min, a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e os tubos contendo as amostras de DNA foram mantidos abertos, sobre papel

³ Difco, Sparks, MD, EUA

⁴ Direct-Q 3; Millipore, Molsheim, França

⁵ Inlab, São Paulo, SP, Brasil

⁶ Promega, Madison, WI, EUA

⁷ Life, Gairhesburg, MD, EUA

⁸ Calbiochem, La Jolla, CA, EUA

⁹ Calbiochem

¹⁰ Sigma-Aldrich

¹¹ Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

¹² Sigma-Aldrich

¹³ Sigma-Aldrich

¹⁴ Invitrogen

¹⁵ Merck, Darmstadt, Alemanha

¹⁶ Sigma-Aldrich

¹⁷ Merck

absorvente, para evaporação do etanol residual. O sedimento de DNA foi diluído em 50 µL de água Milli-Q[®] estéril. A amostra foi homogeneizada, a concentração de DNA foi medida em espectrofotômetro¹⁸, empregando-se comprimento de onda de 260 nm, e a relação DNA/proteína foi estimada utilizando-se, também, a leitura realizada a 280 nm. As amostras de DNA foram diluídas em água Milli-Q[®] estéril até concentração de 20 ng/mL. O material foi, então, mantido a -20 °C, até o momento de sua utilização.

4.1.3 PESQUISA DE *INTEGRONS* E CASSETES GÊNICOS NAS AMOSTRAS DE *E. coli*

Para a pesquisa de *integrans* e cassetes gênicos nas amostras de *E. coli*, foi realizada PCR (*polymerase chain reaction*/reação de polimerização em cadeia) convencional, empregando-se os iniciadores e protocolos especificados nas TAB. 4 e 5, respectivamente. A pesquisa de cassetes gênicos foi realizada somente para amostras positivas para os marcadores de integrase. Cerca de 4 µL dos produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose¹⁹ 1,5% acrescido de 0,001% de corante SYBR Safe I²⁰. Como controle positivo para *integron* classe 1, foi empregada a amostra *E. coli* BH100, portadora do cassete gênico *aad*, pertencente à Coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia Geral do ICB/UFMG e a amostra *Klebsiella pneumoniae* 24/*int1*, gentilmente cedida pela Profa. Ana Lúcia da Costa Darini, do Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Como controle positivo para *integrans* classes 2 e 3, foram empregadas as amostras *Pseudomonas aeruginosa* 123/*int2* e *P. aeruginosa* 110/*int3*, respectivamente, ambas também cedidas gentilmente pela Profa. Ana Lúcia da Costa Darini. Como controle negativo, foram utilizados a amostra de *E. coli* ATCC 25922, além do *mix* da PCR sem adição de DNA. Empregou-se o marcador de massa molecular 1 Kb Plus²¹. O gel foi examinado sob luz ultravioleta e o resultado foi fotodocumentado.

¹⁸ Nanodrop 1000; Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, EUA

¹⁹ Invitrogen

²⁰ Invitrogen

²¹ Invitrogen

4.1.4 SEQUENCIAMENTO DOS CASSETES GÊNICOS

Os produtos de PCR para sequenciamento dos cassetes gênicos foram purificados por precipitação com solução de polietilenoglicol (PEG8000)²² 20% p/v e NaCl 2,5 M (SAMBROOK *et al.*, 1989) ou empregando-se o *GenElute™ Gel Extration Kit*²³. Este foi utilizado quando mais de um produto de amplificação por amostra foi observado. As reações de sequenciamento foram realizadas pelo Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG, empregando o *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit*²⁴ conforme recomendações do fabricante. As sequências obtidas foram tratadas com auxílio do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) e, em seguida, comparadas com bancos de dados disponíveis, empregando-se a ferramenta de pesquisa BLASTn²⁵. Em algumas situações, iniciadores internos foram desenhados, para possibilitar o sequenciamento completo do cassete gênico (TAB. 6). Estes iniciadores foram desenhados com auxílio da ferramenta *PrimerQuest*²⁶.

²² Sigma

²³ Sigma

²⁴ Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA

²⁵ NCBI, Bethesda, MD, EUA

²⁶ IDT, Coralville, Iowa, EUA (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>)

Tabela 4. Iniciadores para pesquisa de *integrans* e cassetes gênicos associados à resistência a drogas antimicrobianas.

	Iniciadores (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Alvo	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
Integrases					
Int1F	ACGAGCGCAAGGTTTCGGT	565	<i>intl 1</i>	52	Su <i>et al.</i> , 2006
Int1R	GAAAGGTCTGGTCATACATG				
Int2F	GTGCAACGCATTTTGCAGG	403	<i>intl 2</i>		
Int2R	CAACGGAGTCATGCAGATG				
Int3F	GGAGGTTTCAGACGTTGCTTTC	290	<i>intl 3</i>	60	Clímaco, 2011
Int3R	CCAGTGCATGAGGCAGATACA				
Cassetes gênicos					
5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	Variável	cassetes gênicos de <i>integrans</i> classe 1	55	Lévesque <i>et al.</i> , 1995
3'CS	AAGCAGACTTGACCTGA				
hep74	CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA	Variável	cassetes gênicos de <i>integrans</i> classe 2	55	Ahmed <i>et al.</i> , 2007
hep51	GATGCCATCGCAAGTACGAG				

Tabela 5. Protocolo das reações para pesquisa de *integrans* e cassetes gênicos associados à resistência a antimicrobianos.

Alvo	Iniciadores	Mix	Condições de reação	Referência
Integrases				
<i>intl 1</i>	Int1F	0,4 µM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, 1,0 mM de MgCl ₂ , 0,1 U/µL de Taq polimerase	5 min a 94 °C; 30 s a 94 °C, 30 s a 52 °C, 2 min a 72 °C - 30 x; 7 min a 72 °C	Su <i>et al.</i> , 2006
	Int1R			
<i>intl 2</i>	Int2F	0,3 µM de cada iniciador, 0,3 mM de cada dNTP, 2mM de MgCl ₂ , 0,02 U/µL de Taq polimerase	3 min a 95 °C; 20 s a 98 °C, 15 s a 60 °C, 1 min a 72 °C - 35x; 1 min a 72 °C	Clímaco, 2011
	Int2R			
<i>intl 3*</i>	Int3F Int3R			
Cassetes gênicos*				
Cassetes gênicos de <i>integrans</i> classe 1	5'CS 3'CS	0, 25 µM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl ₂ , 0,03 U/µL de Taq polimerase.	12 min a 94 °C; 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 5 min a 72°C - 35 x; 5 min a 72 °C	Lévesque <i>et al.</i> , 1995
Cassetes gênicos de <i>integrans</i> classe 2	hep74 hep51	0,4 µM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl ₂ , 0,1 U/ µL de Taq polimerase	5 min a 94°C; 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 5 min a 72 °C - 35 x; 10 min 72 °C	Su <i>et al.</i> , 2012

Legenda: *Para melhorar a sensibilidade do método, algumas reações para pesquisa de cassetes gênicos e todas as reações para pesquisa de *integron* classe 3 foram realizadas utilizando *Kapa Taq Polymerase Kit* (KapaBiosystems, Boston, Massachusetts, EUA). As demais forma realizadas com Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Tabela 6. Iniciadores e condições de reação para amplificação e obtenção de sequencias internas de alguns cassetes gênicos.

Iniciadores (5'-3')		Amostra	Mix	Condições de reação
Cassete gênico de <i>integron</i> classe1				
Azul F	CTGTAATTCCGTACACCCACTC	P23	0, 25 µM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl ₂ , 0,03 U/µL de Taq polimerase.	12 min a 94 °C; 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 5 min a 72°C - 35 x; 5 min a 72 °C
Css1 P23 R	GAAAGCCGAAGCCTCCATAA			
Azul F	CTGTAATTCCGTACACCCACTC	C20.4		
Css1 C20.4R	CTACCAAGGCAACGCTATGT			
Css1 P6.5 F	GGGAGCCAATCGGGTTATT	P6.5		
Css1 P6.5 R	TTCAAGTAAGACGGGCTGATAC			
Cassete gênico de <i>integron</i> classe2				
Verde F	GTCAGCAAGATAGCCAGATCAA	T10	0,4 µM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl ₂ , 0,1 U/µL de Taq polimerase	5 min a 94°C; 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 5 min a 72 °C - 35 x; 10 min 72 °C
Css2 T10 R	GCTCCTTGGCATAACGATTAGAG			
Verde F	GTCAGCAAGATAGCCAGATCAA	T20		
Css2 T20	CGAAAGTATGCGGTCGTAACA			
Verde F	GTCAGCAAGATAGCCAGATCAA	T12, T33, C10, C15, C33, C60 e C69		
Amarelo R	CCAAGACTTCGCCTCTAACATAA			

4.1.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIMICROBIANAS

A investigação do perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas das amostras de *E. coli* empregadas no estudo foi realizada por meio do método de difusão em ágar, segundo especificações do CLSI (2015) e com base em esquemas de antibioticoterapia locais para tratamento de pacientes com doença diarreica aguda. A cultura de cada amostra bacteriana foi transferida para tubos contendo solução salina 0,85% até turvação correspondente à escala McFarland 0,5. A seguir, as culturas foram semeadas na superfície de *Mueller Hinton Agar*²⁷ com auxílio de *swab* estéril. Discos comerciais impregnados com antimicrobianos^{28,29} foram depositados na superfície do meio de cultura. Foram utilizados 27 antimicrobianos, a saber: ampicilina, piperacilina, ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, ticarcilina-clavulanato, amoxicilina-clavulanato, cefazolina, cefepime, cefotaxima, ceftriaxona, cefoxitina, cefuroxima, ceftazidima, cefotetam, aztreonam, imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem, gentamicina, tobramicina, amicacina, estreptomicina, ciprofloxacino, levofloxacino, ácido nalidíxico e sulfametoxazol-trimetoprim. A leitura do experimento, por meio da medida dos diâmetros dos halos de inibição das amostras bacterianas e comparação com tabelas padronizadas, foi realizada após 16 a 18 h de incubação a 37 °C. Como controle, foi empregada a amostra de referência *E. coli* ATCC 25922.

Com o objetivo de realizar a pesquisa de amostras produtoras de ESBLs (*Extended-Spectrum β -Lactamases*/ β -lactamases de espectro estendido), o antibiograma foi realizado dispondo o disco de amoxicilina-clavulanato no centro da placa e os discos de cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e aztreonam ao seu redor, a uma distância de 20 mm. A leitura foi realizada pela observação da presença ou ausência de uma “zona fantasma” entre a amoxicilina-clavulanato e os demais discos, que indica a produção de β -lactamase pela amostra bacteriana (EUCAST, 2013).

²⁷ Difco

²⁸ Cecon, São Paulo, SP, Brasil

²⁹ Oxoid, Basingstoke, Hants, UK

4.1.6 ESTATÍSTICA

Para análise dos dados, foi empregado o teste de χ^2 com correção de Yates. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.2 PESQUISA DE *INTEGRONS* EM ESPÉCIMES FECAIS DE CRIANÇAS COM E SEM DIARREIA

4.2.1 GRUPO DE ESTUDO

Foram estudados espécimes fecais de 40 crianças, 20 com doença diarreica aguda e 20 sem doença diarreica. Cada grupo era constituído por 10 meninas e 10 meninos. As crianças recrutadas para o estudo tinham entre 1 e 12 meses de idade.

4.2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA dos espécimes fecais foram realizada empregando-se o *QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit*³⁰ de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de ácidos nucleicos foi determinada por meio de leitura de absorbância a 260 nm usando o *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer*³¹. As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

4.2.3 QUANTIFICAÇÃO DE *INTEGRONS* EM AMOSTRAS FECAIS: QPCR

A avaliação quantitativa de Bacteria, *integrans* classe 1, *integrans* classe 1 clínico e *integrans* classe 2 em espécimes fecais de crianças com doença

³⁰ Qiagen, Hilden, Alemanha

³¹ Thermo Scientific

diarreica aguda e sem diarreia foi realizada por meio de qPCR (*Quantitative polymerase chain reaction*/Reação de polimerização em cadeia quantitativa). As reações foram conduzidas em termociclador *StepOne Real Time PCR System*³² e analisadas com auxílio do *software Fast SYBR® Green 48 well Template for StepOne™ Systems*³³. A lista de iniciadores encontra-se descrita na TAB 7. O par de iniciadores para quantificação de “*integron* clínico” foi desenhado especialmente para ensaio de qPCR usando a ferramenta *PrimerQuest*³⁴.

As reações foram realizadas empregando-se 1 µL de DNA alvo, 5 µL de *SYBR Green PCR Master Mix*³⁵, iniciadores (TAB. 7) e água Milli-Q® estéril em quantidade suficiente para volume final de 10 µL. O programa de amplificação consistia em 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 60 s a 60 °C. Após os 40 ciclos, foi determinada a curva de *melting* com rampa entre 60 e 95 °C. Todos os testes foram realizados em triplicada. A especificidade da amplificação das reações foi comprovada por meio de análise das curvas de *melting* do gene alvo em cada amostra.

Um *pool* de todas as amostras de DNA fecal foi usado como molde para a obtenção dos padrões para a curva de quantificação (CARDINALI-REZENDE *et al.*, 2012). Este *pool* de DNA foi amplificado por meio de PCR convencional usando os iniciadores descritos para a qPCR (TAB. 7) Os *amplicons* obtidos para cada par de iniciadores foram purificados usando uma solução de 20% de polietilenoglicol e NaCl 2,5 M (SAMBROOK *et al.*, 1989). A concentração de DNA deste produto amplificado foi determinada por meio de leitura de absorbância a 260 nm em espectrofotômetro³⁶. Obteve-se, assim, para cada gene alvo, uma amostra padrão. As curvas padrão foram geradas a partir de pelo menos cinco diluições (em triplicata) dos padrões. O limite de detecção de cada par de iniciadores foi determinado usando nove diluições de cada padrão. O número de cópias de cada gene alvo por grama de fezes foi calculado segundo proposto por Kim e colaboradores (2013). Devido à variação do número de óperons que codificam RNA ribossomal por célula em cada espécie de procarioto, a proporção de célula bacterianas em cada grama de fezes foi estimada dividindo-se o número

³² Applied Biosystems

³³ Applied Biosystems

³⁴ IDT

³⁵ Applied Biosystems

³⁶ Nanodrop 1000; Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, EUA

de cópias do gene rDNA16S/grama de fezes encontrado por seis. Este número é uma média que considera os grupos bacterianos predominantes em crianças de um a 12 meses de idade (ARRIETA *et al.*, 2014) e o número de cópias do óperon que codifica o rRNA presente em cada um dos grupos (<http://rrndb.cme.msu.edu>).

4.2.4 ESTATÍSTICA

As médias aritméticas dos resultados de qPCR obtidos para os grupos de crianças com e sem diarreia foram comparados empregando-se o teste t de Student bicaudal para amostras pareadas. As comparações dos dados relativos a *int1*, *int2*, and clinical *int1* em cada grupo foram realizadas empregando-se o teste t de Student bicaudal homoscedástico. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 Tabela 7. Iniciadores para quantificação de bactérias e *integrons* em amostras de fezes de crianças com e sem diarreia por meio de qPCR.

	Iniciadores	Fragmento amplificado	Marcador para:	Tamanho do amplicon (pb)	Concentração do iniciador (μ M)	Referência
338 F 518 R	TACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG	rRNA 16s	Bacteria	180	0,20	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
245 F 345 R	TGAAAGGTCTGGTCATACATGTGA CATTCTGGCCGTGGTTCT	<i>int1</i>	Integrase tipo 1	101	0,25	Skurnik <i>et al.</i> , 2005
312 F 412 R	GCTAGGGCATTAAAGCGATTTT CAGACCATGGGCAGTGAAGA	<i>int2</i>	Integrase tipo 2	101	0,25	
IntClin F IntClin R	CGTGATGCCTGCTTGTCTA GCCGTGGTTCTGGGTTT	<i>int1</i> (clínico)	<i>Integron</i> Clínico	133	0,25	Este trabalho

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Integrans são geneticamente definidos pela presença do gene *intl* que codifica a síntese da enzima integrase. Eles são uma ferramenta importante para a disseminação de genes que codificam resistência a drogas antimicrobianas, especialmente entre bactérias Gram negativas (GILLINGS, 2014). Como já mencionado, estudos mostram que cerca de 10% dos genomas bacterianos sequenciados parecem conter pelo menos um *integron* e que estes podem ser encontrados em uma grande diversidade de ambientes (BOUCHER *et al.*, 2007; CAMBRAY *et al.*, 2010; DOMINGUES *et al.*, 2012; GILLINGS, 2014).

Neste trabalho foram realizadas duas abordagens distintas, com o objetivo de se conhecer melhor a ocorrência de *integrans* em espécimes fecais de crianças com e sem diarreia aguda: (1) detecção e caracterização de *integrans* em amostras de *E. coli* isoladas de fezes e (2) quantificação de *integrans* em amostras fecais.

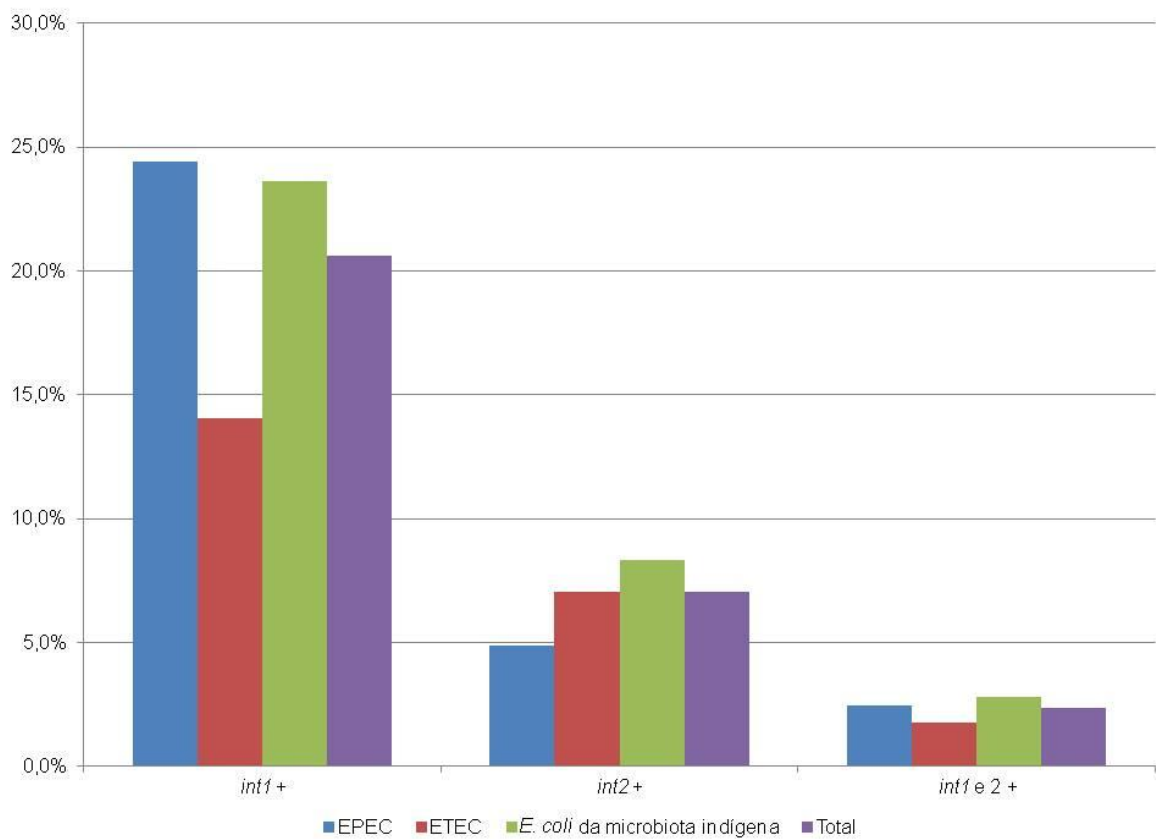
5.1 PESQUISA DE *INTEGRONS* EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE ESPÉCIMES FECALIS DE CRIANÇAS COM E SEM DIARREIA

5.1.1 PESQUISA DE *INTEGRONS* E CASSETES GÊNICOS NAS AMOSTRAS DE *E. coli*

Inicialmente, foi utilizada PCR convencional para a investigação da ocorrência de *integrans* e de cassetes gênicos em amostras de *E. coli* isoladas de espécimes fecais de crianças com e sem doença diarreica. Dentre as 170 amostras estudadas, 43 (25,3%) foram positivas para pelo menos uma das classes de *integron* pesquisadas. *Integrans* classe 1, classe 2 e ambas as classes foram detectados em 20,6% (35/170), 7,1% (12/170) e 2,4% (4/170), respectivamente, das amostras bacterianas estudadas (GRAF. 1). *Integrans* classe 1 foram observados em frequências semelhantes nos três grupos estudados: 24,4% (10/41) das amostras de EPEC, 23,6% (17/72) das amostras de *E. coli* isoladas dos espécimes fecais das crianças sem diarreia e 14,0% (8/57)

das amostras de ETEC. *Integrans* classe 2 também estavam distribuídos em frequências estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) em EPEC, ETEC e amostras indígenas de *E. coli* (GRAF.1).

Gráfico 1. Frequência de *integrans* classes 1 e 2 em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica, *E. coli* enterotoxigênica e *E. coli* da microbiota indígena.



Legenda: EPEC. *Escherichia coli* enteropatogênica ETEC. *Escherichia coli* enterotoxigênica

Assim, de maneira geral, na primeira abordagem deste trabalho, observou-se que, em amostras de *E. coli* isoladas de espécimes fecais, *integrons* classe 1 foram mais comumente encontrados do que *integrons* classe 2. Este dado está consistente com o que já é bem estabelecido na literatura (SU *et al.*, 2006;. VINUÉ *et al.*, 2008;. YANG *et al.*, 2009;. BAKSHI *et al.*, 2014;. GILLINGS, 2014; MOURA *et al.*, 2014;. ZEIGHAMI *et al.*, 2015). Merece destaque a frequência elevada de *integrons* encontradas em amostras de *E. coli* isoladas de indivíduos saudáveis. Tal fato destaca a importância da microbiota indígena como potencial reservatório de resistência antimicrobiana (BAILEY *et al.*, 2010;. RAVI *et al.*, 2014;. MODI *et al.*, 2014; SCHAIK, 2015; FRANCINO, 2016). Bailey e colaboradores (2010) ressaltam, exatamente, a importância de *E. coli*. Neste contexto, os *integrons* merecem destaque: a presença destas estruturas genéticas em bactérias da microbiota indígena é uma fonte potencial para o desenvolvimento e persistência da resistência (RAVI *et al.*, 2014). Causa preocupação, inclusive, o fato de que não somente a microbiota intestinal de adultos alberga genes de resistência, mas, também, como demonstrado neste estudo, a microbiota intestinal de crianças apresentam potencial para tal característica. De fato, estudos já demonstraram, inclusive, a presença de genes de resistência a antimicrobianos em bebês e populações humanas isoladas que nunca utilizaram antimicrobianos. Isto indica a presença destes marcadores na microbiota intestinal humana mesmo sem a pressão seletiva direta de drogas antimicrobianas (FRANCINO, 2016).

Diversos outros estudos também avaliaram a presença e caracterizaram *integrons* em amostras de *E. coli* (CORREIA *et al.*, 2003; SHIBATA *et al.*, 2003; SHEHABI *et al.*, 2006; SU *et al.*, 2006; KADLEC & SCHWAR, 2008; LAPIERRE *et al.*, 2008; VINUÉ *et al.*, 2008; SEPP *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009; BAKSHI *et al.*, 2014; KARGAR *et al.*, 2014; MOURA *et al.*, 2014; ZEIGHAMI *et al.*, 2015). Os resultados publicados por Vinué e colaboradores (2008), por exemplo, são bastante semelhantes àqueles obtidos nesta investigação. No estudo, foram empregadas amostras de *E. coli* oriundas de espécimes fecais de indivíduos saudáveis e a proporção de *integron* classe 1 e 2 foi semelhante à encontrada neste trabalho. Zeighami e colaboradores (2015) também realizaram pesquisa semelhante, mas, incluindo apenas amostras patogênicas clássicas de *E. coli*,

UPEC e DEC, encontrando frequências bastante elevadas de *int1* (87% e 94%, respectivamente) e *int2* (7% e 8%, respectivamente) em comparação ao detectado neste estudo. Além do grupo amostral ser diferente, tal disparidade também pode estar relacionada a diferenças geográficas entre as amostras. Cada população humana pode estar sob alta ou baixa influência do uso de antimicrobianos e, conseqüentemente, sob pressão seletiva que influencia na aquisição e manutenção de *integrons* no *pool* genético microbiano.

Ainda sobre a presença de *integrons* nas amostras bacterianas, merece destaque o fato de que nenhuma das 170 amostras de *E. coli* empregadas nesta investigação albergava *integron* classe 3, corroborando dados da literatura que frequentemente destacam a usual ausência desta classe de *integrons* em amostras do microrganismo (SU *et al.*, 2006, COCCHI *et al.*, 2007; VINUÉ *et al.*, 2008; LAROCHE *et al.*, 2009; KOCZURA *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2012; ZEIGHAMI *et al.*, 2015). Sua ocorrência é, geralmente, reportada em casos isolados (CORREIA *et al.*, 2003; SHIBATA *et al.*, 2003; GILLINGS, 2014; KARGAR *et al.*, 2014).

Dentre as amostras positivas para *integron* classe 1, 71,4% (25/35) também apresentavam cassetes gênicos específicos para esta classe. Por outro lado, esta característica foi observada para todas (12/12) as amostras positivas para *integron* classe 2 (FIG. 3; GRAF. 2). As taxas de detecção de produtos de PCR correspondentes a cassetes gênicos foram, então, bastante elevadas. Algumas amostras que albergavam *integron* classe 1, inclusive, apresentaram mais de um produto de amplificação indicativo da presença de cassete gênico. Tal fato sugere que cada uma destas amostras apresenta mais de uma cópia de *integron* classe 1, o que, posteriormente, foi comprovado por sequenciamento (item 5.1.2). De qualquer forma, este achado destaca a presença considerável de *integrons* e cassetes gênicos no genoma de *E. coli*.

Figura 3. Discriminação de produtos de amplificação de cassetes gênicos (*integrons* classe 2) em gel de agarose 1,5%.

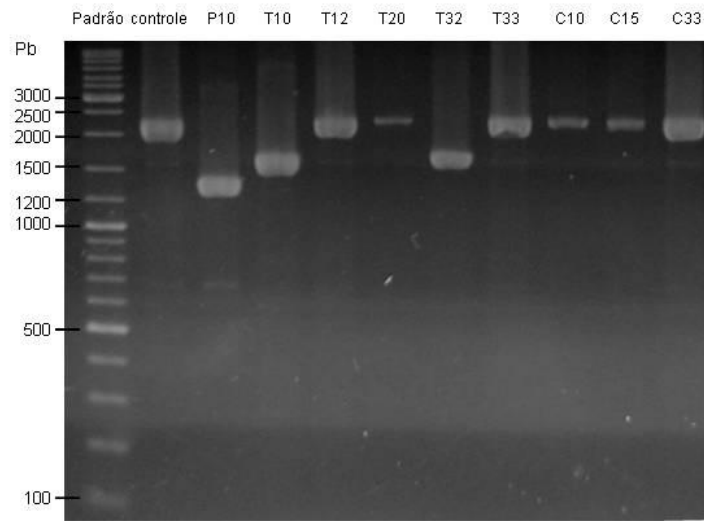


Foto ilustrativa, representando algumas amostras.

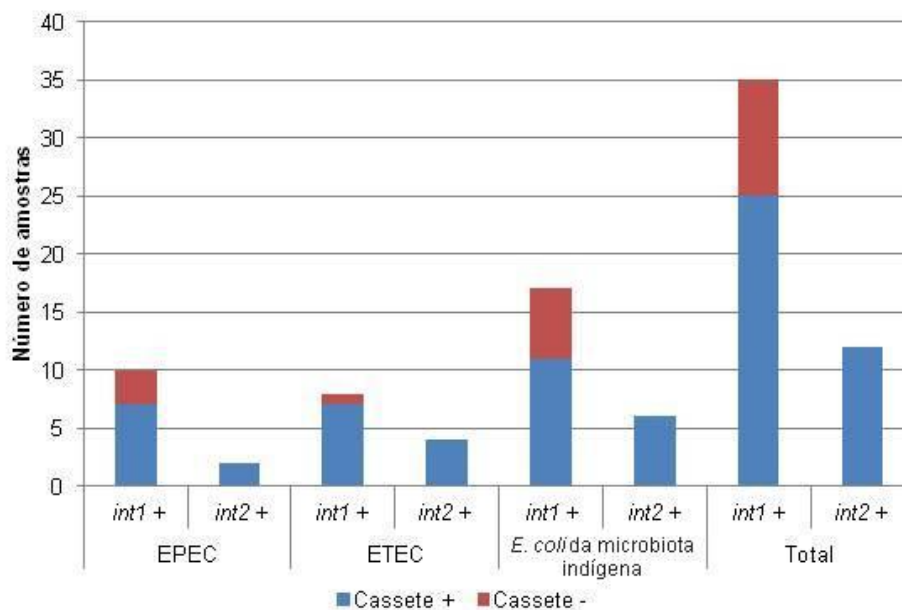
Legenda: Pb. pares de bases;

P. *Escherichia coli* enteropatogênica

T. *Escherichia coli* enterotoxigênica

C. *Escherichia coli* da microbiota indígena.

Gráfico 2 Distribuição de *integrons* e cassetes gênicos em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica, *E. coli* enterotoxigênica e *Escherichia coli* da microbiota indígena.



Legenda: EPEC. *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC. *Escherichia coli* enterotoxigênica

5.1.2 SEQUENCIAMENTO DOS CASSETES GÊNICOS E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIMICROBIANAS

O sequenciamento dos *amplicons* sugestivos de cassetes gênicos encontrados nas amostras bacterianas possibilitou a caracterização do perfil do grupo de estudo no que se refere à composição gênica destas estruturas, contribuindo para o conhecimento geral relativo à caracterização de *integrans* em *E. coli*.

A FIG. 4 apresenta um esquema que ilustra os cassetes gênicos de *integrans* classes 1 e 2 sequenciados. Nestas figuras, é possível observar também quais genes e suas variantes foram detectados, bem como a frequência de observação. As TABs. 8 e 9, por sua vez, apresentam uma relação de amostras positivas para *int1* ou *int2*, respectivos cassetes gênicos sequenciados e perfil de resistência a antimicrobianos.

Foram identificados os genes *aadA*, *sat2*, *dfrA* e *blaOXA-2*, que conferem resistência, respectivamente, a estreptomicina/espectinomicina, estreptotricina, trimetoprima e β -lactâmicos. Também foram identificados genes que codificam proteínas hipotéticas (*orfF*), cujas funções ainda não são conhecidas. Foi possível perceber que, para *integrans* classe 1, as configurações de cassete gênico mais frequentes foram *dfrA-aadA* e *dfrA12-orfF-aadA2* (25,9% cada), seguida pelas configurações constituídas apenas por *dfrA* e *aadA* (22,2% cada). Merece destaque o fato de que o gene *blaOXA-2* foi encontrado em apenas uma amostra bacteriana (3,7% dos cassetes sequenciados) e em cassete gênico de *integrans* classe 1. Genes que codificam proteínas hipotéticas também só foram observados em *integrans* classe 1 (FIG. 4).

A configuração de cassete gênico contendo *dfrA-sat2-aadA* foi a mais frequentemente observada em *integrans* classe 2, ocorrendo em 66,7% dos casos. As outras duas configurações encontradas são muito parecidas com a primeira e representam 33,3% do total (FIG. 4). É interessante observar que o gene *sat2* está presente em todos os cassetes gênicos de *integrans* classe 2 sequenciados e não foi observado em *integrans* classe 1. Observa-se, ainda, uma enorme semelhança entre os cassetes de *integrans* classe 2 (FIG. 4).

Figura 4. Esquema dos cassetes gênicos de *integrons* classe 1 e 2 sequenciados, frequência de cada configuração detectada e variações dos genes encontrados.

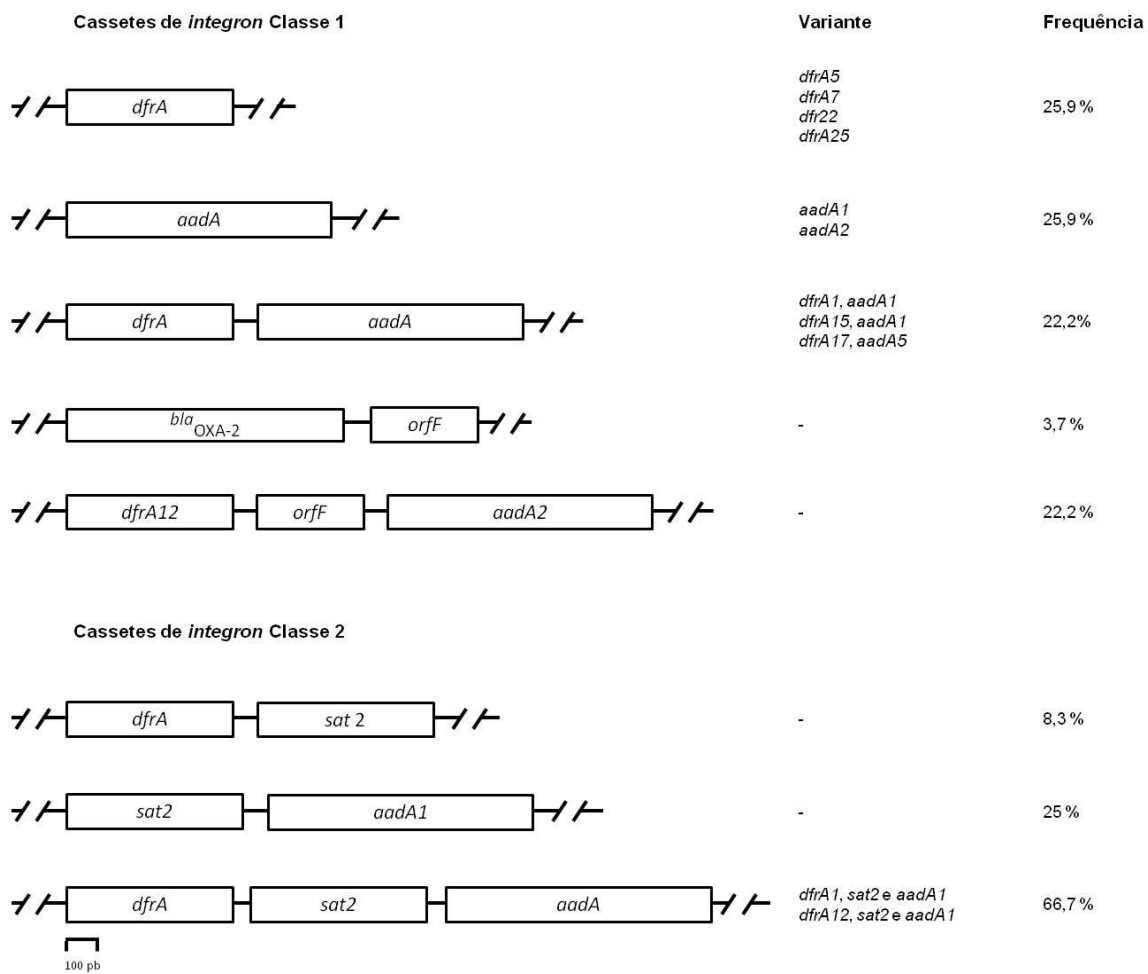


Tabela 8. Relação de amostras positivas para *int1*, respectivos cassetes gênicos (quando encontrados) e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos.

Amostra		Tamanho (pb)	Genes	Resistência fenotípica
EPEC	P6	~2000	<i>dfrA12-orf-aadA2</i>	-
	P10	-	-	AMP, AMC*, SBA, PPT*, TIC, CFZ, CRX*, PRL, EST
	P21	1246	<i>blaOXA-2-orfF</i>	CFO, CRX*
	P22	-	-	-
	P23	1814	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	AMP, SUT, PRL*, EST*
	P27	~2200	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	AMP, SBA, TIC*, CFZ*, CRX, AMI, SUT, PRL, EST
	P28	-	-	CPM*, SUT, EST*
	P35	908	<i>aadA2</i>	CFZ, NAL, EST
	P36	692	<i>dfrA25</i>	CFZ, SUT
	P42	~1700	<i>dfrA15-aadA1</i>	AMP, SBA*, TIC*, CFZ*, CRX*, SUT, PRL, EST*

Tabela 8. Continuação

Amostra		Tamanho (pb)	Genes	Resistência fenotípica	
ETEC	T6	.1	~1800	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	AMP, SBA, TIC*, CFZ*, PRL, EST
		.2	615	<i>dfrA5</i>	EST
	T22		912	<i>aadA2</i>	AMP, AMC*, SBA*, PRL, EST
	T33		907	<i>aadA1</i>	AMP, SUT, PRL, EST
	T40		~1700	<i>dfrA17-aadA5</i>	AMP, AMC*, TIC*, CFZ, CRX*, GEN, CIP, LVX, NAL, SUT, PRL, EST*
		T41			1565
	T47		-	-	AMP, AMC, SBA*, TIC*, CIP, LVX, NAL, SUT, PRL*, EST*
	T62		910	<i>aadA1</i>	AMP, SBA*, PRL*, EST
	T68		741	<i>dfrA7</i>	AMP, AMC*, SBA*, TIC*, CFZ*, SUT, PRL*, EST*
<i>E. coli</i> da microbiota indígena	C5		-	-	SBA*, SUT, EST*
	C15		891	<i>aadA1</i>	AMP, AMC*, SBA, TIC*, CFZ, SUT, PRL, EST
	C20		~2200	<i>dfrA12-orf-aadA2</i>	EST*
	C22		1566	<i>dfrA17-aadA5</i>	AMP, SBA, TIC*, CFZ, CPM*, CRX*, SUT, PRL, EST
	C26		711	<i>dfrA5</i>	AMP, AMC*, CFZ*, CRX*, ATM*, SUT, PRL, EST
	C29		691	<i>dfrA5</i>	AMP, AMC, SBA, TIC*, CFZ, CTX*, SUT, PRL, EST
	C30	.1	~1800	<i>dfrA12-orfF-aadA5</i>	AMP, CFZ*, CRX*, SUT, PRL, EST
		.2			655
	C34		-	-	AMP, TIC*, CFZ, CRX*, CAZ*, NAL, SUT, PRL, EST, EST
	C39		-	-	CPM*
	C45		706	<i>dfr22</i>	AMP, TIC*, CFZ*, CRX*, GEN, TOB, NAL*, SUT, PRL*, EST

Tabela 8. Continuação

Amostra	Tamanho (pb)	Genes	Resistência
C52	-	-	AMP, CFZ, PRL, EST*
C54	1562	<i>dfrA17-aadA5</i>	AMP, TIC*, CFZ, CRX*, SUT, PRL, EST
C56	-	-	CFZ*, CRX*, NAL, SUT, EST*
<i>E. coli</i> da microbiota indígena	910	<i>aadA1</i>	AMP, SBA*, TIC*, CFZ, CRX*, SUT, PRL, EST
C63	~1500	<i>dfrA1-aadA1</i>	AMP, SBA, TIC, CFZ, CRX*, SUT, PRL, EST
C65	910	<i>aadA1</i>	AMP, AMC, SBA, TIC*, CFZ, NAL, SUT, PRL, EST
C77	-	-	AMP, CFZ, CRX*, SUT, PRL*, EST

Legenda: *. resistência intermediária; ~. aproximadamente; PPT. piperacilina-tazobactam;
 AMP. ampicilina; CFZ. cefazolina; GEN. gentamicina;
 TOB. tobramicina; AMC. amoxicilina-clavulanato; CPM. cefepime;
 SBA. ampicilina-sulbactam, TIC. ticarcilina-clavulanato; EST. Estreptomicina;
 CTX. cefotaxima; CRO. ceftriaxona; CFO. cefoxitina;
 CRX. cefuroxima; IMP. imipenem; MER. meropenem;
 ETP. ertapenem; DOR. doripenem; PIP. piperacilina;
 AMI. amicacina; CIP. ciprofloxacino; LEV. levofloxacino;
 CTT. cefotetam; CAZ. ceftazidima; ATM. aztreonam;
 NAL. ácido nalidíxico; SUT. sulfametoxazol-trimetoprima
 EPEC. *Escherichia coli* enteropatogênica ETEC. *Escherichia coli* enterotoxigênica
 -. Cassete gênico não encontrado

Tabela 9. Relação de amostras positivas para *int2*, respectivos cassetes gênicos e perfil de resistência e suscetibilidade a antimicrobianos.

Amostra	Tamanho (pb)	Genes sequenciados	Resistência	
EPEC	P10	1267	<i>dfrA1-sat 2</i>	AMP, AMC*, SBA, PPT*, TIC, CFZ, CRX*, PRL, EST
	P44	~2111	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	CFZ*, SUT, EST
ETEC	T10	1547	<i>sat2-aadA1</i>	AMC, CFZ, CFO, EST
	T20	~2100	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	CRX, MER, CIP, LVX, NAL
	T32	1557	<i>sat2-aadA1</i>	EST
	T33	2105	<i>dfrA12-sat2-aadA1</i>	AMP, SUT, PRL, EST
<i>E. coli</i> da microbiota indígena	C10	~2100	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	CIP, LVX, NAL
	C15	2091	<i>dfrA12-sat2-aadA1</i>	AMP, AMC*, SBA, TIC*, CFZ, SUT, PRL, EST
	C33	2111	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	AMP, AMC*, SBA, TIC*, CFZ, CRO, CRX*, CAZ*, CIP*, NAL, SUT, PRL, EST
	C50	1557	<i>sat2-aadA1</i>	CIP*, EST
	C60	2115	<i>dfrA12-sat2-aadA1</i>	AMP, CFZ*, CRX*, SUT, PRL, EST
	C69	2114	<i>dfrA12-sat2-aadA1</i>	SUT, EST
Legenda:	*. resistência intermediária;	~. aproximadamente;	PPT. piperacilina-tazobactam;	
	AMP. ampicilina;	CFZ. cefazolina;	GEN. gentamicina;	
	TOB. tobramicina;	AMC. amoxicilina-clavulanato;	CPM. cefepime;	
	SBA. ampicilina-sulbactam,	TIC. ticarcilina-clavulanato;	EST. Estreptomicina;	
	CTX. cefotaxima;	CRO. ceftriaxona;	CFO. ceftioxitina;	
	CRX. cefuroxima;	IMP. imipenem;	MER. meropenem;	
	ETP. ertapenem;	DOR. doripenem;	PIP. piperacilina;	
	AML. amicacina;	CIP. ciprofloxacino;	LEV. levofloxacino;	
	CTT. cefotetam;	CAZ. ceftazidima;	ATM. aztreonam;	
	NAL. ácido nalidíxico;	SUT. sulfametoxazol-trimetoprima		
	EPEC. <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica	ETEC. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica		

Uma explicação plausível para tal fato, como já discutido, é a presença de um *stop codon* no interior da sequência gênica de *int2*, que o torna inativo. Isto limita a habilidade desta classe de *integrons* em adquirir e perder cassetes gênicos, tornando o arranjo gênico altamente conservado e com variedade reduzida em comparação com *integrons* classe 1 (WHITE *et al.*, 2001; HANSSON *et al.*, 2002; GILLINGS, 2014).

Kargar e colaboradores (2014) também trabalharam com *E. coli* isolada de fezes de crianças e observaram frequência de amostras que abrigavam *integron* classe 1 e que também eram positivas para cassete gênico semelhante à observada neste estudo. Entretanto, eles observaram a presença de cassete gênico para apenas 45,3% das amostras que albergavam *integron* classe 2, resultado diferente do presente trabalho. Além disso, os autores não sequenciaram os cassetes, mas, demonstraram correlação positiva estatisticamente significativa entre a presença de *integron* classes 1 e 2 e resistência a diversos antimicrobianos. Tais correlações diferem, mais uma vez, do que foi encontrado neste trabalho, no qual o sequenciamento não demonstrou grande variedade de genes de resistência nos cassetes estudados. O único resultado em comum é a correlação positiva entre cassete de *integron* classe 2 e resistência a estreptomicina (dados apresentados a seguir). Cabe aqui destacar que, embora a correlação positiva entre a resistência fenotípica e a detecção de produtos de amplificação sugestivos de cassetes sejam um aspecto interessante a ser estudado, isto não isenta a necessidade do sequenciamento dos cassetes e, conseqüentemente, a verificação precisa do seu conteúdo gênico.

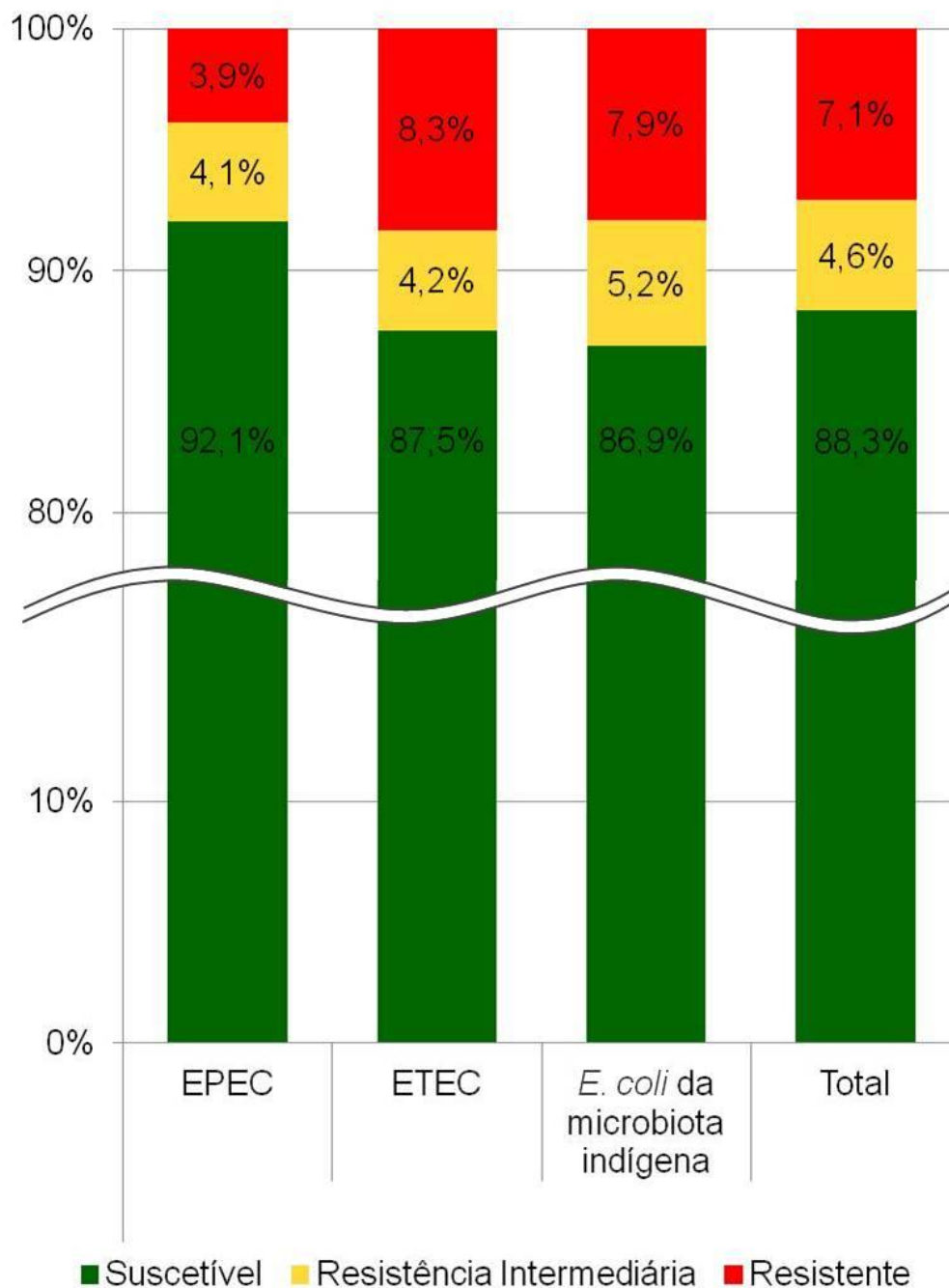
Por outro lado, muitos estudos incluíram o sequenciamento de cassetes gênicos. Como na presente investigação, Vinué e colaboradores (2008) encontraram combinações dos genes *dfrA*, *aadA* e *orfF* para cassetes de *integron* classe 1. Já em cassetes de *integrons* classe 2, os pesquisadores observaram apenas o arranjo *dfrA-sat-aadA*, presentes em 63,6% de *integrons* classe 2 neste trabalho. Resultados semelhantes foram descritos por diversos outros estudos (SANDVANG, 1999; ADRIAN *et al.*, 2000; KADLEC & SCHWAR, 2008; YANG *et al.*, 2009; SHAHCHERAGHI *et al.*, 2014; ZEIGHAMI *et al.*, 2015).

Para a caracterização das amostras de *E. coli* no que se refere ao perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas foram realizados, ao todo, 4590

testes de antibiograma. Parte dos resultados encontram-se descritos em Oliveira e colaboradores (2017). O grupo EPEC, embora tenha se destacado na detecção de *int1* (item 5.1.1), foi o que apresentou a menor frequência de resistência e resistência intermediária - 3,9% (43/1107) e 4,1% (45/1107), respectivamente [no total (resistência + resistência intermediária), 8% (88/1107)]. As amostras de *E. coli* da microbiota indígena e de ETEC apresentaram frequência de resistência muito semelhantes. Cerca de 7,9% (154/1944) e 5,2% (101/1944) das amostras de *E. coli* da microbiota indígena apresentaram resistência e resistência intermediária, respectivamente, aos antimicrobianos testados [no total, 13,1% (255/1944)]. ETEC, por sua vez, apresentou frequência de resistência e resistência intermediária equivalente a 8,3% (125/1539) e 4,2% (67/1539), respectivamente [no total, 12,5% (192/1539)] (GRAF. 3). Cerca de 19,5% (8/41), 28,1% (16/57) e 18,1% (13/72) das amostras de EPEC, ETEC e *E. coli* da microbiota indígena, respectivamente, foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados.

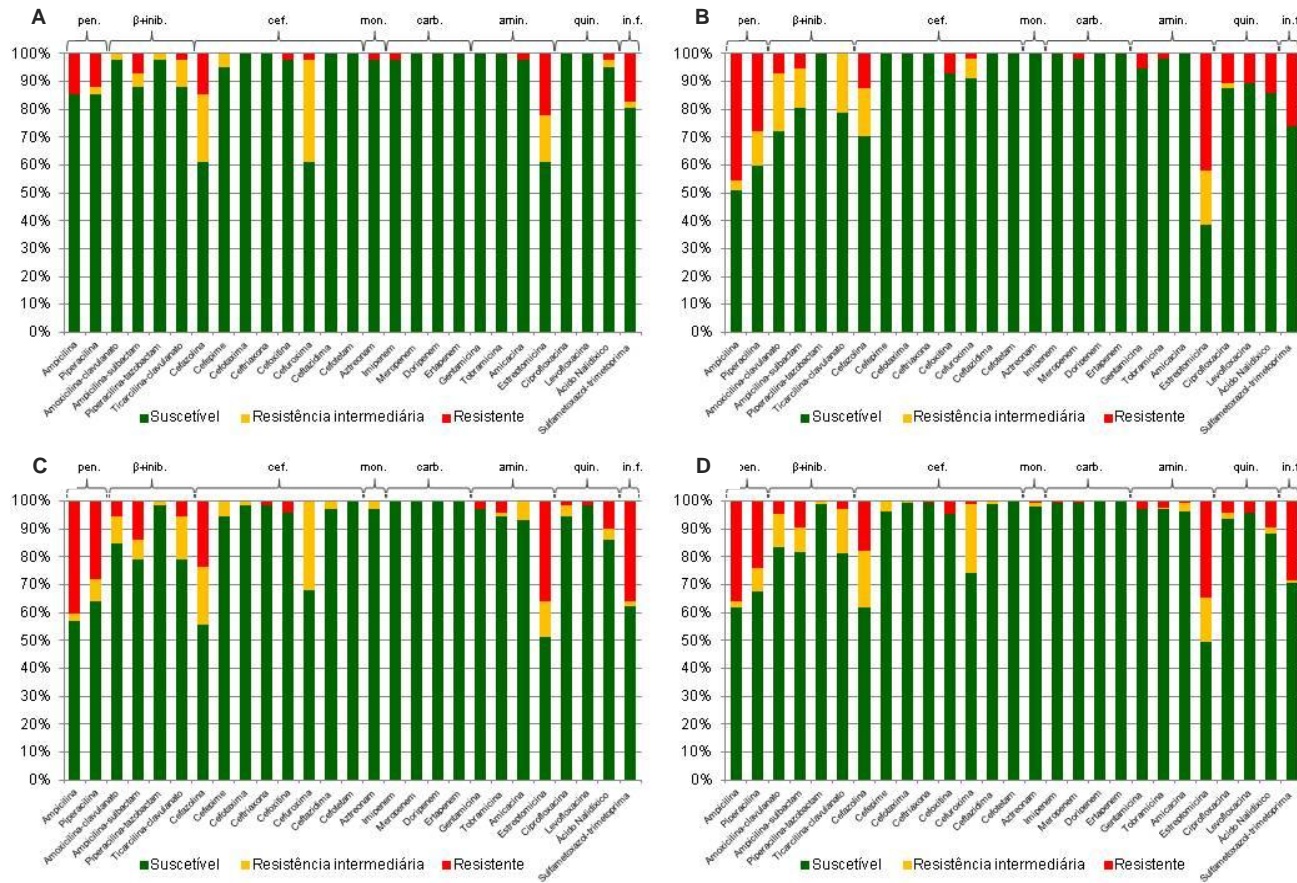
O GRAF. 4 apresenta o perfil de suscetibilidade das amostras de EPEC frente aos antimicrobianos testados. É possível observar que as maiores taxas de resistência ocorrem para estreptomicina (22,0%; 9/41), sulfametoxazol-trimetoprima (17,1%; 7/41), ampicilina (14,6%; 6/41), cefazolina (14,6%; 6/41) e piperacilina (12,2%; 5/41). As maiores taxas de resistência intermediária foram observadas, por sua vez, para cefuroxima (36,6%; 15/41), cefazolina (24,4%; 10/41) e estreptomicina (17,1%; 7/41). Todas as amostras de EPEC apresentaram suscetibilidade a cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, meropenem, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacino, levofloxacino, cefotetan, doripenem e ertapenem.

Gráfico 3. Frequência de suscetibilidade, resistência intermediária e resistência considerando todos os grupos de amostras (*Escherichia coli* enteropatogênica, *E. coli* enterotoxigênica e *E. coli* da microbiota indígena) e todos os antimicrobianos testados.



Legenda: EPEC. *Escherichia coli* enteropatogênica ETEC. *Escherichia coli* enterotoxigênica

Gráfico 4. Frequência de resistência, resistência intermediária e suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* frente aos diferentes antimicrobianos testados



Legenda: A. EPEC;

B. ETEC;

C. *E. coli* da microbiota indígena;

D. Todas as amostras de *E. coli*

pen. Penicilinas

β+inib. Penicilina e inibidor de β-lactamases

cef. cefalosporinas

mon. monobactams

carb. carbapenens

amin. aminoglicosideos

quin. quinolonas

in.f. inibidor da via do folato

Para as amostras de ETEC (GRAF. 4.B), foi possível observar maior frequência de resistência a ampicilina (45,6%; 26/57), estreptomicina (42,1%; 24/57), piperacilina (28,1%; 16/57) e sulfametoxazol-trimetropima (26,3%; 15/57). Já as maiores taxas de resistência intermediária foram observadas para amoxicilina-clavulanato e ticarcilina-clavulanato (ambos 21,1%; 12/57), estreptomicina (19,3%; 11/57), cefazolina (17,5%; 10/57) e ampicilina-sulbactam (14%; 8/57). Neste grupo, todas as amostras foram suscetíveis a piperacilina-tazobactam, cefepime, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, aztreonam, imipenem, ampicacina, cefotetan, doripenem e ertapenem.

As amostras de *E. coli* da microbiota indígena (GRAF. 4.C), por sua vez, apresentaram maior frequência de resistência a ampicilina (40,3%; 29/72), sulfametoxazol-trimetoprima (36,1%; 26/72), estreptomicina (36,1%; 26/72) e piperacilina (27,8%; 20/72). As maiores taxas de resistência intermediária foram encontradas para cefuroxima (31,9%; 23/72), cefazolina (20,8%; 15/72), ticarcilina-clavulanato (15,3%; 11/72) e estreptomicina (12,5%; 9/72). Apenas amostras suscetíveis a imipenem, meropenem, cefotetam, doripenem e ertapenem foram observadas neste grupo.

Considerando todas as amostras diarreiogênicas (EPEC e ETEC) testadas, não foi observada resistência apenas a cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefotetam, doripenem e ertapenem. De forma geral, é possível observar, ainda, uma frequência de resistência ligeiramente inferior àquela observada para as amostras de *E. coli* da microbiota indígena, com exceção de pouquíssimas drogas (GRAF. 4.A, B e C).

Por fim, o GRAF. 4.D apresenta uma média da frequência de resistência/suscetibilidade de todas as amostras de *E. coli* empregadas neste estudo. É possível observar que nenhuma amostra estudada apresentou resistência a cefotetam, doripenem e ertapenem. De maneira geral, as amostras bacterianas foram muito mais suscetíveis aos carbapenens do que a qualquer outro grupo de antimicrobianos testados (GRAF. 4). Tal fato pode ser explicado pela restrição do uso dessa classe de antimicrobianos à casos graves de infecções hospitalares, infecções por amostras multirresistentes ou infecções polimicrobianas (MARTÍNEZ *et al.*, 2010). Assim, as amostras de *E. coli* empregadas neste estudo dificilmente teriam sofrido pressão seletiva por esta

classe de antimicrobianos.

Por outro lado, considerando todas as amostras empregadas neste estudo (GRAF. 4.D), os antimicrobianos que mais se destacaram pelas elevadas taxas de resistência foram ampicilina (35,9%; 61/170), estreptomicina (34,7%; 59/170) sulfametoxazol-trimetoprima (28,2%; 48/170), piperacilina (24,1%; 41/170) e cefazolina (17,6%; 30/170). As maiores taxas de resistência intermediária, por sua vez, foram observadas para cefuroxima (24,7%; 42/170), cefazolina (20,6%; 35/170), ticarcilina-clavulanato (15,9%; 27/170), estreptomicina (15,9%; 27/170) e amoxicilina-clavulanato (11,8%; 20/170). Observa-se, então que as maiores taxas de resistência são, no geral, para os antimicrobianos mais antigos em uso na clínica (SAGA & YAMAGUCHI, 2009) e/ou para aqueles mais frequentemente receitados para tratamento de infecções ambulatoriais (LEVIN *et al.*, 2011). É importante destacar que não foi detectada a presença de nenhuma amostra produtora de ESBL, sugerindo que outros mecanismos de resistência à β -lactâmicos estejam presentes nas amostras que apresentaram resistência a estes antimicrobianos.

Merece destaque o fato de que cerca de 7,3% (3/41), 12,3% (7/57) e 19,4% (14/72) das amostras de EPEC, ETEC e *E. coli* da microbiota indígena, respectivamente, foram resistentes, a cinco ou mais antimicrobianos distintos, muitas vezes, de mais de três classes diferentes, sugerindo multirresistência [cerca de 36 amostras (21,2%) dentre as 170 estudadas, encaixam-se nesta categoria]. Considerando, além da resistência, a resistência intermediária, esta taxa sobe para 12,2% (5/41), 33,3% (19/57) e 34,7% (25/72), respectivamente.

Cerca de 60,0% (3/5), 36,8% (7/19) e 56,0% (14/25) das amostras de EPEC, ETEC e *E. coli* da microbiota indígena, respectivamente, que apresentavam resistência ou resistência intermediária para cinco ou mais antimicrobianos distintos, albergavam, pelo menos, uma das classes de *integron* pesquisadas. As TABs. 8 e 9 apresentam as características dos cassetes gênicos observados nestas amostras. Em contrapartida, dentre as amostras suscetíveis a todos os antimicrobianos ou que apresentavam resistência ou resistência intermediária a no máximo quatro antimicrobianos, a frequência de detecção de *integrans* foi bem menor, correspondendo a 22,2% (8/36), 10,5% (4/38) e 14,9% (7/47) para EPEC, ETEC e *E. coli* da microbiota indígena, respectivamente.

Considerando somente amostras suscetíveis a todos os antimicrobianos testados, 25,0% (2/8) das amostras de EPEC e nenhuma amostra de ETEC e *E. coli* da microbiota indígena apresentavam *integron*.

Os resultados sugerem que os *integrans* estão diretamente relacionados à habilidade de resistência antimicrobiana presente nas amostras bacterianas estudadas, independentemente da identificação de genes de resistência nos cassetes gênicos. De certa forma, Kargar e colaboradores (2014) mostraram isto em seu estudo, já que encontraram elevada frequência da presença de *integron* em amostras de *E. coli* multiresistentes. Também, Sepp e colaboradores (2009) se depararam com resultados semelhantes, tendo constatado que a frequência de *integrans* era maior em amostras de *E. coli* indígenas isoladas de indivíduos que faziam uso de antimicrobianos do que em indivíduos que não empregavam tal terapia. Além disso, eles perceberam que todas as amostras bacterianas que albergavam *integron* apresentavam CIMs para todos antimicrobianos testados maiores que aquelas de amostras que não possuíam *integron*.

No que se refere à composição dos cassetes gênicos, os dados relatados por Vinué e colaboradores (2008), como já mencionado, são muito semelhantes aos observados neste estudo. Por outro lado, os autores reportaram que todas as amostras positivas para *integron* eram resistentes a pelo menos uma droga antimicrobiana, diferentemente dos resultados do presente estudo (TAB. 8).

É interessante destacar ainda que se observou, neste estudo, correlação entre a presença de alguns marcadores de resistência em cassetes gênicos e expressão fenotípica de resistência. Assim, detectou-se resistência a sulfametoxazol-trimetoprima e a presença do gene *dfrA*, bem como a resistência a cefoxitina e cefuroxima e a presença do gene *bla* OXA-2 (TAB. 8 e 9). Os demais genes encontrados nas amostras bacterianas, a saber, *aadA* e *sat2*, conferem resistência a estreptomicina/espectinomicina (HOLLINGSHEAD & VAPNEK, 1985; SANDVANG, 1999; ADRIAN *et al.*, 2000) e estreptotricina (SHAW *et al.*, 1993; KADLEC & SCHWAR, 2008), respectivamente, eficazes contra *E. coli*, mas cuja inclusão no antibiograma não é sugerida pelo CLSI (2015). Por esta razão, as drogas antimicrobianas não foram, inicialmente, incluídas no painel testado neste trabalho. Considerando que os mesmos não são empregados na prática clínica, a identificação destes genes em *E. coli* é um forte indício de intercâmbio

de marcadores de resistência entre bactérias em ambientes densamente colonizados, como o intestino (BAILEY *et al.*, 2010; MODI *et al.*, 2014; SCHAİK, 2015). Logo, é importante destacar, novamente, a relevância deste estudo, já que ilustra a participação do *integron* no fluxo gênico e como reservatório para a transmissão de genes de resistência (RAVI *et al.*, 2014).

Curiosamente, estreptomicina foi o antimicrobiano com a segunda maior taxa de resistência observada neste estudo (34,7%; 59/170), atrás somente da ampicilina (35,9%; 61/170). Entretanto, considerando também amostras com resistência intermediária, estreptomicina torna-se o antimicrobiano com a maior taxa de resistência, apresentando alguma forma de resistência para 50,6% (86/170) das amostras bacterianas testadas. Neste caso, a segunda maior taxa de resistência foi encontrada para ampicilina e cefazolina [ambas 38,2% (65/170)]. Destaca-se, ainda o fato de que os dados genotípicos e fenotípicos encontrados neste estudo, no que se refere à resistência a estreptomicina, são bem parecidos: dentre as 27 amostras que apresentavam o gene *aadA* em pelo menos um cassete gênico caracterizado, 24 (88,9%) apresentaram, também, resistência fenotípica à estreptomicina (TAB. 8 e 9). Segundo Saga & Yamaguchi, 2009, estreptomicina foi inicialmente isolada em 1944. Dessa forma, como já brevemente discutido, as elevadas taxas de resistência apresentadas para este antimicrobiano, bem como a detecção do gene *aadA* em *integrons* de amostras de *E. coli* da microbiota indígena, podem ser atribuídas ao seu uso clássico na prática clínica.

A taxa elevada de resistência à combinação sulfametoxazol-trimetoprima [28,2% (48/170); considerando também resistência intermediária, 29,4% (50/170)] é outra ocorrência interessante que este estudo apresenta. Tal evento, muito provavelmente, está associado à presença do gene *dfrA*, que foi observado em 70,3% e 75,0% dos cassetes identificados em *integrons* classes 1 e 2, respectivamente, e do gene *sul1* que, segundo a literatura científica, está comumente associado à região 3'SC do *integron* classe 1 (CARATTOLI, 2001; MAZEL, 2006; CAMBRAY *et al.*, 2010; GILLINGS, 2014). É importante destacar, inclusive, que 28 das 48 (58,3%) amostras que apresentavam resistência a sulfametoxazol-trimetoprima eram positivas para *int1*, ao passo que a frequência de *integron* em amostras suscetíveis a sulfametoxazol-trimetoprima foi de apenas

12,5% (15/120). Além disso, dentre as 26 amostras que apresentavam o gene *dfrA* no cassete caracterizado, 20 (76,9%) eram resistentes a sulfametoxazol-trimetoprima (TAB. 8 e 9). Assim, o resultado da análise fenotípica e a caracterização dos *integrons* e seus respectivos cassetes gênicos também são concordantes.

Ainda com relação à combinação sulfametoxazol-trimetoprima, é importante frisar que esta é uma das escolhas para o tratamento das infecções do trato urinário (ITU) (LEVIN *et al.*, 2011.). Sendo assim, as elevadas taxas de resistência e a detecção dos gene *dfrA* observados em *E. coli* isolados de espécimes fecais sugerem que esta combinação de antimicrobianos pode não representar mais uma forma eficaz tratamento para esta infecção, considerando que a maioria das UPEC são de origem intestinal (WILES *et al.*, 2008).

Outra ocorrência intrigante detectada neste estudo foi a identificação pontual do gene *bla* OXA-2 no cassete gênico de uma amostra de EPEC. Outras OXA β -lactamases também já foram identificadas no contexto de um *integron* (NAAS *et al.*, 1998; NAVIA *et al.*, 2002; MULVEY *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2012), embora poucos trabalhos os tenham identificado em amostras de *E. coli* (DUBOIS *et al.*, 2003). Sendo assim, este achado também destaca a relevância deste trabalho. Entretanto, é importante chamar a atenção para o fato de que a produção de β -lactamases não foi identificada no *screening* fenotípico e a amostra em questão foi resistente a apenas dois antimicrobianos β -lactâmicos, cefoxitina e cefuroxima.

Ainda em relação à caracterização dos cassetes gênicos, foram detectados genes que codificam proteínas hipotéticas de função desconhecida, denominados *orfFs*. Estes genes são mais comumente encontrados em *integrons* cromossômicos observados em amostras ambientais, já que *integrons* presentes em “patógenos” são, frequentemente, dirigidos pela seleção por drogas antimicrobianas (GILLINGS, 2014). Entretanto, também podem ser encontrados em *integrons* “móveis” associados à resistência antimicrobiana, nos quais, inclusive, podem apresentar funções não relacionadas à codificação de proteínas (PARTRIDGE *et al.*, 2009). Isto não impede que estas *orfFs* sejam representantes de novos genes, ainda não caracterizados, de resistência ou que favorecem a bactéria em condições de estresse.

Visto os resultados encontrados, é importante destacar que nem sempre um gene detectado no genoma bacteriano é expresso. Dessa forma, nem todas as amostras que apresentam cassetes gênicos com genes de resistência também apresentam a expressão fenotípica da resistência. Isto pode estar relacionado, por exemplo, à eficiência do promotor presente no *integron* (ROE et al 2003). Além disso, os dados deste trabalho provenientes das análises genotípicas e fenotípicas analisados em conjunto sugerem que, nas amostras bacterianas estudadas, diversos marcadores de resistência antimicrobiana não estão localizados em cassetes gênicos. Os resultados do estudo fenotípico demonstraram que o perfil de resistência observado foi, muitas vezes, bem mais amplo que aquele previsto pelos genes detectados nos cassetes gênicos. Deve-se lembrar que os marcadores de resistência podem, também, estar localizados em outras estruturas genéticas, como plasmídios e transpósons, dentre outros. Entretanto, a não detecção de genes de resistência em um cassete não implica que a característica fenotípica não esteja relacionada a um *integron*, uma vez que o cassete gênico no qual o gene se encontra pode ainda não ter sido identificado ou o gene pode estar presente na região conservada do *integron* (VINUÉ et al., 2008), não contemplada completamente pelos iniciadores utilizados neste estudo. Além disso, como já discutido, as evidências sugerem que a presença de um *integron* pode estar diretamente relacionada a presença da multirresistência.

Por fim, não se pode deixar de discutir o fato de que amostras de *E. coli* da microbiota indígena empregadas neste estudo apresentaram, no geral, taxas de resistência antimicrobiana consideráveis. Tal fato ilustra, mais uma vez, a importância da microbiota intestinal como reservatório de resistência (BAILEY et al., 2010) e alerta para o potencial que o intestino possui para disseminação desta característica (HUDDLESTON, 2014). Sendo assim, a ocorrência de transferência horizontal de genes entre microrganismos carreadores de *integrans*, incluindo outras enterobactérias, pode contribuir para a disseminação de *integrans* associados à resistência a drogas antimicrobianas (HALL et al., 2002; BAKHSHI et al., 2014).

Como já discutido anteriormente, a estrutura *integron*/cassete gênico representa uma importante fonte de evolução bacteriana, apresentando papel fundamental na “adaptação” frente à antibioticoterapia. Uma vez que os *integrans*

possuem acesso a um vasto conjunto de cassetes gênicos com funções diversas e que foram pré-adaptados para a aquisição e a expressão de determinantes de resistência, eles estão prontos para responder rapidamente à forte pressão de seleção imposta pelo uso de antimicrobianos (GILLINGS, 2014).

Estas unidades genéticas vêm acumulando um grande número de genes de resistência do *pool* do ambiente no qual estão inseridas. Também vêm crescendo em abundância, o que aumenta a possibilidade de interação com outros DNAs, gerando novos e cada vez mais complexos “elementos móveis” que carregam resistência a múltiplas classes de drogas antimicrobianas clássicas, desinfetantes e metais pesados (GILLINGS, 2014). A presença de *integrons* pode, então, constituir um processo adaptativo em ambientes em que haja grande pressão de antimicrobianos (SKURNIK *et al.*, 2006). Assim, as bactérias no intestino, incluindo *E. coli*, não são somente capazes de adquirir marcadores de resistência, mas também de promover a transmissão destes genes para outras bactérias. E os *integrons* estão diretamente envolvidos neste processo (RAVI *et al.*, 2014).

5.2 PESQUISA DE *INTEGRONS* EM ESPÉCIMES FECAIS DE CRIANÇAS COM E SEM DIARREIA

A microbiota intestinal é um ecossistema complexo, com uma elevada prevalência de marcadores de resistência a drogas antimicrobianas e uma elevada taxa de transferência horizontal de genes (RAVI *et al.*, 2015). As bactérias intestinais não são só capazes de adquirir genes de resistência, mas, também, ajudam na disseminação dos mesmos. Como já discutido exaustivamente, os *integrons* são uma importante ferramenta neste contexto e podem contribuir, de maneira importante, para a multirresistência (GILLINGS, 2014; RAVI *et al.*, 2014).

Visando o melhor conhecimento do tema, a presença e a importância dos *integrons* em diversos ambientes têm sido investigadas. Alguns trabalhos

estudaram os *integrans* em bactérias isoladas (VINUÉ *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2009; SU *et al.*, 2012; MOURA *et al.*, 2014), ao passo que outros avaliaram sua presença em ambientes complexos (HARDWICK *et al.*, 2008; OLIVEIRA-PINTO *et al.*, 2016). Entretanto, no que se refere a espécimes fecais de seres humanos, tivemos acesso a apenas uma publicação prévia (RAVI *et al.*, 2015).

No presente estudo, a presença de *int1*, *int2* e *int1* clínico em espécimes fecais de crianças com e sem diarreia foi avaliada por meio de qPCR. qPCR é uma versão modificada da PCR convencional, cuja principal vantagem é possibilidade de obtenção de dados quantitativos com acurácia e sensibilidade elevadas (NAVARRO *et al.*, 2015). A curva padrão é um passo importante da técnica e deve ser bem planejada. Dessa forma, para a construção da curva padrão fidedigna, foi utilizado o produto de amplificação originado do *pool* de todas as amostras de DNA fecal utilizadas neste estudo. Assim, a curva padrão assemelha-se às amostras tanto quanto possível, seja na presença de interferentes para a qPCR (que são abundantes em amostras de DNA extraídas de amostras complexas, como é o caso das fezes), seja no conteúdo CG de diferentes genes de procariotos, que levaria a formação de mais de um pico na curva de *melting* (HARDWICK *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2007; CARDINALI-REZENDE *et al.*, 2012).

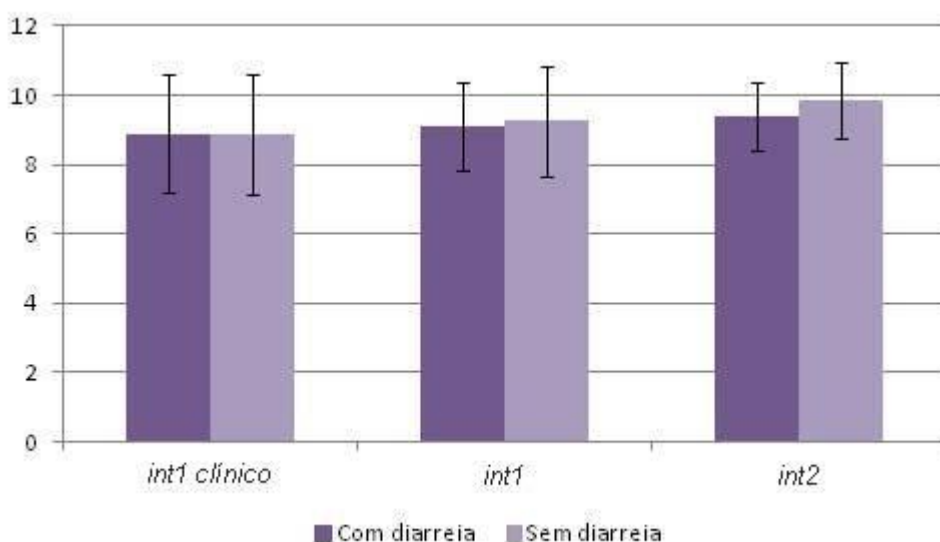
As curvas padrão foram geradas com sucesso para cada marcador gênico pesquisado, apresentando coeficiente de correlação (*r*) variando de 0,9919 a 1,0. O *slope* variou de -3,6449 a -3,1276, ao mesmo tempo que a eficiência das reações variaram entre 90 e 109%. Apenas duas amostras de fezes (oriundas de uma criança com e uma criança sem diarreia) estavam abaixo do limite de detecção para o marcador de *integron* clínico. As análises das curvas de *melting* mostraram apenas um pico para todos os iniciadores empregados, comprovando a especificidade dos ensaios (ANEXO I; GRAF. 5 a 7).

O protocolo empregado para a pesquisa de *integron* clínico foi baseada no trabalho de Gillings e colaboradores (2015), que defendem que o gene que codifica a integrase do *integron* classe 1 é um bom marcador de ação antropogênica. Os autores sugeriram um par de iniciadores específicos para a pesquisa de genes que codificam a integrase presente em *integrans* de amostras clínicas. Neste trabalho foi usado o mesmo princípio descrito pelos autores para

desenhar novos iniciadores para identificação de *integrons* clínicos, mas, específicos para uso em qPCR (TAB. 7), ou seja, iniciadores que produzam um *amplicon* pequeno. Assim, foi possível avaliar, separadamente, a presença, nas amostras fecais, de *integrons* com elevada probabilidade de conter marcadores de resistência a antimicrobianos em seus cassetes.

Diferentemente de Ravi e colaboradores (2015), *integrons* foram encontrados em todas as amostras fecais empregadas neste estudo. Foram detectados, em média, $1,2 \times 10^9$, $2,6 \times 10^9$ e $7,7 \times 10^8$ cópias dos marcadores para *int1*, *int2* e *int1* clínico respectivamente, para cada grama de fezes de criança com diarreia. Similarmente, para o grupo controle (crianças sem diarreia), foram encontrados, em média, $1,8 \times 10^9$, $6,7 \times 10^9$ e $7,4 \times 10^8$ cópias de *int1*, *int2* e *int1* clínico por grama de fezes (GRAF. 8). A distribuição de *int1*, *int2* e *int1* clínico foi estatisticamente similar ($p > 0,05$) entre os grupos caso e controle. Além disso, nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) foi encontrada quando as densidades de *int1*, *int2* e *int1* clínico de cada grupo de estudo foram comparadas duas a duas.

Gráfico 8. Log da média do número dos genes *int1* clínico, *int1* e *int2* por grama de fezes de crianças com e sem diarreia.



A detecção de *int1* clínico em concentração semelhante à *int1* é um achado bem interessante, já que ilustra a presença de *integrons* quase que exclusivamente potencialmente ricos em genes de resistência em amostras fecais de crianças com menos de um ano de idade. Então, embora a microbiota destas crianças ainda não esteja completamente formada, não tenha atingido a estabilidade [a microbiota de crianças é similar a de um adulto somente depois de três anos de idade (ARRIETA *et al.*, 2014)], ela já apresenta potencial importante de armazenamento e disseminação de resistência antimicrobiana. Isto vem completar o que já foi discutido no item 5.1.1 no que se refere à detecção de *integrons* em taxas elevadas em amostras de *E. coli* da microbiota indígena

Na literatura científica, existem poucos estudos que abordam *integrons* classe 2, em comparação com *integrons* classe 1, principalmente no que se refere ao seu estudo diretamente em amostras complexas, especialmente nas fezes. Dessa forma, são poucas as informações sobre a prevalência dessa classe de *integron*. Contudo, quando pesquisados em amostras bacterianas isoladas, são sempre encontrados em menor número que *integrons* classe 1. (VINUÉ *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2009; SU *et al.*, 2012; GILLINGS, 2014; ZEIGHAMI *et al.*, 2015). Entretanto, como já mencionado, neste trabalho *int2* foi estatisticamente tão abundante quanto *int1*. Esta é uma ocorrência muito interessante e pode ser justificada, dentre outras possibilidades, pela ampla variedade de espécies bacterianas presentes na microbiota intestinal de seres humanos. A grande maioria dos estudos realizados em culturas bacterianas foram para membros da família Enterobacteriaceae. Entretanto, no intestino de bebês, as bactérias Gram positivas prevalecem em número sobre as bactérias Gram negativas Enterobacteriaceae (ARRIETA, *et al.*, 2014; RAVI *et al.*, 2015). Assim, *int2* poderia ser mais abundante em bactérias Gram positivas do que em bactérias Gram negativas, justificando este achado. Para ilustrar a falta de informação sobre a caracterização de *integrons* em amostras de bactérias Gram positivas podemos citar, como exemplo, o trabalho de Ravi e colaboradores (2015). Embora não tenham pesquisado *int2*, eles encontraram uma correlação positiva entre a presença do gene *int1* e a presença de *Bifidobacterium longum* em amostras fecais de crianças. Entretanto, eles não encontraram *int1* na bactéria isolada. Além disso, em nosso grupo de trabalho (dados ainda não publicados)

ainda não foi possível detectar *int1* em amostras de *Enterococcus*. Assim, embora haja uma grande evidência de que bactérias Gram positivas alberguem *integrons*, estas estruturas genéticas são difíceis de encontrar nestas bactérias pelos métodos comumente empregados para este fim. Dessa forma, estudos aprofundados são necessários para a elucidação deste fato.

Destaca-se, ainda, o fato de que não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre a presença de *integrons* em amostras de fezes de crianças com ou sem diarreia. Este fato sugere que a aquisição ou a transferência de material genético ocorre independentemente da presença da doença diarreica. É importante lembrar que crianças com diarreia, predominantemente, não recebem antibioticoterapia, indicada apenas em situações específicas. A doença é autolimitada e o pilar do tratamento é a terapia de reidratação (LUBERT, 2016). Dessa forma, a microbiota destas crianças não sofre uma pressão seletiva maior que aquela observada em crianças sem diarreia. Tal pressão seletiva seria, se existente, semelhante em ambos os grupos de crianças, consequência do uso de antimicrobianos, direta ou indiretamente, por outros motivos que não a doença diarreica. Cabe salientar, como já discutido neste trabalho (item 5.1.1), que a presença de resistência (e de *integrons*, em paralelo) na microbiota intestinal não está necessariamente relacionada à pressão seletiva exercida por antimicrobianos (FRANCINO, 2016).

Nas amostras estudadas, a concentração de Bactéria de crianças com ($1,7 \times 10^{12}/g$) e sem ($2,2 \times 10^{12}/g$) diarreia foi estatisticamente similar ($p > 0,05$). Além disso, o número médio de cópias de *int1*, *int2* e *int1* clínico para cada 10.000 células bacterianas foi de 7,0, 15,0 e 4,5 para o grupo caso e de 30,5, 3,0 e 8,0 para o grupo controle. Esta proporção *int/rDNA* 16S é relativamente baixa, especialmente, quando comparado com outros estudos similares que também trabalharam com amostras complexas, como sedimentos, dentre outros (HARDWICK *et al.*, 2008; GAZE *et al.*, 2011; OLIVEIRA-PINTO *et al.*, 2016). Entretanto, como já mencionado, pouquíssimos trabalhos quantificaram *integrons* diretamente de fezes humanas. O destaque deste trabalho, diferentemente de Ravi e colaboradores (2015), foi a detecção de *integrons* em todas as amostras de fezes estudadas, o que caracteriza o alto potencial para disseminação da

resistência antimicrobiana apresentado pela microbiota indígena de crianças, mesmo sem o uso de antimicrobianos.

Por fim, este trabalho demonstra a presença de *integrons* em fezes de bebês e, assim, enfatiza novamente a importância da microbiota, mesmo nos primeiros meses de vida, como reservatório de marcadores de resistência antimicrobiana. Muito precocemente, as crianças já recebem microrganismos portadores de *integrons* da mãe e do ambiente (incluindo o hospitalar) e, conseqüentemente, já estão aptas a abrigar e espalhar a resistência. Sendo assim, o foco no estudo e entendimento de estruturas genéticas como os *integrons* deve ser constante, especialmente a respeito da sua presença e ação na microbiota intestinal humana. Além disso, é extremamente importante encontrar maneiras para entender e evitar a disseminação de resistência a antimicrobianos.

6 SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

Em síntese:

- *Integrans* classe 1 foram mais frequentemente observados em amostras de *E. coli* do que *integrans* classe 2. *Integrans* classe 3 não foram observados nas amostras bacterianas estudadas e relatos que apontam sua detecção são muito escassos.
- A frequência de *integrans* e resistência a drogas antimicrobianas em amostras de *E. coli* da microbiota indígena foram bastante elevadas, reforçando a relevância do grupo como reservatório e seu potencial na disseminação de marcadores de resistência antimicrobiana.
- Grande parte dos *integrans* classe 1 e todos os *integrans* classe 2 detectados nas amostras de *E. coli* albergavam cassetes gênicos. O perfil gênico dos cassetes detectados inclui os genes *dfrA*, *aadA*, *sat2*, *blaOXA-2* e *orfF*. A presença de *dfrA*, *aadA* e *blaOXA-2* está de acordo com a expressão fenotípica da resistência observada nas amostras. O significado da presença de *orfF* e, conseqüentemente, das proteínas codificadas por ele, precisa ser melhor estudada.
- *Integrans* classe 2 apresentam cassetes menos diversificados quando comparados a *integrans* classe 1, provavelmente, em decorrência da presença de um *stop codon* no interior de suas sequências.
- Ampicilina, estreptomicina, sulfametoxazol-trimetoprima, piperacilina, cefazolina cefuroxima, ticarcilina-clavulanato e amoxicilina-clavulanato destacaram-se como antimicrobianos com as maiores taxas de resistência ou resistência intermediária. Por outro lado, todas as amostras bacterianas foram suscetíveis à cefotetam, doripenem e ertapenem.
- Embora estejam presentes em todas as amostras de fezes estudadas, a relação do número de *integrans* por célula bacteriana é relativamente baixo.
- Não existe predominância entre os marcadores *int1*, *int1* clínico e *int2* em nenhum dos dois grupos de crianças estudados.
- Não existe diferença significativa com relação ao número de cópias de *integrans* encontrado em espécimes fecais de crianças com ou sem diarreia. Isto sugere que a presença da diarreia não influencia na

presença de *integrons* no *pool* genético da microbiota intestinal.

- Não somente de adultos, mas a microbiota de bebês, que sofreram pouca pressão seletiva pela presença de antimicrobianos, também são fonte e reservatório de genes de resistência.

Em suma, neste trabalho, foi possível caracterizar o perfil do grupo bacteriano estudado com relação ao conteúdo de *integrons* e cassetes gênicos e avaliar a relação destes com a expressão fenotípica da resistência, bem como averiguar a importância dos *integrons* e da microbiota indígena na disseminação da característica.

Além disso, este trabalho foi pioneiro na pesquisa de *integrons* diretamente em amostras fecais, abrindo caminhos para a elucidação da importância dessas estruturas genéticas na microbiota intestinal de seres humanos.

Mais uma vez, os dados reforçam a necessidade de monitoramento constante da resistência bacteriana e da adoção de procedimentos que visem controlar o aumento das taxas de resistência antimicrobiana

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIAN, P. V.; THOMSON, C. J.; KLUGMAN, K. P. AMYES, S. G. B. New gene cassettes for trimethoprim resistance, *dfp13*, and streptomycin-spectinomycin resistance, *aadA4*, inserted on class 1 integron. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, p. 355-361, 2000.
- AHMED, A. M., MOTOI, Y., SATO, M., MARUYAMA, M., WATANABE, H., FUKUMOTO, Y., SHIMAMOTO, T. Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *App and Environ Microbiol*, v. 73, p. 6686-6690, 2007.
- ARANDA-MICHEL, J.; GIANNELLA, R. A. Acute diarrhea: a practical review. *Am J Med*, v. 106, p. 670-676, 1999.
- ARRIETA, M-C; STIEMSMA, L.T.; AMENYOGBE, N.; BROWN, E.M.; FINLAY, B. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Front Immunol*. v. 5, p. 1-18, 2014.
- BAILEY, J. K.; PINYON, J. L.; ANANTHAM, S.; HALL, R. M. Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. *J Med Microbio.*, v. 59, p. 1331-1339, 2010.
- BAKHSHI, B.; EFTEKHARI, N.; POURSHAFIE, M. R. Genetic elements associated with antimicrobial resistance among intestinal bacteria. *Jundisshapur J Microbiol.*, v. 7, p. 1-5, 2014.
- BALDI, F.; BIANCO, M. A.; NARDONE, G.; PILOTTO, A.; ZAMPARO, E. Focus on acute diarrhoeal disease. *World J Gastroenterol*, v. 15, p. 3341-3348, 2009.
- BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Na Rev Microbio*, v. 13, p. 42-51, 2015.
- BOUCHER, Y.; LABBATE, M.; KOENING, J. E.; STOKES, H. W. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol* v. 15, p. 301-309, 2007.

CAMBRAY, G.; GUEROUT, A-M.; MAZEL, D. Integrons. *Annu Rev Genet*, v. 44, p. 141-166, 2010.

CARATTOLI, A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res*, v. 32, p. 243-259, 2001.

CARDINALI-REZENDE, J.; COLTURATO, L.F.; COLTURATO, T.D.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A.M.; SANZ, J.L. Prokaryotic diversity and dynamics in a full-scale municipal solid waste anaerobic reactor from start-up to steady-state conditions. *Bioresour Techno*, v. 119, p. 373-383, 2012.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J. C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, v. 3, p. 71-82, 2012.

CLÍMACO, E. C. Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. 2011. 76f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2015.

COCCHI, S.; GRASSELLI, E.; GUTACKER, M.; BENAGLI, M.; CONVERT, M.; PIFFARETTI, J. C. Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 50, p. 126-132, 2007.

CORREIA, M.; BOAVIDA, F.; GROSSO, F.; SALGADO, M. J.; LITO, L. M.; CRISTINO, J. M.; MENDO, S.; DUARTE, A. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, p. 2838-2843, 2003.

CROXEN, M. A.; LAW, R., J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, v. 26, p. 822-880, 2013.

DENNEHY, P. H. Acute diarrheal disease in children: epidemiology, prevention, and treatment. *Infec Dis Clin N Am*, v. 19, p. 585-602, 2005.

DOMINGUES, S.; SILVA, G. J.; NIELSEN, K. M. Intgrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mob Genet Elements*, v. 2, p. 211-223, 2012.

DUBOIS, V.; ARPIN, C.; QUENTIN, C.; TEXIER-MAUGEIN, J.; POIREL, L. NORDMANN, P. Decreased susceptibility to cefepime in a clinical strain of *Escherichia coli* related to plasmid- and integron-encoded OXA-30 beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, p. 2380-2381, 2003.

EUCAST subcommittee for detection of resistance mechanisms and specific resistance of clinical and/or epidemiological importance (2013).GISKE, C. G.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; CANTÓN, R.; STEFANI, S.; SKOV,R.; GLUPCZYNSKI, Y.; NORDMANN, P. OOTTON, M.; MIRIAGOU, V.; SIMONSEN, G. S.; ZELICKOVA, H.; COHEN-STUART, J.; GNIADKOWSKI, M. Versão para o português (2015).

FLEMING, A. On antibacterial action of culture of penicillium, with special reference to their use in isolation of *B. influenza*. *Br J Exp Pathol*, v. 10, p. 226-236, 1929.

FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F.-J. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect*, v. 10, p. 272-288, 2004.

FOX, J. G.; DEWHIRST, F. E.; FRASER, G. J.; PASTER, B. J.; SHAMES, B.; MURPHY, J. C. Intracellular *Campylobacter*-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *J Clin Microbiol*, v. 32, p. 1229-1237, 1994.

FRANCINO, M. P. Antibiotics and the human gut microbiome: dysbioses and accumulation of resistances. *Front Microbiol*, v. 6, 2016.

FRANK, C.; FABER, M.S.; ASKAR, M.; BERNARD, H.; FRUTH, A.; GILSDORF, A.; HOHLE, M.; KARCH, H.; KRAUSE, G.; PRAGER, R.; SPODE, A.; STARK, K.; WEBER, D. Large and ongoing outbreak of hemolytic uremic syndrome Germany, May 2011. *Euro Surveill*, v. 16, p. 1-3, 2011.

GILLINGS, M. R.; PAULSEN, I. T.; TETU, S. G. Genomics and the evolution of antibiotic resistance. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1388, p. 92-107, 2017.

GILLINGS, M. R.; GAZE, W. H.; PRUDEN, A.; SMALLA, K.; TIEDJE, J. M.; ZHU, Y. G. Using the class 1 integrin-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J*, v. 9, p. 1269-1279, 2015.

GILLINGS, M. R. Integrons: past, present and future. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 78, p. 257-277, 2014.

GORDON, D. M.; COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*, v. 149, p. 3575-3586, 2003.

GRIMWOOD, K.; FORBES, D. A. Acute and persistent diarrhea. *Pediatr Clin N Am*, v. 56, p. 1343-1361, 2009.

GUERIN, E.; CAMBRAY, G.; SANCHEZ-ALBEROLA, N.; CAMPOY, S.; ERILL, I.; RE, S. D.; GONZALEZ-ZORN, B.; BARBÉ, J.; PLOY, M-C.; MAZEL, D. The SOS Response controls integron recombination. *Science*, v. 324, p. 1034, 2009.

GUERRANT, R. L.; GILDES, T. V.; STEINER, T. S.; THIELMAN, N. M.; SLUTSKER, L.; TAUXE, R. V.; HENNESSY, T.; GRIFFIN, P. M.; DuPONT, H.; SACK, R. B.; TARR, P.; NEILL, M.; NACHAMKIN, I.; RELLER, L. B.; OSTERHOLM, M. T.; BENNISH, M. L.; PICKERING, L. K. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin Infect Dis*, v. 32, p. 331-350, 2001.

HALL, R. M. Integrons and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1267, p. 71-78, 2012.

HALL, R. M.; HOLMES, A. J.; ROY, P. H.; STOKES, H. W. What are superintegrons? *Nat Rev Microbiol*, v. 5, p. 1-2, 2007.

HALL, R. M.; STOKES, H. W. Integrons or super integrons? *Microbiology*, v. 150, p. 3-4, 2004.

HALL, M. A. L.; BOX, A. T. A.; BLOK, H. E. M.; PAAUW, A.; FLUIT, A. C.; VERHOEF, J. Evidence of extensive interspecies transfer of integron-mediated antimicrobial resistance genes among multidrug-resistant Enterobacteriaceae in a clinical setting. *J Infect Dis*, v. 186, p. 49-56, 2002.

HALL, R. M.; COLLINS, C. M. Antimicrobial resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resistance Updates*, v. 1, p. 109-119, 1998.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* v. 41, p. 95-98, 1999.

HANSSON, K.; SUNDSTROM, L.; PELLETIER, A.; ROY, P. H. Int2 integron integrase in Tn7. *J Bacteriol*, v. 184, p. 1712-1721, 2002.

HARDWICK, S. A.; STOKES, H. W.; FINDLAY, S.; TAYLOR, M.; GILLINGS, M. R. Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Lett*, v. 278, p. 207-212, 2008.

HOLLINGSHEAD, S.; VAPNEK, D. Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase. *Plasmid*, v. 13, p. 17-30, 1985.

HUDDLESTON, J. R. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist*, v. 7, p. 167-176, 2014.

JOVÉ, T.; DA RE, S.; DENIS, F.; MAZEL, D.; PLOY, M-C. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *Plos Genet*, v. 6, p. 1-10, 2010.

KADLEC, K.; SCHWAR, S. Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolate sfrom swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. *J Antimicrob Chemother*, v. 62, p. 469-473, 2008.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, v. 2, p. 123-140, 2004.

KARGAR, M.; MOHAMMADALIPOUR, Z.; DOOSTI, A.; LORZADEH, S.; JAPONI-NEJAD, A. High prevalence of class 1 to 3 integrons among multidrug-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* in southwest of Iran. *Osang Public Health Res Perspect*, v. 5, p. 193-198, 2014.

KIM, J.; LIM, J.; LEE, C. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnol Adv.* v. 31, p. 1358-1373, 2013.

KOCZURA, R.; MOKRACA, J.; JABLONSKA, L.; GOZDECKA, E.; KUBEK, M.; KAZNOWSKI, A. Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. *Sci Total Environ*, v. 414, p. 680-685, 2012.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*, v. 8, p. 423-435, 2010.

LAPIERRE, L.; CORNEJO, J.; BORIE, C.; TORO, C.; MATÍN, B. S. Genetic characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 na class 2 integrons in commensal strains of *Escherichia coli* isolated from poutry and swine. *Microbial Drug Resistance*, v. 14, p. 265-272, 2008.

LAROCHE, E.; PAWLAK, B.; BERTHE, T.; SKURNIK, D.; PETIT, F. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol Ecol*, v. 68, p. 118, 130, 2009.

- LÉVESQUE, C.; PICHÉ, L.; LAROSE, C.; ROY, P. H.; PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 39, p. 185-191, 1995.
- LEVIN, A. S. S.; DIAS, M. B. G. S.; OLIVEIRA, M. S.; LOBO, R. D.; GARCIA, C. P. *et al.* Guia de referência de anti-infecciosos e recomendações para a prevenção de infecções hospitalares. Ed. 5, São Paulo. Hospital das Clínicas, 2011.
- LIN, J.; NISHINO, K.; ROBERTS, M. C.; TOLMASKY, M.; AMINOV, R. I.; ZHANG, L. Mechanisms of antibiotic resistance. *Front Microbiol*, v. 6, p. 1-3, 2015.
- LUBBERT, C. Antimicrobial therapy of acute diarrhoea: a clinical review. *Expert Rev Ant Infect Ther*, v. 14, p. 193-206, 2016.
- MARTINEZ, J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol*, v. 11, p. 33-39, 2014.
- MARTINEZ, J. L.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F. What is resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat Rev Microbiol*, p 1-8, 2014.
- MARTÍNEZ, M. J. F.; GARCIA, M. I. G.; SÁNCHEZ, E. G.; SÁNCHEZ, J. E. G. Carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 28, p. 53-64, 2010.
- MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature*, v. 4, p. 608-620, 2006.
- McCLARREN, R. L.; LYNCH, B.; NYAYAPATI, N. Acute infectious diarrhea. *Prim Care Clin Office Pract*, v. 38, p. 539-564, 2011.
- McFARLAND, L. V. Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trend and treatment. *Future Microbiol*, v. 3, p. 563-578, 2008.
- MODI, S. R.; COLLINS, J. J.; RELMAN, D. A. Antibiotics and the gut microbioma. *J Clin Invest*, v. 124, p. 4212-4218, 2014.

MORA, A.; HERRRERA, A.; LÓPES, C.; DAHBI, G.; MAMANI, R.; PITA, J. M.; ALONSO, M. P.; LLOVO, J.; BERNÁDEZ, M. I.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M. BLANCO, J. Characteristics of the shiga-toxin-producing eteroaggregative *Escherichi coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *Int Microbiol*, v. 14, p. 121-141, 2011.

MOSQUITO, S.; RUIZ, J.; BAUER, J. L.; OCHOA, T. J. Mecanismos moleculares de resistência antibiótica em *Escheriahia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, v. 28, p. 648-656, 2011.

MOURA, A.; ARAÚJO, S.; ALVES, M. S.; HENRIQUES, I.; PEREIRA, A. CORREIA, A. C. M. The contribution of *Escherichia coli* from human and animal sources to the integron gene pool in coastal Waters. *Front Microbiol*, v. 19, p. 1-15, 2014.

MOURA, A.; PEREIRA, C.; HENRIQUES, I.; CORREIA, A. Novel gene cassettes and integrons in antibiotic-resistant bactéria isolated from urban wastewaters. *Res Microbiol*, v. 163, p. 92-100, 2012.

MOURA, A.; HENRIQUES, I.; RIBEIRO, R.; CORREIA, A. Prevalence and characterization of integrons from bacterial isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *J Antimicrob Chemother*, v. 60, p. 1243-1250, 2007.

MULVEY, M. R.; BOYD, D. A.; BAKER, L.; MYKYTCZUK, O.; REIS, E. M.; ASENSI, M. D.; RODRIGUES, D. P.; NG, L. K. Characterization of a *Salmonella* enterica serovar Agona strain harbouring a class 1 integron containing novel OXA-type beta-lactamase (blaOXA-53) and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase genes [aac(6')-I30]. *J Antimicrob Chemother*, v. 54, p. 354-359, 2004.

MUYSER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, v. 59, p. 695-700, 1993.

- NAAS, T.; SOUGAKOFF, W.; CASSETTA, A.; NORDMANN, P. Molecular characterization of OXA-20, a novel class D beta-lactamase, and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 42, p. 2074-2083, 1998.
- NATARO, J. P. Vaccines against diarrheal diseases. *Semin Pediatr Infect Dis*, v. 15, p. 272-279, 2004.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, v.11, p. 142-201, 1998.
- NAVARRO, E.; SERRANO-HERAS, G.; CASTAÑO, M. J.; SOLERA, J. Real-time PCR detection chemistry, *Clinica Chimica Acta*, v. 439, p. 231-250, 2015.
- NAVIA, M. M.; RUIZ, J.; VILA, J. Characterization of na integroncarring a new class D beta-lactamase (OXA-37) in *Acinetobacter baumannii*. *Microb Drug Resist*, v. 8, p. 261-265, 2002.
- NIYOGI, S. K. Shigellosis. *J Microbiol*, v. 43, p. 133-143, 2005.
- O'CONNELL, K. M. G.; HODGKINSON, J. T.; SORE, H. F.; WELCH, M.;SALMOND, G. P. C.; SPRING, D. R. Combating multidrug-resistant bacteria: current strategies for the discovery of novel antibacterials. *Angew Chem Int Ed*, v. 52, p. 10706-10733, 2003.
- OKEKE, I. N.; LAXMINARAYAN, R.; BHUTTA, Z. A.; DUSE, A. G.; JENKINS, P.; O'BRIEN, T. F.; PABLOS-MENDEZ, A.; KLUGMAN, K. P. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet Infect Dis*, v. 5, p. 481-493, 2005.
- OLDFIELD, E.; FENG, X. Resistance-resistant antibiotics. *Trends Pharmacol Sci*, v. 35, p. 664-674, 2014.

OLIVEIRA, P. L.; PAULA, C. S.; ROCHA, L. D.; COLLARES, G. B.; FRANCO, R. T.; SIL, C. P.; FARIAS, L. M.; PENNA, F. J.; MENDES, E. N.; FERRARI, T. C. A.; MAGALHÃES, P. P. Antimicrobial susceptibility profile of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from fecal specimens of children with acute diarrhea. *J Bras Patol Med Lab*, v. 53, p. 115-118, 2017

OLIVEIRA-PINTO, C.; COSTA, P. S.; REIS, M. P.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Diversity of genes cassettes and the abundance of the class 1 integron-integrase gene in sediment polluted by metals. *Extremophiles*, v. 20, p. 283-289, 2016.

O'RYAN, M.; PRADO, V.; PICKERING, L. K. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Semin Ped Infect Dis*, v. 16, p. 125-136, 2005.

PARTRIDGE, S. R.; TSAFNAT, G.; COIERA, E. IREDELL, J. R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev*, v. 33, p. 757-784, 2009.

PAULA, C. S. *Escherichia coli* enterotoxigênica em crianças com e sem diarreia aguda em Belo Horizonte/MG: identificação e perfil de virulência e de suscetibilidade a antimicrobianos. 2012.90f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

PENG, J. P.; YANG, J.; JIM, Q. Research progress in *Shigella* in the postgenomic era. *Sci China Life Sci*, v. 53, p. 1284-1290, 2010.

PODEWILS, L. J.; MINTZ, E. D.; NATARO, J. P.; PARASHAR, U. D. Acute, infectious diarrhea among children in developing countries. *Semin Pediatr Infect Dis*, v. 15, p. 155-168, 2004.

Portal da saúde, Ministério da saúde, Brasil, acessado em 09/11/2015, <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/13600-calendario-nacional-de-vacinacao>

POSFAY-BARBE, K. M. Infections in paediatrics: old and new diseases. *Swiss Med Wkly*, v. 142, 2012.

RAVI, A.; AVERSHINA, E.; FOLEY, S. L.; LUDVIGSEN, J.; STORRO, O. OIEN, T.; JOHNSEN, R.; McCARTNEY, A. L.; L'ABÉE-LUND, T. M.; RUDI, K. The commensal infant gut meta-mobilome as a potential reservoir for persistent multidrug resistance integrons. *Sci Rep*, 5:15317, 2015.

RAVI, A.; AVERSHINA, E.; LUDVIGSEN, J.; L'ABÉE-LUND, T. M.; RUDI, K. Integrons in the intestinal Microbiota as a reservoirs for transmission of antibiotic resistance genes. *Pathogens*, v. 3, p. 238-248, 2014.

RECCHIA, G. D.; HALL, R. M. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*, v. 141, p. 3015-3027, 1995.

REIS, R.S.; HORN, F. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathog*, v. 2, p. 8, 2010.

ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *J Gastroenterol Hepatol*, v. 17, p. 467-475, 2002.

ROE, M.; VEGA, E.; PILLAI, S. Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerg Infect Dis*, v. 7, p. 822-826, 2003.

ROWE-MAGNUS, D. A.; MAZEL, D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol*, v. 292, p. 115-125, 2002.

SAGA, T. YAMAGUCHI, K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *JMAJ*, v. 52, p.103-108, 2009

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y.USA, 1989

SANDVANG, D. Novel streptomycin and spectinomycin resistance gene as a gene cassette within class 1 integron isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, p. 3036-3038, 1999.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiol*, v.7, p. 73-89, 2011.

SCHROEDER, G.N.; HILBI, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol Rev*, v. 2, p.134-156, 2008.

SEPP, E.; STSEPETOVA, J.; LÕIVUKENE, K.; TRUUSALU, K.; KÕLJALG, S.; NAABER, P.; MIKELSAAR, M. The occurrence of antimicrobial resistance and class 1 integron among commensal *Escherichia coli* isolates from infants and elderly persons. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, v. 8, p. 1-6, 2009.

SHAHCHERAGHI, F.; GHEZELGEH, F. R.; NOBARI, S.; TORABI, E.; MOUSAVI, S. F.; ASLANI, M. M.; SHAHCHERAGHI, F. Identification and characterization of class 1 integrons among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from children under 5 years of age. *Iranian J. Microbiol*, v. 6, p. 156-162, 2014.

SHARMA, S.; RADL, V.; HAI, B. KLOOS, K.; FUKA, M. M.; ENGEL, M. SCHAUSS, K. SCHOLTER, M. Quantification of functional genes from prokaryotes in soil by PCR. *J Microbiol Methods*, v. 68, p. 445-452, 2007.

SHAW, K. J.; RATHER, P. N.; HARE, R. S. MILLER, G. H. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Reviews*, v. 57, p. 138-163, 1993.

SHEHABI, A. A.; ODEH, J. F.; FAYYAD, M. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from human stools and drinking water sources in Jordan. *J Chemother*, v. 18, p. 468-472, 2006.

SHIBATA, N.; DOI, Y.; YAMANE, K.; YAGI, T.; KUROKAWA, H.; SHIBAYAMA, K. KATO, H.; KAI, K. ARAKAWA, Y. PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by Gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* v. 41, p. 5407, 5413, 2003.

SKURNIK, D.; MENAC'H, A. L.; ZURAKOWSKI, D.; MAZEL, D.; COURVALIN, P.; DENAMUR, E.; ANDREMONT, A.; RUIMY, R. Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, p. 3062-3065, 2005.

SKURNIK, D.; RUIMY, R.; ANDREMONT, A.; AMORIN, C.; ROUQUET, P.; PICARD, B.; DENAMUR, E. Effect of human vicinity in animal faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, v. 57, p. 1215-1219, 2006.

STOKES, H. W.; HALL, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol*, v. 3, p. 1669-1683, 1989.

SU, H. C.; YING, G. G.; TAO, R.; ZHANG, R. Q., ZHAO, J. L.; LIU, Y. S. Class 1 and 2 integrons, *sul* resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China. *Environ Pollution*, v. 169, p. 42-49, 2012

SU, J.; SHI, L.; YANG, L.; XIAO, Z.; LI, X.; YAMASAKI, S. Analysis of integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* in China during the last six years. *FEMS Microbiol Lett*, v. 254, p. 75-80, 2006.

SUR, D.; RAMAMURTHY, T.; DEEN, J.; BHATTACHARYA, S.K. Shigellosis: challenges & management issues. *Indian J Med Res*, v. 120, p. 454-462, 2004.

SZAJEWSKA, H.; MRUKOWICZ, J. Z.; Use of probiotics in children with acute diarrhea. *Paediatr Drugs*, v. 7, p. 111-122, 2005.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature*, v. 8, p. 207-217, 2010.

TORMO, R.; POLANCO, I.; SALAZAR-LINDO, E.; GOULET, O. Acute infectious diarrhoea in children: new insights in antisecretory treatment with racecadotril. *Acta Paed* v. 97, p 1008-1015, 2008.

VILA, J.; SÁEZ-LÓPEZ, E.; JOHNSON, J. R.; ROMLING, U.; DOBRINDT, U.; CANTÓN, R.; GISKE, C. G.; NAAS, T.; CARATTOLI, A.; MARTÍNEZ-MEDINA, M.; BOSCH, J.; RETAMAR, P.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; BAQUERO, F.; SOTO, S. M. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings, *FEMS Microbiol Rev*, v. 40, p. 437-463, 2016.

VINUÉ, L.; SÁENZ, Y.; SOMALO, S.; ESCUDERO, E.; MORENO, M. A.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. *J. Antimicrob Chemother*, v. 62, p. 934-937, 2008.

WHITE, P. A.; MCIVER, C. J.; RAWLINSON, W. D. Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, p. 2658-2661, 2001.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R., MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*, v. 85, p.11-19, 2008.

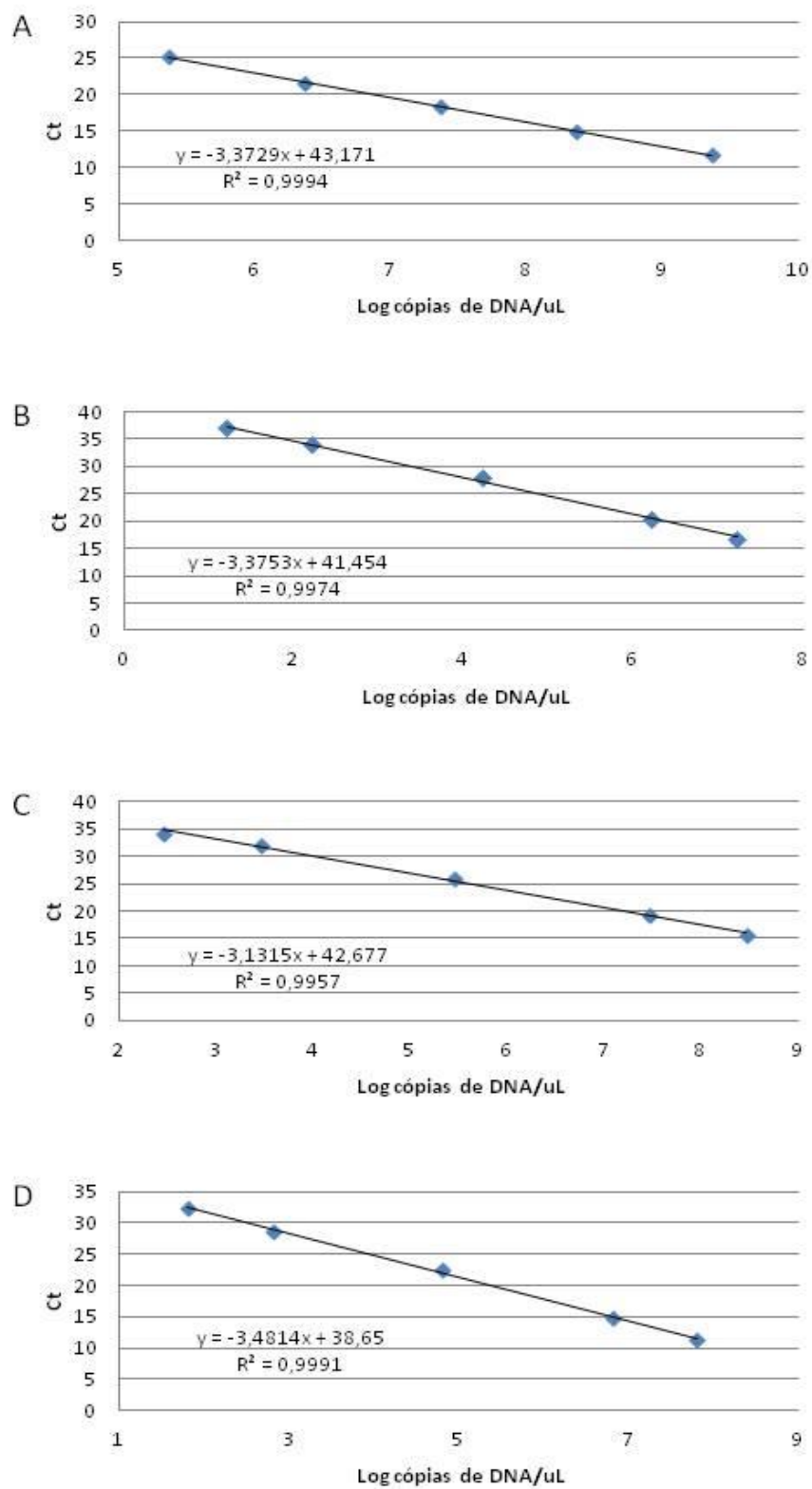
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance in shigellosis, cholera and campylobacteriosis. Geneva, Switzerland. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.8, 2001.

YANG, C. M.; LIN, M. F.; LIN, C. H.; HUANG, Y., T.; HSU, C. T., LIOU, M. L. Characterization of antimicrobial resistance patterns and integrons in human fecal *Escherichia coli* in Taiwan, *Jpn J Infect Dis*, v. 62, p. 177-181, 2009.

ZEIGHAMI, H.; HAGHI, F.; MASUMIAN, N.; HERMMATI, F.; SAMEI, A.; NADEN, G. Distribution of integrons and gene cassettes among uropathogenic and diarrheagenic *Escherichia coli* isolates in Iran. *Microbial Drug Resistance*, v. o, p. 1- 6, 2015.

ANEXO I

Gráfico 5. Curvas padrão para a quantificação dos marcadores gênicos pesquisados.



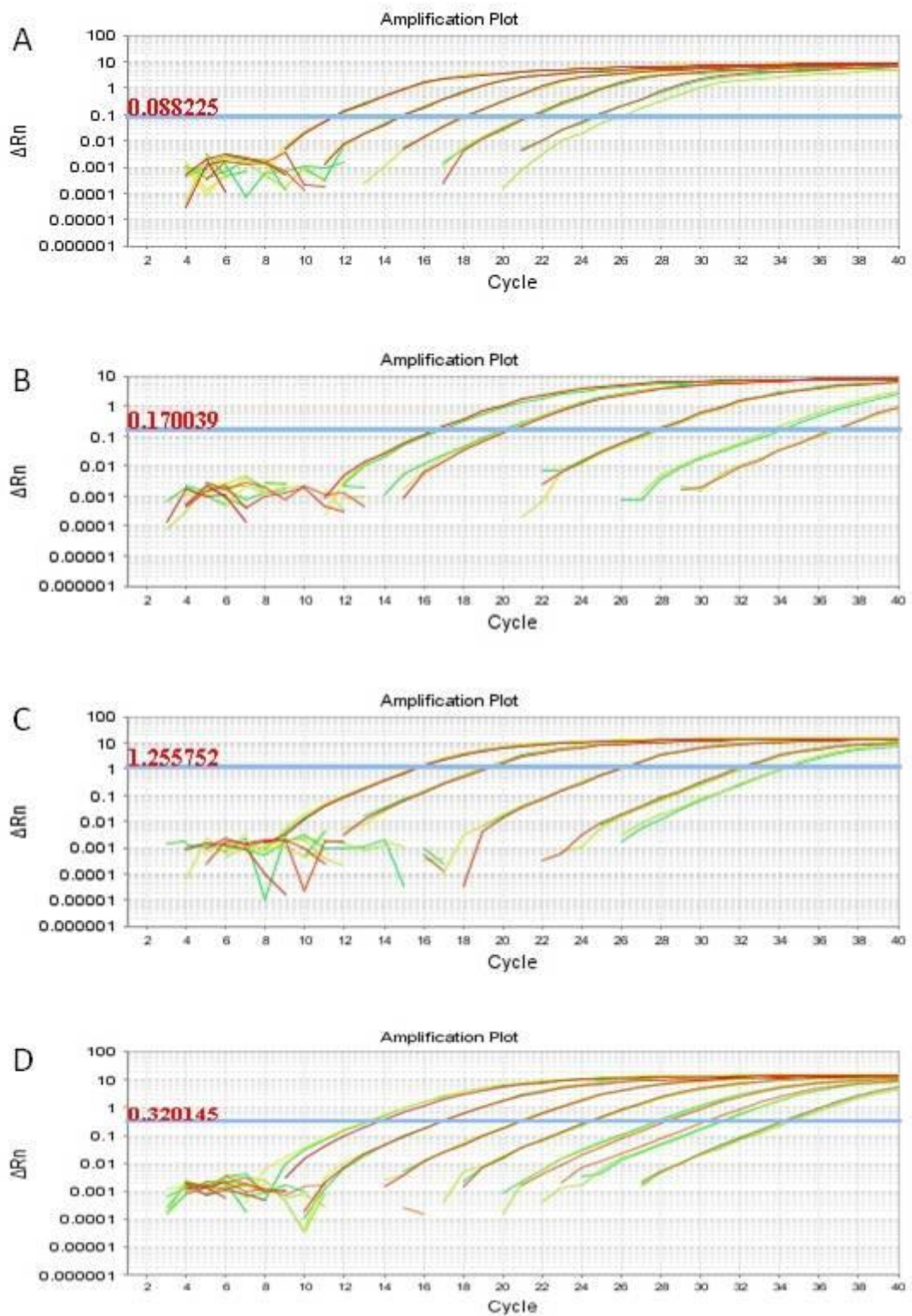
Legenda: A. Bacteria;

B. *int1*;

C. *int2*;

D. *int1* clínico

Gráfico 6. Perfis de amplificação observdos para os marcadores gênicos pesquisados.



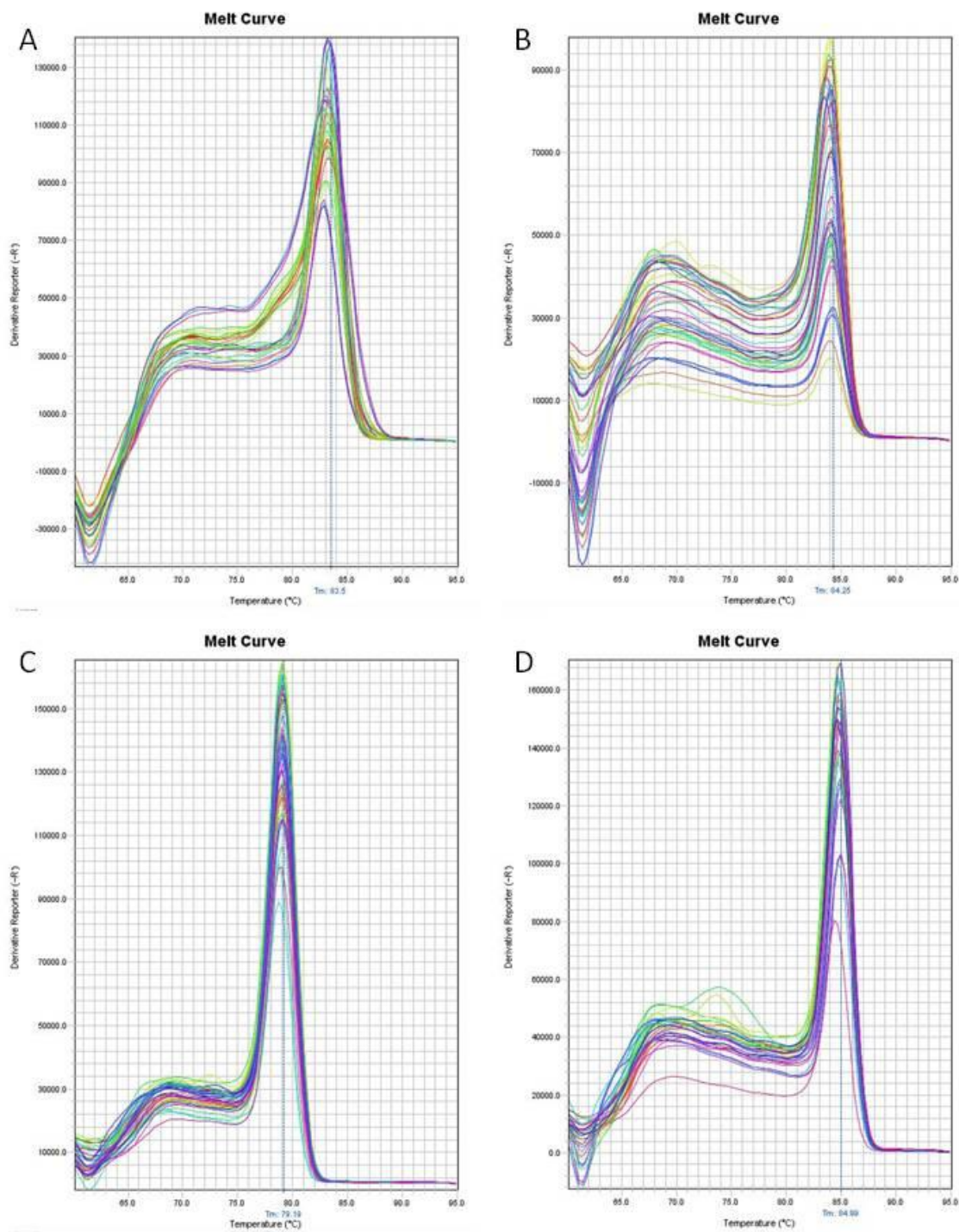
Legenda: A. Bacteria;

B. *int1*;

C. *int2*;

D. *int1* clínico

Gráfico 7. Curvas de *melting* observadas para os marcadores gênicos pesquisados.



Legenda: A. Bacteria;

B. *int1*;

C. *int2*;

D. *int1* clínico

ANEXO II

Antimicrobial susceptibility profile of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates obtained from fecal specimens of children with acute diarrhea

Perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas de amostras de Escherichia coli enterotoxigênica e enteropatogênica isoladas de espécimes fecais de crianças com doença diarreica aguda

Patrícia Luciana de Oliveira; Caroline S. Paula; Lisandra D. Rocha; Guilherme B. Collares; Roger T. Franco; Carolina P. Silva; Luiz M. Farias; Francisco José Penna; Edilberto N. Mendes; Teresa Cristina A. Ferrari; Paula P. Magalhães

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, Brazil.

ABSTRACT

Among the diseases which etiopathogenesis is associated with *Escherichia coli*, acute diarrhea stands out. Studies on the characterization of the antimicrobial susceptibility profile contribute to the selection of appropriate empirical antimicrobial therapy. In this study, the antimicrobial susceptibility profile of 98 enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains isolated from fecal specimens of children with acute diarrhea was evaluated. The resistance rates to ampicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim, amoxicillin/clavulanate, and nalidixic acid were high, ranging from 34.7% to 10.2%. The result of this research recommends the use of cefotaxime and ceftriaxone for the empirical treatment of children with acute diarrhea which the etiology suggested is ETEC or EPEC.

Key words: *Escherichia coli*; enteropathogenic *Escherichia coli*; enterotoxigenic *Escherichia coli*; diarrhea; antimicrobial resistance.

INTRODUCTION

Acute diarrhea is still a serious public health issue. It mainly affects children from developing countries, where poor hygiene and lack of access to basic sanitation allow their dissemination⁽¹⁾. It is estimated that about 10% of deaths of children under five years of age are due to the disease⁽²⁾.

The *Escherichia coli* species harbors extremely diversified microorganisms. Among the diarrheagenic *E. coli* pathotypes, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) stand out. EPEC is associated with the development of a characteristic intestinal histopathological lesion, known as attaching and effacing (A/E), which generates a condition of watery diarrhea in the affected patient. ETEC, also an agent of watery diarrhea, colonizes the epithelium of the small intestine and produces enterotoxins, heat-labile (LT) and/or heat-stable (ST), which interfere with intestinal absorption and secretion processes⁽³⁾.

The relevance of the use of antimicrobials, when indicated, is unquestionable. However, the incidence of infectious diseases associated with multidrug-resistant (MDR) bacteria and of cases for which effective antibiotic therapy is not available, has been increasing dramatically⁽⁴⁾. Multidrug-resistant microorganisms were much more frequently observed in health services, where the use of antimicrobials is broader. More recently, the occurrence of resistant bacteria in the community has spread, reaching high levels, for example, in urinary, respiratory and intestinal infections^(5,6).

Considering the increasing challenge of the control of antimicrobial resistance in bacteria, the monitoring of the susceptibility profile to antimicrobial drugs of etiological agents of infectious diseases, highlighting the need to obtain regional data, is of great relevance. This is an important tool to subsidize health professionals in the choice of appropriate antibiotic therapy, especially when empirical treatment is ordinarily adopted, as is

the case of acute diarrhea for specific groups of patients. The high prevalence of *E. coli* as a diarrheagenic agent, predominantly the ETEC and EPEC pathotypes, supports the choice of the organism. Therefore the aim of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibility profile of ETEC and EPEC samples isolated from fecal specimens of children with acute diarrhea, in order to contribute to the establishment of a more effective empirical antibiotic therapy for the disease.

MATERIALS AND METHODS

We included in the study 98 samples of diarrheagenic *E. coli* isolated between 2004 and 2007, among them, 57 ETEC samples and 41 EPEC samples recovered from fecal specimens from children with acute diarrhea. The project was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (opinion no. ETIC 047/03) and the parents or guardians of the children recruited signed the free and informed consent form. The children were of low socioeconomic level, were up to 69 months of age, had not used antimicrobial drugs in the last 15 days, and were attended at the Hospital Infantil João Paulo II, in Belo Horizonte (MG). Bacterial samples were identified through biochemical and physiological tests and the different diarrheagenic *E. coli* pathotypes were characterized by genotypic virulence markers.

The investigation of the susceptibility profile to antimicrobial drugs was performed by the agar diffusion method, according to the specifications of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015)⁽⁷⁾. Antimicrobials ampicillin, amoxicillin/clavulanate, cefotaxime, ceftriaxone, ceftioxin, amikacin, ciprofloxacin, sulfamethoxazole/trimethoprim and nalidixic acid were tested. The selection of the antimicrobial drugs considered their use in our region for empiric treatment of acute infectious diarrhea. As a control, the reference sample *E. coli* ATCC 25922 was used.

RESULTS AND DISCUSSION

The criteria for interpretation of the results considered the fact that, according to the CLSI (2015)⁽⁷⁾, the “intermediate” category (or “intermediate resistance”, term used in this study), is assigned to the relationship between antimicrobials and bacterial samples, for which the response rates in blood and tissue levels may be lower than those presented by susceptible samples. Therefore, since from the clinical view there is little distinction between the

“intermediate” and the “resistant” categories, in this study, both are treated as resistant.

Considering all the bacterial samples and the antimicrobial drugs used, 882 antibiogram tests were performed. The resistance rate for ETEC was 15.2% [resistance (R) = 12.3% and intermediate resistance (IR) = 2.9%]. For EPEC, we observed a rate of 5.1% (R = 4.3% and IR = 0.8%).

As regards the ETEC samples, the highest resistance rates were observed for ampicillin (49.1%; R = 45.6% and IR = 3.5%), amoxicillin/clavulanate (28.1%; R = 7 and IR = 21.1%), sulfamethoxazole/trimethoprim (26.3%; all R), nalidixic acid (14%; all R) and ciprofloxacin (12.3%; R = 10.5% and IR = 1.8%). Regarding the EPEC samples, the highest resistance rates were observed for sulfamethoxazole/trimethoprim (19.5%; R = 17.1% and IR = 2.4%) and ampicillin (14.6%; all R) (Figure).

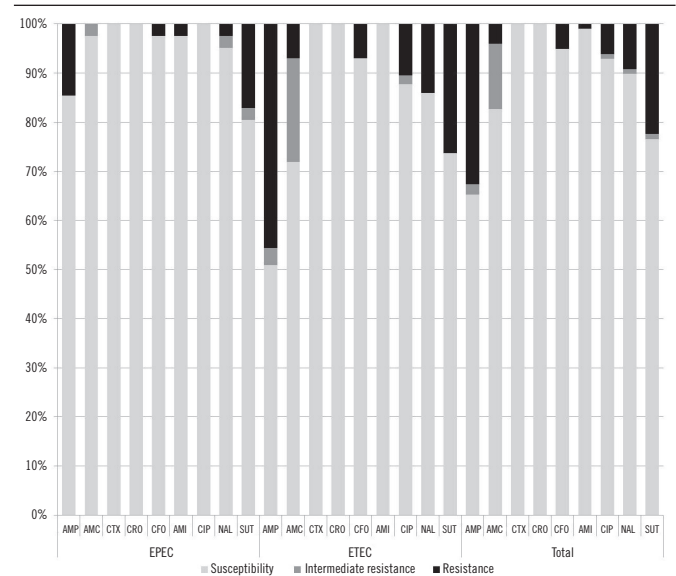


FIGURE – Antimicrobial resistance susceptibility profile of ETEC and EPEC samples isolated from fecal specimens of children with acute diarrhea

EPEC: enteropathogenic *E. coli*; ETEC: enterotoxigenic *E. coli*; AMP: ampicillin; AMC: amoxicillin/clavulanate; CTX: cefotaxime; CRO: ceftriaxone; CFO: ceftioxin; AMI: amikacin; CIP: ciprofloxacin; NAL: nalidixic acid; SUT: sulfamethoxazole/trimethoprim.

When the analysis considers the total of samples studied, it is possible to observe that the highest resistance rates were detected for ampicillin (34.7%; R = 32.6% and IR = 2.9%), sulfamethoxazole/trimethoprim (23.5%; R = 22.4 and IR = 1%), amoxicillin/clavulanate (17.3%; R = 4.1% and IR = 13.3%) and nalidixic acid (10.2%; R = 9.2% and IR = 1%). All samples showed susceptibility to cefotaxime and ceftriaxone.

Antimicrobial resistance is an emerging major worldwide problem observed in several bacterial groups, including *E. coli*. The species has high rates of resistance to antimicrobial drugs,

such as ampicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim, tetracycline, chloramphenicol and nalidixic acid, which makes it difficult to establish an effective antibiotic therapy when necessary^(8,9).

Diarrheal disease is, as a rule, self-limiting, and rehydration therapy is the basis of the treatment. The indication of antibiotic therapy depends on several factors, such as the severity of the condition, the patient's immunological conditions and likelihood of infection transmission. Studies have shown that the use of antimicrobials may reduce the period of manifestation of some types of diarrhea⁽¹⁰⁾. The antibiotic therapy scheme, when indicated, is usually established empirically, which allows the immediate onset of treatment, which is essential in severe cases of the disease. Thus, studies aimed at assessing the susceptibility profile of diarrheagenic bacteria to antimicrobials are important, and may support the establishment of effective empirical antibiotic therapy.

The data obtained show resistance rates to ampicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim, amoxiciline/clavulanate, nalidixic acid and ciprofloxacin for ETEC, EPEC or both pathotypes considered high. These data are in agreement with previous reports^(8,9), which discourage the use of these antimicrobials. Thus, although these antimicrobial drugs have a history of indication for

the treatment of diarrheal disease in our country, they should no longer be used due to the greater possibility of therapeutic failure resulting from antimicrobial resistance and their participation in the increase of resistance rates to them.

Our results suggest cefotaxime and ceftriaxone as the drugs of choice for the treatment of children with watery acute diarrhea, possibly associated with ETEC or EPEC. Third-generation cephalosporins have been considered appropriate for the empiric treatment of severe acute diarrhea in children⁽⁸⁾.

Taking together, the data reinforce the need for constant monitoring of bacterial resistance and the adoption of procedures aimed at controlling the increase of antimicrobial resistance rates.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful for the funding provided by the funding agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Pró-reitoria de Pesquisa (PRPq)/UFMG.

RESUMO

Entre as doenças cuja etiopatogenia está associada à Escherichia coli, destaca-se a doença diarreica aguda. Estudos que visam à caracterização do perfil de suscetibilidade antimicrobiana contribuem para o delineamento de antibioticoterapia empírica eficaz. Neste estudo, foi avaliado o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de 98 amostras de E. coli enterotoxigênica (ETEC) e E. coli enteropatogênica (EPEC) isoladas de crianças com doença diarreica. As frequências de resistência a ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprima, amoxicilina-clavulanato e ácido nalidíxico foram elevadas, variando entre 34,7% e 10,2%. Esta pesquisa recomenda o emprego de cefotaxima e ceftriaxona para o tratamento empírico de crianças com quadro de diarreia cuja etiologia sugerida seja ETEC ou EPEC.

Unitermos: Escherichia coli; Escherichia coli enteropatogênica; Escherichia coli enterotoxigênica; diarreia; resistência microbiana a medicamentos.

REFERENCES

1. Tormo R, Polanco I, Salazar-Lindo E, Goulet O. Acute infectious diarrhoea in children: new insights in antisecretory treatment with racecadotril. *Acta Paed.* 2008; 97(8): 1008-15. PubMed PMID: 18462465.
2. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, et al. Global causes of diarrheal disease mortality in children < 5 years of age: a systematic review. *PLoS One.* 2013; 8(9): e72788. PubMed PMID: 24023773.
3. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26(4): 822-80. PubMed PMID: 24092857.
4. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbio.* 2015; 13(1): 42-51. PubMed PMID: 2543509.
5. Okeke IN, Laxminarayan R, Bhutta ZA, et al. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5(8): 481-93. PubMed PMID: 16048717.

6. Fasugba O, Gardner A, Mitchell BG, Mnatzaganian G. Ciprofloxacin resistance in community- and hospital-acquired *Escherichia coli* urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMC Infect Dis.* 2015; 15: 245. PubMed PMID: 26607324.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2015.
8. Diniz-Santos DR, Silva LR, Silva N. Antibiotics for the empirical treatment of acute infectious diarrhea in children. *Braz J Infect Dis.* 2006; 10(3): 217-27. PubMed PMID: 17568855.
9. Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. Mecanismos moleculares de resistência antibiótica em *Escherichia coli* associadas a diarreia. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2011; 28(4): 648-56. PubMed PMID: 22241263.
10. Shakoor S, Zaidi AKM, Hasan R. Tropical bacterial gastrointestinal infections. *Infect Dis Clin N Am.* 2012; 26(2): 437-53. PubMed PMID: 22632648.

CORRESPONDING AUTHOR

Paula Prazeres Magalhães

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios; Departamento de Microbiologia; Instituto de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Minas Gerais; Avenida Antônio Carlos, 6.627; CEP: 31270-901; Belo Horizonte-MG, Brasil; Phone: +55 (31) 3409-2759; e-mail: ppmagalhaes@ufmg.br.