

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



## DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Pesquisa de integron classe 1 e cassete gênico  
em *Escherichia coli* recuperadas de indivíduos sadios  
e infectados e em DNA de sedimento contaminado por  
arsênio

ORIENTADA: Clarisse Oliveira Pinto

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup> Andréa Maria Amaral Nascimento

COORIENTADOR: Prof<sup>o</sup> Edmar Chartone de Souza

BELO HORIZONTE

Março - 2013

Clarisse Oliveira Pinto

Pesquisa de integron classe 1 e cassette  
gênico em *Escherichia coli* recuperadas de  
indivíduos sadios e infectados e em DNA  
de sedimento contaminado por arsênio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Genética do Departamento de Biologia Geral do  
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do  
título de mestre em Genética.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Andréa Maria Amaral Nascimento  
Coorientador: Prof. Edmar Chartone de Souza

Belo Horizonte  
Departamento de Biologia Geral  
Instituto de Ciências Biológicas  
2013

“Quando a gente acha que tem  
todas as respostas, vem a vida  
e muda todas as perguntas.”

Luis Fernando Veríssimo

### **Agradecimento especial**

Ao meu marido Eclésio pelo apoio incondicional, à minha mãe e minha irmã Georgia pela força e compreensão e aos amigos que me incentivaram e torceram por mim.

## AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de Mestrado marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Nesses dois anos, enfrentei desafios e confesso que foram muitos, sorri, chorei, aprendi muito, amadureci, fiz novos amigos e me superei. Mas a verdade é que eu não teria conseguido sem a colaboração e apoio de muitas pessoas. Por isso venho agradecer a todos que de alguma forma contribuíram e estiveram ao meu lado nesta incrível jornada!

Agradeço a Deus por sua presença divina em minha vida e por ter me dado força para seguir em frente.

Ao meu marido Eclésio pelo companheirismo, amizade, paciência, compreensão e amor. Obrigada por me apoiar tanto! Nunca conseguirei retribuir tudo que fez e faz por mim. Você é especial e essencial em minha vida!

À minha mãe e minha irmã Georgia, pelo imenso amor, apoio, por se preocuparem e se orgulharem das minhas conquistas e ao meu pai e minha irmã Maria Paula, que mesmo longe me apoiaram. Amo vocês!

A todos os amigos e familiares que estiveram ao meu lado, torceram por mim e me proporcionaram momentos de descontração e alegria.

Aos meus orientadores Andréa Maria Amaral Nascimento e Edmar Chartone de Souza, pela confiança e oportunidade. Vocês são referências profissionais e pessoais para mim. Tenho por vocês uma imensa admiração e respeito!

Aos colegas e ex-colegas do LGM que contribuíram de diversas formas para a realização deste trabalho: Alexandre, Ana Paula, Bela, Breno, Juliana, Luíza, Malu, Marcelo, Polly, Thaís, Will e especialmente à Mari, Mona, Paulo, Raiana e Pati pelo incentivo, apoio e amizade. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias, pela troca e cumplicidade. Foi maravilhoso conviver com vocês, levarei um pouco de cada um comigo!

À Dra. Regina Maria Drummond e à querida Magna Cristina de Paiva por cederem os isolados de *E. coli* recuperados de mulheres com ITU e pela valiosa contribuição neste trabalho.

Às professoras Mônica Bucciarelli Rodriguez e Adlane Villas-Boas pela convivência e pelos ensinamentos passados.

Às queridas Andréa Reis, Rosa e Paixão que me ensinaram tanto e contribuíram nos experimentos.

À Profa. Dra. Letícia da Conceição Braga que me inspirou a enveredar pelos caminhos da Genética.

Aos colegas e professores do GENEPOP, LBEM, LDGH, LGCM e LMM por me cederem os equipamentos e o espaço em seus laboratórios para o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Dr. Roney Santos Coimbra e à Dra. Paula Prazeres Magalhães pelas valiosas sugestões na melhoria deste trabalho.

À FAPEMIG, à CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	1
LISTA DE TABELAS.....	2
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	3
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1- INTRODUÇÃO.....	7
1.1- Justificativa.....	8
1.2- <i>Escherichia coli</i> .....	10
1.3- Resistência bacteriana a antimicrobianos.....	13
1.4- Sistema integron cassette.....	17
1.5- Mineração no Quadrilátero Ferrífero.....	20
2- OBJETIVOS.....	22
2.1- Objetivo Geral.....	23
2.2- Objetivos Específicos.....	23
3- Capítulo I: Pesquisa de integron cassette em isolados de <i>E.coli</i> recuperadas de fezes de crianças saudáveis e de urina de mulheres infectadas.....	25
3.1 - Material e Métodos.....	26
3.1.1 - Isolados bacterianos.....	26

3.1.2 - Pesquisa do gene <i>intI</i> nos isolados de <i>E. coli</i> .....	26
3.1.3 – Pesquisa e sequenciamento dos cassetes gênicos dos isolados de <i>E. coli</i> .....	27
3.1.4 – Caracterização dos isolados de <i>E. coli</i> em grupos filogenéticos.....	28
3.1.5 - Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>E. coli</i> .....	30
3.2 - Resultados e Discussão.....	31
3.2.1 - Ocorrência do gene <i>intI</i> e de cassetes gênicos nos isolados de <i>E. coli</i> .....	31
3.2.2 - Caracterização dos cassetes gênicos dos integrons.....	33
3.2.3 – Grupos filogenéticos dos isolados de <i>E. coli</i> .....	35
3.2.4 - Determinação do fenótipo de resistência.....	38
3.3 – Conclusões.....	48
4 - Capítulo II: Pesquisa de integron cassete em sedimento do Córrego da Mina contaminado por arsênio.....	50
4.1 Material e Métodos.....	51
4.1.1 Amostragem.....	51
4.1.2 Extração do DNA total.....	51
4.1.3 Construção de bibliotecas de clones dos cassetes gênicos.....	51
4.1.4 PCR de cassete gênicos das bibliotecas de clones e sequenciamento.....	52
4.1.5 PCR quantitativa em tempo real (q-PCR).....	54



4.2 Resultados e Discussão.....	55
4.2.1 Caracterização físico-química da amostra.....	55
4.2.2 Características gerais das bibliotecas de cassetes gênicos.....	56
4.2.3 Análise dos cassetes gênicos das bibliotecas de clones.....	57
4.2.4 Quantificação dos genes de rRNA 16S e <i>intI</i> 1 nas amostras de sedimento.....	63
4.2.5 Conclusões.....	66
5. Conclusão Geral.....	67
6. Referências .....	69
7. Anexos.....	86

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução

- 1 Estrutura geral do integron.....18

### Capítulo I

#### Resultados e Discussão

- 2 Gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene *intI1* dos isolados de *E. coli*.....32
- 3 Gel de agarose 1,5% representando a amplificação dos cassetes gênicos dos isolados de *E. coli* .....33
- 4 Esquema de classificação de *E. coli* em grupos filogenéticos.....35
- 5 Gel de agarose 2%, apresentando a amplificação dos fragmentos gerados a partir da PCR triplex, específica para os grupos filogenéticos de *E. coli*.....36
- 6 Porcentagem de isolados de *E. coli* classificados nos grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D).....36
- 7 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *E. coli*.....41

### Capítulo II

#### Resultados e Discussão

- 8 Gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação dos cassetes gênicos das amostras de sedimento.....56
- 9 Curvas de rarefação representando a diversidade observada dos clones sequenciados dos cassetes gênicos das bibliotecas do sedimento do Córrego da Mina.....57
- 10 (A) Curva de diluição, (B) Curva padrão, (C) valor de  $C^t$  da amplificação do gene *intI1*.....64

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

#### Materiais e Métodos

- 1 Iniciadores e programa usados para amplificar o gene *intI* dos isolados de *E. coli*.....27
- 2 Iniciadores e programa usados para amplificação e sequenciamento dos cassetes gênicos dos isolados de *E. coli*.....28
- 3 Iniciadores e programa utilizados na PCR triplex para classificação das amostras isoladas de *E. coli* em grupos filogenéticos.....29

#### Resultados e Discussão

- 4 Classificação dos isolados de *E. coli* em grupos filogenéticos.....37
- 5 CIM dos antimicrobianos para as amostras de *E. coli* .....43
- 6 Presença do gene *intI*, dos cassetes gênicos e do fenótipo de resistente nos isolados de *E. coli*.....46

### Capítulo II

#### Material e Métodos

- 7 Iniciadores usados para amplificação dos cassetes gênicos das amostras de sedimento.....52

#### Resultados e Discussão

- 8 Iniciadores e programa usados para amplificação dos clones de cassetes gênicos.....53
- 9 Concentração de metais e metaloide no sedimento do Córrego da Mina.....55
- 10 Características gerais da água do Córrego da Mina.....55
- 11 Distribuição geral dos clones e OTUs das bibliotecas.....56
- 12 Produtos dos cassetes gênicos com correspondências em banco de dados a partir da biblioteca de clones SMC.....60
- 13 Produtos dos cassetes gênicos com correspondências em banco de dados a partir da biblioteca de clones SMS.....61

#### Anexo

- 14 Resultado da busca de sequências homólogas no GenBank para caracterização dos cassetes gênicos dos isolados de *E. coli*.....87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

>	Superior
<	Inferior
AMP	Ampicilina
AMX	Amoxicilina
As	Arsênio
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente aderente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EHEC	<i>E. coli</i> enteroemorrágica
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>E. coli</i> extraintestinal
Fe	Ferro
g	Gramma
ITU	Infecção do trato urinário
KAN	Canamicina
Kg	Quilograma
L	Litro
M	Molar
Mn	Manganês
mg	Miligrama
Mg	Magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar

µg	Micrograma
µl	Microlitro
MDR	Fenótipo de multirresistência
MNEC	<i>E. coli</i> associada à meningite/septicemia
NaCl	Cloreto de sódio
NAL	Ácido nalidíxico
Ni	Níquel
ng	Nanograma
ORF	<i>Open reading frame</i> / “quadro de leitura aberta”
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTU	Operational taxonomic unity/ "unidade taxonômica operacional"
P	Fósforo
PCR	Polymerase Chain Reaction / "Reação em Cadeia da Polimerase"
pb	pares de base
Pb	Chumbo
pH	potencial hidrogeniônico
QF	Quadrilátero Ferrífero
qPCR	PCR quantitativa
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SMC	Sedimento do Córrego da Mina coletado na estação chuvosa
SMS	Sedimento do Córrego da Mina coletado na estação seca
SMT	Estreptomicina
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
SXT	Sulfametoxazol/trimetoprim
TET	Tetraciclina
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênica
Zn	Zinco

## RESUMO

Os integrons são elementos genéticos que incorporam cassetes gênicos, convertendo-os em genes funcionais. Esses elementos têm se destacado como um importante reservatório de genes de resistência a antimicrobianos. No entanto, a alta diversidade desses genes, sugere que o sistema integron cassette também desempenha um papel importante na adaptação das bactérias. Este estudo investigou a frequência de integron classe 1 e a diversidade de cassetes gênicos em duas populações distintas de *Escherichia coli*, de crianças saudáveis da Amazônia e de mulheres com ITU e em amostras de sedimento do Córrego da Mina, contaminado por arsênio, colhidas nas estações seca e chuvosa. A maioria dos isolados de *E. coli* de mulheres com ITU abrigou os genes *intI1* (68%) e cassetes gênicos (47,6%) ao contrário dos isolados de crianças saudáveis (12% e 12%, respectivamente). A maioria dos cassetes gênicos presentes nos isolados de *E. coli* são determinantes de resistência a aminoglicosídeos (*aadA5*, *aadA22* e *aadA1*) e, em menor frequência, determinantes de resistência a trimetoprim (*dfr1*, *dfr17* e *dfrA17*). O grupo filogenético de *E. coli* mais representativo, dentre os isolados de mulheres com ITU, foi o grupo B2, e dentre os isolados de crianças saudáveis, o grupo A. A concentração inibitória mínima revelou que os isolados de mulheres com ITU apresentaram uma maior frequência de resistência em relação aos isolados de crianças saudáveis. Além disso, a multirresistência ocorreu em todos os isolados de mulheres com ITU e em 52,4% dos isolados de crianças saudáveis. A investigação das amostras de sedimento do Córrego da Mina revelou uma diversidade de ORFs dos cassetes gênicos não relacionadas à resistência antimicrobiana, sendo que a maioria delas não apresentou homologia com sequências contidas no banco de dados, sugerindo que as comunidades bacterianas de ambientes naturais apresentam uma gama de ORFs ainda não caracterizadas. Os resultados obtidos pela técnica de PCR quantitativa indicou que a frequência de bactérias que abrigam o gene *intI1* foi quase cinco vezes maior na amostra de sedimento coletada na estação seca em comparação com a amostra coletada na estação chuvosa. Portanto, os dados deste estudo sugerem que o sistema integron cassette está presente nos ambientes clínico e natural.

## ABSTRACT

Integrations are genetic elements that incorporate gene cassettes, converting them into functional genes. These elements have been highlighted as an important reservoir of antimicrobial resistance genes. However, the high diversity of these genes suggests that the integron cassette system also plays an important role in the adaptation of the bacteria. This study investigated the frequency of class 1 integron and diversity of gene cassettes into two distinct populations of *Escherichia coli* from healthy children of the Amazon and women with UTI - women with urinary tract infection and stream sediment samples from the stream Mina, contaminated by arsenic collected during dry and rainy seasons. Most women with UTI *E. coli* isolates harbored *intI 1* genes (67%) and gene cassettes (38%) unlike isolates from healthy children (12% and 12%, respectively). Most gene cassettes found in *E. coli* isolates are determinants of resistance to aminoglycosides (*aadA5*, *aadA22* and *aadA1*) and to a lesser frequency, determinants of trimethoprim resistance (*dfr1*, *dfr17* and *dfrA17*). The most representative *E. coli* phylogenetic group among clinical isolates was group B2, while group A was more represented among the healthy children isolates. The minimum inhibitory concentration assay revealed that frequency of resistance was higher among women with UTI isolates than healthy children isolates. Moreover, multidrug resistance occurred in all women with UTI isolates but in 52,4% the healthy children isolates. The investigation of the sediment samples from the Mina stream revealed a diversity of ORFs of gene cassettes that were not related to antimicrobial resistance and that, in its majority, did not have homology to database sequences. This suggests that bacterial communities in natural environments show a range of ORFs not yet characterized. Quantitative PCR indicated that the frequency of bacteria harboring the *intI1* gene was almost five times greater in the dry season samples than those collected in the rainy season. Therefore, data from this study suggest that integrations are widespread in both clinical and natural environments.

# 1. Introdução



## 1.1 Justificativa

As bactérias são componentes essenciais da biota da Terra, pois participam de processos ecológicos fundamentais na manutenção dos ecossistemas (Rossello-Mora e Amann, 2001; Torsvik *et al.*, 2002; Schleifer, 2004). Esses micro-organismos estão amplamente distribuídos pelos mais diversos habitats do planeta: água, solo, ar e seres vivos, incluindo o homem (Bryson & Szybalski, 1952; Lawrence, 1999; Fry, 2000).

As bactérias apresentam uma grande variabilidade genética e um alto grau de diversidade funcional, o que lhes permite responder rapidamente às mudanças ambientais. A pressão seletiva exercida pelos agentes antimicrobianos e pelo próprio ambiente favorece a evolução do genoma e a seleção dos micro-organismos resistentes a esses agentes (Kolár *et al.*, 2001; Tenailon *et al.*, 2001; Conly, 2002). Nas últimas décadas, a disseminação de bactérias multirresistentes Gram-negativas em nosocomiais e outras comunidades, tornou-se um problema para a saúde pública (Jones, 2003).

As enterobactérias constituem 80% dos isolados de bastonetes Gram-negativos de importância médica e 50% das bactérias isoladas nos laboratórios de microbiologia. Muitas espécies são causadoras de infecções urinárias, intestinais e de feridas cirúrgicas, abscessos, pneumonias, sepses e meningites (Farmer III *et al.*, 2007). *Escherichia coli* ocupa o segundo lugar, depois de *Staphylococcus aureus*, dentre as espécies mais prevalentes em infecções hospitalares no mundo. Contudo, na América Latina, *E. coli* ocupa o primeiro lugar na lista dos patógenos mais frequentes em infecção hospitalar, principalmente associada à infecção do trato urinário – ITU (Fedler *et al.*, 2006). No Brasil, este patógeno é responsável por 48% das ITUs; 11,2% das infecções da corrente sanguínea e 7,2% das infecções de tecidos moles (Sader *et al.*, 2001).

A ITU é um grave problema de saúde que afeta milhões de pessoas a cada ano, sendo mais frequente em mulheres. Geralmente, essa infecção é causada por bactérias Gram-negativas, sendo a *E. coli* uropatogênica (UPEC) a mais frequente, seguida por *Klebsiella pneumoniae*. (Lina *et al.*, 2007). Linhagens de bactérias patogênicas estão se tornando resistentes às terapias padrão por meio de mutação e/ou aquisição de genes exógenos de resistência. As bactérias são capazes de adquirir genes de resistência por meio de conjugação, transdução ou transformação (Schlüter *et al.*, 2007). A conjugação é o mecanismo mais frequentemente associado à transferência horizontal de genes. Esse mecanismo ocorre em uma ampla variedade de gêneros e espécies bacterianas. Neste mecanismo, moléculas de DNA mobilizáveis podem ser transferidas de uma doadora para uma célula receptora, através de contato celular (White *et al.*, 2001).

Elementos genéticos móveis, como plasmídios, transposons e o sistema integron cassette, são vetores comuns e têm desempenhado papel importante na disseminação de genes de resistência a antimicrobianos de *E. coli* e outras bactérias (Schlüter *et al.*, 2007). Os integrons são sistemas de expressão gênica que capturam ORFs, incorporadas nos cassette gênicos, convertendo-as em genes funcionais e têm sido encontrados tanto em bactérias Gram-negativas principalmente, como em bactérias Gram-positivas (Weldhagen, 2004). Integrons foram relatados primeiramente em isolados clínicos nos anos 1980 e continuam a ser amplamente estudados, devido à sua associação com elementos genéticos móveis e disseminação de cassetes gênicos de resistência a antimicrobianos (Hall *et al.*, 1999; Leverstein-van Hall *et al.*, 2002). A presença de integrons multirresistentes em isolados clínicos de *E. coli* tem sido frequentemente relatada. No entanto, existem poucos relatos sobre a presença de integron cassette em amostras de *E. coli* isoladas de crianças saudáveis (Vinué *et al.*, 2008).

Diversos estudos relatam a ocorrência e diversidade de integrons em amostras de várias fontes, incluindo fezes, carne e estação de tratamento de esgoto (Kang *et al.*, 2005; Sunde 2008; Ma *et al.*, 2011). Portanto, os integrons não estão limitados ao ambiente clínico, sendo que cerca de 10% dos genomas bacterianos que têm sido parcialmente ou completamente sequenciados, incluindo representantes de uma ampla diversidade de filos e ambientes, apresentam este elemento genético (Boucher *et al.*, 2007).

Na última década, especial atenção tem sido dada a integrons em ambientes naturais, a fim de reunir informações sobre sua ecologia e diversidade e para compreender seu papel na adaptação das bactérias (Guerin *et al.*, 2009). Estudos de cassetes gênicos associados com integrons no ambiente indicam que a maior parte dos cassetes inclui novas sequências não relacionadas com genes conhecidos de resistência aos antimicrobianos (Stokes *et al.*, 2001; Holmes *et al.*, 2003). Poucos estudos investigaram a diversidade dos cassetes gênicos em áreas contaminadas como rejeitos de minas e resíduos industriais (Nemergut *et al.*, 2004; Koenig *et al.*, 2009), enquanto nenhum estudo relativo a água/sedimento contaminado por atividade mineradora foi encontrado.

## **1.2 *Escherichia coli***

*E. coli* é uma bactéria da família Enterobacteriaceae que se caracteriza morfológicamente como micro-organismo bacilar, Gram-negativo, anaeróbico facultativo. É amplamente distribuída no ambiente, sendo componente da microbiota do intestino dos animais de sangue quente, incluindo o homem (Drasar; Hill, 1974). De acordo com critérios genéticos e clínicos, linhagens de *E. coli* podem ser classificadas em três grandes grupos: comensais, patogênicas intestinais e extra-intestinais (Smith *et*

*al.*, 2007). A *E. coli* denominada comensal é encontrada na camada de muco que cobre as células epiteliais do trato intestinal de mamíferos (Sweeney *et al.*, 1996; Kapper *et al.*, 2004), coexistindo normalmente com benefícios mútuos. Raramente esta bactéria causa doença exceto em hospedeiros imunocomprometidos ou quando a barreira gastrointestinal normal é violada. Amostras comensais de *E. coli* não possuem as características especializadas de virulência que são encontradas nas linhagens patogênicas intestinais e extra-intestinais (Russo *et al.*, 2000). Análises filogenéticas têm mostrado que cepas deste agente podem ser classificadas dentro de quatro grupos filogenéticos principais A, B1, B2 ou D. As linhagens desses quatro grupos diferem entre si em algumas características como habitat, temperatura ideal de crescimento e perfil de resistência aos antimicrobianos (Gordon, 2004). O tamanho do genoma também varia entre os grupos filogenéticos, sendo que as linhagens pertencentes aos grupos B2 e D apresentam genoma maior que os grupos A e B1 (Bergthorsson *et al.*, 1998). As linhagens causadoras de infecções extra-intestinais geralmente pertencem ao grupo B2, porém algumas podem ser classificadas no grupo D. Por outro lado, os isolados comensais pertencem aos grupos A e B1 (Bigen *et al.*, 1998; Clermont *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2000).

As amostras de *E. coli* patogênicas apresentam diversos patotipos, caracterizados pela combinação de fatores de virulência adquiridos por mutação cromossômica e/ou por meio de elementos genéticos móveis (Teng *et al.*, 2004; Marrs *et al.*, 2005). De acordo com os genes de virulência, o patotipo diarreiogênico inclui *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (Teng *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2005). Os patotipos relacionados a infecções extra-intestinais foram denominados ExPEC são eles *E. coli*

causadora de ITU denominada uropatogênica (UPEC) e a *E. coli* associada à meningite/septicemia (MNEC). Há ainda uma classe de *E. coli* patogênica distinta, a *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) (Russo *et al.*, 2000; Kaper *et al.*, 2004, Luck *et al.*, 2005).

As infecções intrainestinais e extraintestinais causadas por este patógeno são responsáveis pela morte de 2 milhões de pessoas por ano (Kosek *et al.*, 2003, Russo *et al.*, 2003). Infecções extraintestinais (IEI) são comuns em todas as faixas etárias e podem envolver praticamente qualquer órgão ou região anatômica. As IEIs causadas frequentemente por *E. coli* são sepse e choque induzido por endotoxina, infecções do trato urinário (ITU) e de feridas, pneumonia em pacientes imunossuprimidos hospitalizados e meningite em neonatos (Kaper *et al.*, 2004; Koneman *et al.*, 2008).

A ITU é a segunda infecção bacteriana mais frequente na prática clínica e é caracterizada pela presença de um número significativo de micro-organismos no sistema urinário, detectada por meio de uma urocultura. Essa doença ocorre em todo o mundo e na maioria dos casos afeta indivíduos saudáveis. Ocorre em ambos os sexos, no entanto, é mais comum em mulheres na faixa etária de 18 a 24 anos (Marrs *et al.*, 2005; Car, 2006). As ITUs podem comprometer somente a bexiga, o que especifica o diagnóstico de cistite, que pode ser sintomática ou não, ou afetar os rins, o que leva a considerá-la pielonefrite (Lopes & Tavares, 2005).

As UPECs são responsáveis por 75-90% dos casos de ITU adquiridos na comunidade e por cerca de 50% dos episódios de ITU hospitalar. As linhagens de UPEC possuem uma grande variedade de fatores de virulência codificados por genes específicos, que possibilitam a colonização e posterior infecção do trato urinário. Entre estes fatores de virulência estão adesinas, invasinas, toxinas, sideróforos e evasinas localizados em plasmídios ou ilhas de patogenicidade (Kaper *et al.*, 2004; Marrs *et al.*,

2005, Lina *et al.*, 2007). Frequentemente, as linhagens de UPEC que colonizam o trato urinário também podem ser isoladas a partir do trato intestinal do paciente, o que sugere que elas podem ser provenientes da própria microbiota intestinal do paciente (Russo *et al.*, 1995).

O tratamento empírico de pacientes com ITU é uma prática rotineira e a seleção dos antimicrobianos é geralmente baseada em dados de susceptibilidade bacteriana relativa à comunidade dos mulheres com ITU, tais como aminoglicosídeos, agentes betalactâmicos, sulfametoxazol-trimetropina, quinolonas e nitrofurantoína (Camargo *et al.*, 2002, Hillier *et al.*, 2006).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos usados no tratamento dessas infecções vem aumentando. Este fenômeno tem sido observado em vários países e está se tornando um problema cada vez mais grave, uma vez que limita o tratamento eficaz das infecções bacterianas. Em geral, a resistência aos agentes antimicrobianos vem sendo disseminada devido à pressão seletiva causada pela frequente utilização destes agentes (Sahm *et al.*, 2001; Hillier *et al.*, 2007).

### **1.3 Resistência bacteriana a antimicrobianos**

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um processo adaptativo que garante a sobrevivência das bactérias resistentes quando há pressão de antimicrobianos. Essa resistência pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é natural e evolutivamente conservada nos micro-organismos, resultante da genética, estrutura e fisiologia do micro-organismo. No entanto, este tipo de resistência é rara e está associada apenas a alguns indivíduos da população bacteriana. A resistência adquirida é

resultado de mutações e transferência horizontal de genes. (Weston, 1996; Lorian, 2005).

Bactérias resistentes são encontradas em todos os ambientes e o aumento da ocorrência da resistência a antimicrobianos em bactérias provenientes de ambientes naturais, como rios, lagos, sedimentos e solos, vem sendo documentada (Díaz-Cruz *et al.*; 2003; Schwartz *et al.*; 2003, Lima-Bittencourt *et al.*, 2007; Pontes *et al.*, 2009). A susceptibilidade a antimicrobianos varia consideravelmente tanto entre quanto dentre diferentes grupos de micro-organismos (Weston, 1996). Desde a descoberta da penicilina e sua disponibilidade para uso no início dos anos 1940, os antimicrobianos vêm sendo amplamente utilizados no tratamento de doenças infecciosas, nas medicinas humana e veterinária, na agricultura e pecuária. Os agentes antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções bacterianas podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo principal de ação. Os principais mecanismos de ação são: inibição da síntese da parede celular, ligação à membrana citoplasmática, inibição da síntese de ácidos nucleicos, inibição da tradução e antagonismo metabólico (Neu, 1992). A utilização constante e indiscriminada dos antimicrobianos, principalmente no ambiente clínico, onde as bactérias patogênicas e comensais são desafiadas com elevadas concentrações dessas drogas, tem resultado na resistência aos antimicrobianos entre vários agentes patogênicos e promoveu a disseminação de linhagens bacterianas resistentes, reduzindo as possibilidades para o tratamento de infecções (Who, 2000; Putman *et al.* 2000; Levy, 2002; O'Brien, 2002; Hancock, 2007). Com frequência bactérias utilizam mais de uma estratégia para evitar a ação dos antimicrobianos; assim, a ação conjunta de múltiplos mecanismos pode produzir um acentuado aumento da resistência aos antimicrobianos (Putman *et al.* 2000). Os mecanismos utilizados pelas bactérias para inativar os efeitos dos antimicrobianos são alteração de permeabilidade da membrana, pela alteração no

alvo onde atua o antimicrobiano, o que reduz a sua capacidade de ligação, modificação ou inativação da droga por enzimas e bomba de efluxo e biofilmes (McManus, 1997; White & Mcdermott, 2001). Sabe-se que bactérias em biofilmes são mais resistentes ao tratamento com antimicrobianos que as células planctônicas correspondentes. Uma possível razão para este aumento da resistência é a barreira de penetração que os biofilmes podem apresentar aos antimicrobianos. Os biofilmes são definidos como uma matriz de biopolímeros da população bacteriana aderente entre si e / ou a superfícies (Costerton *et al.*, 1999). Devido à sua capacidade de sobreviver sob diversas condições ambientais, a formação de biofilmes pode atuar também como um nicho de proteção para os agentes patogênicos no ambiente natural (Hall-Stoodley *et al.*, 2005).

Estudos mostram que a microbiota comensal, especialmente, a microbiota intestinal, têm um papel importante na resistência a antimicrobianos (Andremont, 2003). A alta densidade de bactérias combinada a uma frequente exposição aos antimicrobianos favorece a seleção de bactérias resistentes na microbiota comensal (Tenailon *et al.*, 2010). A emergência e disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos tornaram-se um problema tanto hospitalar, como na comunidade e, vem se observando que esse fenômeno é também um problema de ordem ecológica (Witte, 2000; Furuya *et al.*, 2006; Livermore, 2006; Rice, 2006).

A poluição causada pela ação antrópica, por metais pesados e outras substâncias tóxicas, favorecem a criação de ambientes naturais propícios ao estabelecimento de bactérias resistentes a esses compostos (Bruins *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2001; Okeke & Edelman, 2001; Díaz-Cruz *et al.*, 2003). A introdução dos antimicrobianos, incluindo os metais, e de compostos tóxicos em ambientes naturais é resultado da combinação de diferentes fatores: produção desses produtos em larga escala pelas indústrias; quantidade utilizada; frequência de liberação desses compostos em ecossistemas



naturais, como solo, rios, lagos e oceanos, e a capacidade de absorção e decomposição metabólica dos compostos nesses ambientes (Nwosu, 2001).

É importante ressaltar que alguns micro-organismos, como bactérias e fungos, são produtores naturais de antimicrobianos e que a maioria dos antimicrobianos utilizados para tratar infecções é produzida por eles no ambiente, o que significa que os genes de resistência a antimicrobianos também surgem em habitats não clínicos (Alonso *et al.*, 2001). Além disso, em ambientes naturais, os genes de resistência a antimicrobianos podem ter papéis metabólicos que podem incluir a biossíntese de macromoléculas e a manutenção da homeostase (Fajardo *et al.*, 2009).

A disseminação de bactérias resistentes e de genes de resistência depende de diferentes fatores, principalmente, a pressão devido ao uso de antimicrobianos e a transferência horizontal, na qual há transferência de genes de resistência entre bactérias por meio de mecanismos como conjugação, transformação e transdução (Jernberg *et al.*, 2010). A transferência horizontal de genes é um processo amplamente disseminado entre as bactérias e pode ocorrer entre linhagens de uma mesma espécie ou entre diferentes espécies ou gêneros bacterianos. Esse processo é fundamental para aquisição de material genético exógeno e permite uma rápida adaptação do micro-organismo a ambientes onde estejam presentes agentes antimicrobianos (McManus, 1997; Lawrence, 1999).

Os genes de resistência podem estar localizados no cromossomo ou em elementos genéticos móveis como plasmídios e transposons. Associados a estes podem estar os integrons, elementos capazes de capturar e expressar os cassetes gênicos. Os integrons abrigam a maioria de genes de resistência em elementos genéticos móveis, plasmídios e transposons, permitindo a transferência da resistência entre as bactérias, sendo importantes na transferência de genes de resistência de bactérias comensais para

as patogênicas (Lévesque *et al.*, 1995; Hall & Collis, 1998; Leverstein-van Hall, 2002; Roe *et al.*, 2003).

#### 1.4 Sistema integron-cassete

A resistência a antimicrobianos é um problema mundial e os genes relacionados a ela têm recebido considerável atenção. Muitos desses genes estão associados com elementos genéticos móveis, permitindo a circulação entre e dentre estes replicons e sua transferência entre as células, incluindo diferentes gêneros. Genes que conferem resistência a várias classes de antimicrobianos e desinfetantes são encontrados nos integrons na forma de cassetes gênicos (Weldhagen, 2004). Estes genes não possuem todas as estruturas necessárias para o seu próprio funcionamento, portanto só serão expressos quando associados aos integrons, que são elementos capazes de capturar e expressar esses genes. Os cassetes gênicos nem sempre estão inseridos no integron, podendo ser encontrados como moléculas de DNA na forma livre circular (Stokes & Hall, 1993; Hall & Collis, 1995).

Os integrons (Figura 1) são descritos como uma estrutura genética muito eficiente, pela qual as bactérias podem adquirir genes de resistência (Hall & Collis, 1995). Eles possuem duas regiões estratégicas localizadas na região conservada 5' (5' CS) capazes de mobilizar e inserir as ORFs (*quadro de leitura aberta*): gene *int*, que codifica uma recombinase sítio-específica, denominada integrase e a região *attI*, sítio onde ocorre a recombinação, inserção ou excisão dos cassetes gênicos (Martinez-Freijo *et al.*, 1999). A expressão desses genes é dirigida por um promotor chamado P1 ou P<sub>ant</sub>, ou mais raramente por dois, P1 e P2, ambos localizados no 5' CS do integron (Hanau-Berçot *et al.*, 2002).

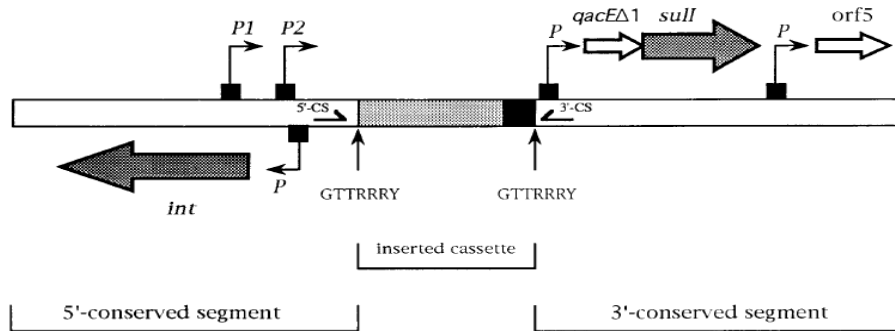


Figura 1. Estrutura geral do integron (Lévesque *et al.*, 1995).

A região variável dos integrons inclui uma ou mais ORFs, os cassetes gênicos. Eles são unidades compostas por uma ORF seguida de um sítio de recombinação, o elemento 59-base, também chamado *attC*. A integrase catalisa a recombinação entre o sítio *attI* e o sítio *attC*. Os cassetes gênicos não possuem um promotor, portanto, os integrons são essenciais para a transcrição desses genes (Carattoli, 2001). As sequências de aminoácidos das integrases são usadas para a classificação dos integrons em cinco classes denominadas: integrons de classe 1 (*intI1*), classe 2 (*intI2*), classe 3 (*intI3*), classe 4 (*intI4*) e classe 5 (*intI5*), sendo que os tipos mais relacionados com genes de resistência são os integrons de classe 1, 2 e 3. (Fluitz & Schmitz, 2004). A maioria dos integrons descritos até agora são de classe 1 e a maioria destes apresenta na região conservada 3'CS um gene de resistência a compostos de amônio quaternário (*qacEΔ1*) e um gene de resistência à sulfonamida (*sulI*) (Partridge *et al.*, 2009; Saenz *et al.*, 2004). Mais de 130 cassetes diferentes já foram identificados em integrons de classe 1, enquanto que nos de classe 2 só foram identificados seis cassetes de resistência (Mazel, 2006; Yang *et al.*, 2009, Cambray *et al.*, 2010). Cassetes que conferem resistência a aminoglicosídeos e trimetoprim são frequentemente encontrados nos integrons de classe 1 de isolados clínicos e ambientais (Fluitz & Schmitz, 1999; White *et al.*, 2001; Cambray *et al.*, 2010).

Várias características influenciam a expressão gênica dos cassetes como tamanho do promotor, número de cópias dos cassetes, distância relativa do gene ao promotor e presença de promotores adicionais. A expressão pode ser aumentada se um segundo promotor é incluído próximo ao primeiro ou se o cassete está presente em múltiplas cópias. Os genes que se encontram próximos ao promotor tendem a ser expressos com maior eficácia do que aqueles que estão localizados distantes do promotor, apresentando maior efeito na resistência da bactéria ao antimicrobiano (Collis & Hall, 1995; Weldhagen, 2004).

Integrans constituem uma classe importante de elementos genéticos devido à sua capacidade de adquirir genes de resistência a diversos antimicrobianos e disseminá-los entre as bactérias (Carattoli, 2003; Mazel, 2006; Boucher *et al.*, 2007). Ao longo dos últimos anos, a análise de muitos genes de resistência a antimicrobianos identificados em isolados clínicos, humanos e animais, de bactérias Gram-negativas, principalmente Enterobacteriaceae, revelou a importância de integrans na disseminação de genes de resistência entre bactérias de diferentes origens geográficas (Carattoli, 2001; Roe *et al.*, 2003).

Os integrans são encontrados com maior frequência em isolados clínicos. Entretanto, estes isolados tem sido encontrados em ambientes aquáticos, solo e sedimento, o que reflete a sua disseminação (Baquero *et al.*, 2008; Binh *et al.*, 2009; Rosewarne *et al.*, 2010). O papel do ambiente na disseminação de bactérias resistentes ainda não é bem compreendido. Estudos recentes vêm sendo realizados para avaliar o impacto da utilização dos antimicrobianos e a diversidade dos genes de resistência a essas drogas em populações bacterianas de ambientes naturais (Nascimento *et al.*, 1999; Baquero *et al.*, 2008; Koczura *et al.*, 2011).

Além de genes que conferem resistência a antimicrobianos, os integrons em ambientes naturais podem expressar genes relacionados a adaptação das bactérias a diferentes pressões ambientais (Elsaied *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 2007; Koenig *et al.*, 2009). Um único integron pode conter diversos genes de adaptação que podem ser mobilizados, reorganizados e disseminados entre as bactérias. Como consequência, os integrons desempenham um papel importante na evolução do genoma bacteriano e na adaptação dos micro-organismos às pressões do ambiente (Holmes *et al.*, 2003).

A poluição causada pela ação antrópica, por metais pesados, pesticidas, medicamentos e outras substâncias tóxicas, vem contribuindo significativamente para o aumento da resistência a esses compostos em bactérias de ambientes naturais (Bruins *et al.*, 2000; McArthur & Tuckfield, 2000; Alonso *et al.*, 2001; Díaz-Cruz *et al.*, 2003). Dentre as principais ações antrópicas que leva à contaminação de ecossistemas aquáticos está a mineração (Kopezinski, 2000).

### **1.5 Mineração no Quadrilátero Ferrífero**

O Quadrilátero Ferrífero (QF) é o principal produtor de minério de ferro do Brasil e uma das mais importantes regiões de mineração do mundo (Spier *et al.*, 2003). A produção de ouro, que se iniciou há 300 anos, tornou essa região internacionalmente conhecida como pioneira na produção de ouro no século XVIII e, posteriormente, como produtora de minérios de ferro, manganês e pedras preciosas. No entanto, a exploração aurífera histórica desta região provocou a liberação de, pelo menos, 390.000 t de As nos rios do QF (Borba *et al.*, 2000).

As fontes de contaminação de As podem ser naturais ou antrópicas. As fontes naturais de As são provenientes de minerais e rochas que contêm As e os solos e

sedimentos formados a partir destas rochas; a atividade geotermal e vulcânica. Dentre as rochas que contém As, destacam-se aquelas que possuem mineralizações sulfetadas. As fontes de As antrópicas incluem: atividades relacionadas à preservação de madeiras, à utilização agrícola (pesticidas, herbicidas, inseticidas, desfolhantes), rejeitos provenientes da mineração e das atividades de refino de metais não ferrosos e da queima de carvão rico em As (Thornton & Farago, 1997; USEPA, 2000).

No QF, as principais fontes naturais de As estão relacionadas às rochas que hospedam depósitos auríferos sulfetados e as fontes antrópicas de As são as pilhas de rejeito, solos e sedimentos contaminados. (Borba *et al.*, 2004). Nos sedimentos e nas águas superficiais dos rios e córregos do QF, os maiores teores de As estão localizados nas proximidades das mineralizações auríferas, onde as concentrações de As podem alcançar até 4500 mg/kg nos sedimentos e 350 µg/L na água (Borba *et al.*, 2003). O As se apresenta como o maior problema ambiental, não só pela elevada toxicidade, mas também pelas altas concentrações que se encontram em águas e sedimentos dos rios da região (Eleutério, 1997; Costa, 2006).

## **2- Objetivos**

## **2.1 – Objetivo Geral**

Identificar e analisar os genes de resistência presentes em sistemas integron cassette de duas populações distintas de *Escherichia coli*, de crianças saudas e de mulheres com infecção do trato urinário, recuperadas em diferentes tempos, espaços geográficos. Além disso, identificar e comparar a diversidade de cassetes gênicos presentes em amostras de sedimento do Córrego da Mina, historicamente impactado por atividade mineradora.

## **2.2 – Objetivos Específicos**

### **2.2.1 – Capítulo I: Pesquisa de integron cassette em isolados de *E. coli* recuperados de fezes de crianças saudas e de urina de mulheres com infecção do trato urinário**

- Investigar a frequência do gene *intI 1* e a diversidade de cassetes gênicos nos isolados de *E. coli*.
- Comparar a diversidade de cassetes gênicos encontrados nos isolados de *E. coli* de crianças saudas e de mulheres com infecção do trato urinário.
- Relacionar a presença destes cassetes gênicos à resistência fenotípica aos antimicrobianos testados.
- Determinar os grupos filogenéticos de *E. coli* nos isolados bacterianos.



### **2.2.2 – Capítulo II: Pesquisa de integron cassete em sedimento do Corrêgo da Mina contaminado por arsênio**

- Investigar e comparar a diversidade de sequências dos cassetes gênicos presentes nas amostras de sedimento do Corrêgo da Mina colhidas nas estações seca e chuvosa.
- Determinar, por meio de q-PCR, a abundância absoluta do gene da integrase classe 1 *intI1* presente nas amostras de sedimento do Corrêgo da Mina.

**3 - Capítulo I: Pesquisa de integron cassette em  
isolados de *E.coli* recuperadas de fezes de  
crianças sadias e de urina de mulheres com  
infecção do trato urinário**

### **3.1 - Material e Métodos**

#### **3.1.1 - Isolados bacterianos**

Um total de 84 isolados de *Escherichia coli* foram incluídos neste estudo. Deste total, 42 isolados bacterianos são provenientes de fezes de crianças saudáveis de três comunidades de seringueiros da Amazônia, onde havia pouca ou nenhuma utilização de antimicrobianos, colhidas em 1978 (Nascimento *et al.*, 1999) e 42 isolados de *E. coli* resistentes a quinolonas recuperados em 2009 da urina de mulheres com diagnóstico clínico e laboratorial de infecção do trato urinário adquirida na comunidade (gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Regina Maria Nardi Drummond e pela Profa. MSc. Magna Cristina de Paiva). Os procedimentos de isolamento, identificação e a determinação da resistência às quinolonas foram realizados no Laboratório Patologia Clínica Geraldo Lustosa (Paiva *et al.*, 2012). Como controle positivo do gene *intI* foi utilizada a *E. coli* BH100, portadora do cassete gênico *aadA*, da coleção do Laboratório de Genética de Micro-organismos da UFMG.

#### **3.1.2 - Pesquisa do gene *intI* nos isolados de *E. coli***

A amplificação do gene *intI1* dos isolados de *E. coli* foi realizada utilizando os iniciadores IntI1\_F e IntI1\_R e as condições para a amplificação descritas por Lévesque e colaboradores (1993) (Tabela 1). A mistura para a reação da PCR (20 µL) consistiu de 50 ng de DNA molde, tampão para PCR, 0,5 µM de cada um dos iniciadores, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP e 1 U de Taq polimerase (Fermentas Life Sciences, Canadá). Posteriormente à reação de PCR, 4 µL das amostras foram aplicadas

em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio na concentração de 5 mg/mL, e submetidas à eletroforese em uma tensão de 90 volts em 30cm, com tampão TAE 1X. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) e fotodocumentadas. Como controle negativo foi usado somente a mistura para PCR, como controle positivo foi usado a *E. coli* BH100 e como marcador de peso molecular (MM) o 1 Kb plus (Invitrogen, EUA).

Tabela 1. Iniciadores e programa utilizados para amplificação do gene *intI* dos isolados de *E. coli*

<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Amplicon (pb)</b>
IntI1_F	CCTCCCGCACGATGATC	280
IntI1_R	TCCACGCATCGTCAGGC	
<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>
1. Desnaturação inicial	95	3 min
2. Desnaturação	95	1 min
3. Anelamento	59	50 s
4. Extensão	72	1 min
5. Extensão final	72	10 min

Foram realizados 30 ciclos das etapas de 2 a 4.

### 3.1.3 - Pesquisa e sequenciamento dos cassetes gênicos dos isolados de *E. coli*

Os cassetes gênicos dos isolados de *E. coli* foram amplificados utilizando os iniciadores INF e INB (Lévesque *et al.*, 1993) e o programa descrito na Tabela 2. A mistura para a reação da PCR (20 µL) continha entre 50 e 150 ng de DNA molde, gelatina 0,001%, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão para PCR, 0,2 mM de dNTP, 0,5µM de cada um dos iniciadores e 1 U de *Taq* polimerase (Fermentas Life Sciences, Canadá). Posteriormente à reação de PCR, 4 µL das amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5%, conforme descrito no item 3.1.2. A purificação dos produtos da PCR foi realizada por reação de precipitação com solução polietilenoglicol e NaCl 2,5 M. As reações de sequenciamento dos cassette gênicos foram realizadas com os iniciadores INF e INB

(Tabela 2). A mistura para a reação continha entre 50 e 200 ng de produto de PCR, Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit e 0,5  $\mu$ M dos iniciadores, separadamente, resultando em um volume total de 10  $\mu$ L. A reação de sequenciamento foi conduzida em termociclador (Eppendorf) com um ciclo inicial de 95°C por 2 segundos; 35 ciclos de 95°C por 25 segundos, 55°C por 15 segundos e 60°C por 3 minutos. As sequências parciais foram checadas para a qualidade, alinhadas e editadas para a produção de um consenso usando o Phred v.0.020425 (Erwing & Green, 1998), Phrap v.0.990319 (Green, 1994) e Consed 12.0 (Gordon *et al.*, 1998). As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados, seção “outros”, usando as ferramentas de pesquisa do GenBank BLASTN.

Tabela 2. Iniciadores e programa usados na amplificação dos cassetes gênicos dos isolados de *E. coli*

<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Amplicon (pb)</b>
INF	GGC ATCCAAGCAGCAAG	variável
INB	AAGCAGACTTGACCTGA	
<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>
1. Desnaturação inicial	95	15 min
2. Desnaturação	94	1 min
3. Anelamento	55 a 47	30 s
4. Extensão	72	3 min
5. Extensão final	72	10 min

Cada ciclo foi composto das etapas 2 a 4. Cada ciclo foi repetido uma vez e a temperatura de anelamento diminuía 1°C a cada ciclo. Quando atingiu a temperatura de 47° C o ciclo foi repetido por 11 vezes.

### 3.1.4 – Caracterização dos isolados de *E. coli* em grupos filogenéticos

Os 84 isolados de *E. coli* foram classificados em grupos filogenéticos empregando-se a técnica de PCR triplex, desenvolvida por Clermont *et al.* (2000), que se baseia na presença ou ausência de dois genes (*chuA* e *yjaA*) e um fragmento de DNA anônimo (TSPE4.C2) (Tabela 3). O agrupamento filogenético pode também ser

realizado com auxílio de enzimas multilocus ou por ribotipagem. Porém, estas técnicas são complexas e laboriosas. Com isso, a filogenia por meio de PCR utilizando três primers propostos por Clermont *et al.* (2000) é um método mais rápido e simples para classificação dos isolados de *E. coli*, nos diferentes grupos. A amplificação dos genes *chuA* (279 pb) e *yjaA* (211 pb) e do fragmento de DNA TspE4.C2 (152 pb) foi obtida usando as seguintes condições de reação de acordo com Clermont e colaboradores (2000). A mistura para a reação da PCR (20 µL) continha 200ng de DNA genômico, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão para PCR, 0,2 mM de dNTP, 0,5µM de cada um dos iniciadores e 2,5 U de *Taq* polimerase (Fermentas Life Sciences, Canadá). Amostras dos produtos de amplificação foram aplicadas em gel de agarose 2% conforme o item 3.1.2. Como controle negativo foi usado somente a mistura para PCR. A classificação em grupos filogenéticos foi realizada de acordo com a descrição de Clermont e colaboradores (2000).

Tabela 3. Iniciadores e programa utilizados na PCR triplex para classificação das amostras isoladas de *E. coli* em grupos filogenéticos

<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência (5' - 3')</b>	<b>Amplicon (pb)</b>
ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279
ChuA.1	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
YjaA.1	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211
YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
TspE4C2.1	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152
TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG	
<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>
1. Desnaturação inicial	94	5 min
2. Desnaturação	94	30 s
3. Anelamento	55	30 s
4. Extensão	72	30 s
5. Extensão final	72	7 min

### 3.1.5 - Determinação da susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de *E. coli*

Para a determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *E. coli*, foi utilizado o método de diluição em meio ágar Müller-Hinton, de acordo com CLSI (2012). Para isso, foram escolhidas seis classes de antimicrobianos, representantes dos medicamentos usados no tratamento de infecções humanas causadas por bactérias Gram-negativas:  $\beta$  lactâmico (ampicilina e amoxicilina), aminoglicosídeo (canamicina e estreptomicina), tetraciclina (tetraciclina), quinolona (ácido nalidíxico e ciprofloxacina) e inibidores da via metabólica do folato (sulfametoxazol/trimetoprim). O meio ágar Müller-Hinton foi suplementado com concentrações múltiplas de 2 até 512  $\mu\text{g/mL}$  para os antimicrobianos escolhidos, separadamente. Foi utilizado um inóculo padrão de cerca de  $10^5$  UFC/ponto, de uma cultura crescida, em caldo nutriente, com aplicação simultânea de 32 amostras por placa, com um replicador tipo *Steer*. As placas foram incubadas à 37°C, por 24 horas. Após esse período, foi realizada a leitura dos resultados, para o estabelecimento da concentração inibitória mínima (CIM) definida como a menor concentração inibitória do crescimento de cada isolado bacteriano (CLSI). Isolados que apresentaram zonas de resistência intermediária foram considerados resistentes. Um isolado foi considerado multirresistente quando apresentou resistência a pelo menos três diferentes classes de antimicrobianos.

## 3.2 - Resultados e Discussão

### 3.2.1 - Ocorrência do gene *intI* e de cassetes gênicos nos isolados de *E. coli*

Neste trabalho, foram investigados 84 isolados de *E. coli*, sendo 42 provenientes de crianças saudáveis da Amazônia, coletados em 1978, e 42 de *E. coli* resistentes a quinolonas recuperados em 2009 da urina de mulheres com diagnósticos clínico e laboratorial de infecção do trato urinário (ITU) adquirida na comunidade. Do total dos isolados, 39% (33/84) apresentaram o gene *intI*. Dentre os isolados de crianças saudáveis, 12% (5/42) foram positivos para o gene *intI* e nos recuperados da urina 67% (28/42).

Alguns estudos têm destacado o aumento da incidência de resistência aos antimicrobianos e sua relação com a presença de integrons em *E. coli* comensal oriundas de crianças e adultos saudáveis de muitos países (Levy *et al.* , 1988 ; Lester *et al.* , 1990 ; Osterblad *et al.* , 2000 ; Pallecchi *et al.* , 2007). No estudo de Pallecchi e colaboradores (2007), realizado com isolados de *E. coli* recuperados de fezes de indivíduos saudáveis de uma comunidade rural boliviana, foi encontrada uma frequência semelhante (12%) de integrons classe 1 em comparação com nosso estudo.

A frequência de integrons nos isolados de mulheres com ITU encontrada neste estudo foi maior do que a encontrada no estudo de Fallah e colaboradores (2012) que foi de 50,3% em isolados de *E. coli* recuperados de indivíduos com ITU. Os integrons de classe 1 são cada vez mais relatados como um reservatório de genes de resistência a antimicrobianos em bastonetes Gram-negativos (Partridge *et al.*, 2009; Cambray *et al.*, 2010). No entanto, eles também têm sido detectados em linhagens de bactérias clínicas Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e espécies de



*Corynebacterium* em diversos hospitais em todo o mundo (Tauch *et al.*, 2002; Barraud *et al.*, 2011; Pinilla *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2006).

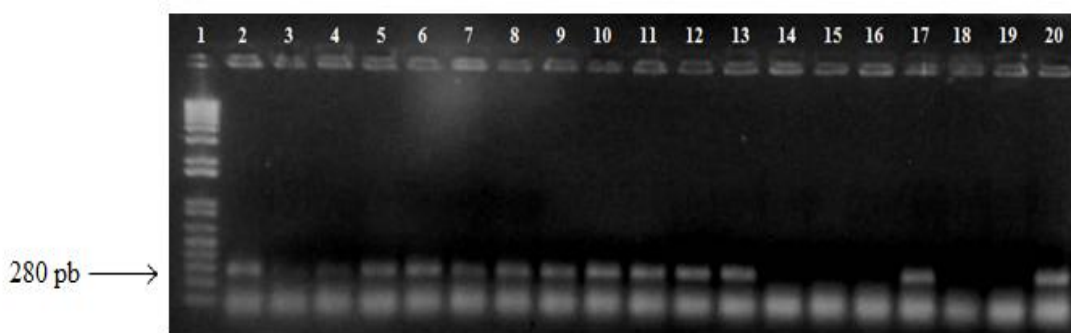


Figura 2. Gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene *intI*. 1. Marcador de peso molecular 1kb (invitrogen, EUA), 2-18. Isolados de *E. coli*, 19. Controle negativo, 20. Controle positivo, *E. coli* BH100.

Genes conferindo resistência a diferentes classes de antimicrobianos são encontrados em cassetes, constituindo um importante conjunto de genes de resistência bacteriana (Partridge *et al.*, 2009). Diversos estudos descrevem a presença de cassetes gênicos em bactérias resistentes, patogênicas ou não, de diferentes habitats (Goldstein *et al.*, 2001, Grape *et al.*, 2005, Bartoloni *et al.*, 2009, Elsaied *et al.*, 2011). No presente estudo, o tamanho dos amplicons dos cassetes gênicos variou de 400 a 2000 pb (Figura 3). Todos os isolados *intI*-positivos (12%, 5/42) de crianças saudáveis abrigaram um único cassete gênico, ao contrário dos isolados de mulheres com ITU *intI*-positivos (71,4%, 20/28). Sendo que 28,6% (8/28) dos isolados de mulheres com ITU *intI*-positivos não amplificaram fragmentos correspondentes a cassetes gênicos, sugerindo que eles abrigam integrons vazios. Os amplicons do gene *intI1* (280 pb) destes oito isolados foram sequenciados confirmando a presença de integrase nestes isolados (em anexo).

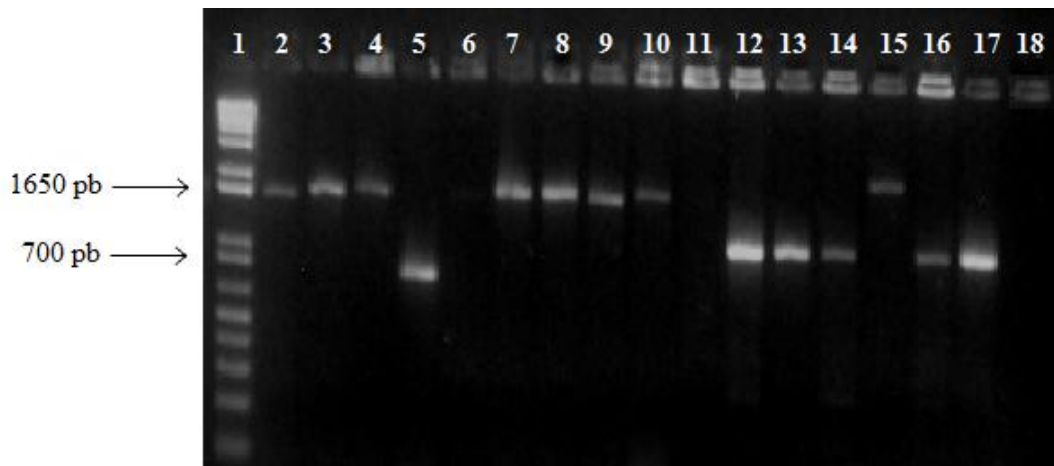


Figura 3. Gel de agarose 1,5% representando a amplificação dos cassetes gênicos. 1. Marcador de peso molecular 1kb (invitrogen, EUA), 2 - 16. Isolados de *E. coli*, 17. Controle positivo, *E. coli* BH100, 18. Controle negativo.

### 3.2.2 - Caracterização dos cassetes gênicos dos integrons

Tentou-se sequenciar os 25 amplicons a fim de caracterizar os cassetes gênicos presentes nos isolados de *E. coli*. Foram utilizadas diferentes concentrações de DNA (50 a 300 ng) e de iniciadores, diferentes temperaturas de anelamento e também a clonagem dos amplicons. Entretanto, após diversas tentativas apenas oito sequências foram obtidas e estão apresentadas na Tabela 14. Alguns estudos relatam dificuldades em sequenciar algumas amostras com o protocolo padrão de sequenciamento ABI. Alguns fatores como qualidade e quantidade de DNA estão relacionados ao sucesso do sequenciamento. Além disso, há muitos tipos de regiões difíceis (Kieleczawa, 2006). Portanto, alguns desses fatores podem ter dificultado o sequenciamento dos cassetes gênicos do presente estudo.

A análise das sequências obtidas revelou que o gene mais frequente foi o *aadA* (alelos *aadA1*, *aadA5* e *aadA22*), o qual confere resistência aos aminoglicosídeos, estreptomicina e espectomicina (Tabela 14). Sabe-se que estes cassetes gênicos estão entre os mais prevalentes nos integrons de classe 1. Os cassetes *aadA* têm sido detectados em integrons de bactérias Gram-negativas isoladas de humanos e outros (Sunde *et al.*, 1999; Sallen *et al.*, 1995, Bailey *et al.*, 2010). Além do gene *aadA*, também foi

encontrado neste estudo o cassete gênico *dfr* (alelos *dfrA17* e *dfr1*), que confere resistência a trimetoprim. No entanto, deve-se ressaltar que este foi detectado apenas nos isolados de mulheres com ITU.

Como esperado, os quatro isolados de mulheres com ITU, portadores do cassete gênico *dfr*, foram também resistentes ao trimetoprim (Tabela 6). No entanto, o isolado 23, portador do gene *aadA*, foi sensível à estreptomicina embora apresentasse MIC de 32µg/ml. A sequência de nucleotídeos do alelo *aadA5* presente no isolado 23 apresenta diferenças em relação aos demais alelos encontrados nos isolados de crianças saudáveis T22, M13, H12 e H23 que foram resistentes à estreptomicina (Tabela 6). De acordo com Lévesque e colaboradores (1995) os cassetes gênicos associados aos integrons podem ter expressão variável que pode ser causada por diversos fatores, por exemplo, o número de cópias do integron no plasmídio. A posição do cassete também influencia sua expressão uma vez que os genes que se encontram próximos ao promotor tendem a ser expressos com maior eficácia do que aqueles que estão localizados distantes, o que pode levar a variações consideráveis na susceptibilidade da bactéria aos antimicrobianos (Weldhagen, 2004). Entretanto, este fator pode ser excluído uma vez que este isolado apresentou um único cassete gênico presente no integron. Portanto, uma única ou baixo número de cópias do integron no plasmídio poderia ter influenciado a expressão do gene *aadA* no isolado 23, que se apresentou sensível à estreptomicina. Além disso, outra hipótese poderia ser uma baixa atividade do promotor ou uma mutação na região promotora.

Os cassetes gênicos encontrados neste estudo também foram relatados em diferentes espécies de bactérias (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*), em diferentes habitats (animais ou humanos) e em áreas geográficas distintas (Yan *et al.*, 2010; Fallah *et al.*, 2012; Lukkana *et al.*, 2012). Estes dados

sugerem que os integrons de classe 1 contribuem significativamente para a disseminação de genes de resistência entre bactérias da mesma ou de diferentes espécies e de diferentes áreas geográficas.

### 3.2.3 – Grupos filogenéticos dos isolados de *E. coli*

Os 84 isolados de *E. coli* foram caracterizados para o grupo filogenético de origem (A, B1, B2 ou D). O esquema de classificação está ilustrado na Figura 4.

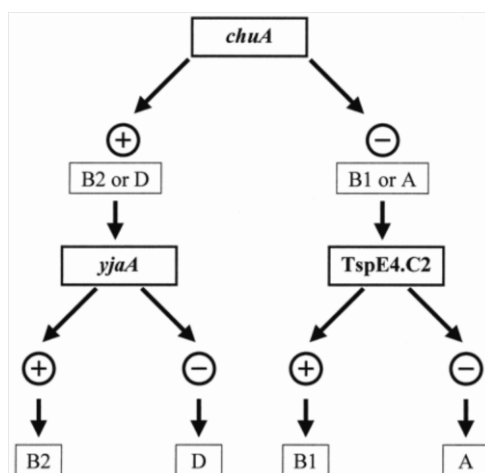


Figura 4. Esquema de classificação de *E. coli* em grupos filogenéticos pela amplificação dos genes *chuA* e *yjaA* e fragmento de DNA TSPE4. C2.

Fonte: Clermont *et al.*, 2000.

No presente estudo, dentre os isolados de mulheres com ITU, o grupo B2 foi o mais prevalente 54,8%, resultado semelhante ao encontrado por Sabaté e colaboradores (2006) em amostras de *E. coli* (UPEC), e por Zhang e colaboradores (2002) em amostras de *E. coli* isoladas do trato urinário de mulheres com primeiro episódio de ITU. Quanto aos demais isolados, 21,4% pertenceram ao grupo A e 11,9% aos grupos D e B1 (Figura 6).

Nos isolados de crianças saudias o grupo A foi o mais prevalente (50%), seguido pelo grupo B2 com 42,8%. Apenas 7,1% dos isolados foram classificados como sendo

do grupo B1 (Figura 6). Outros autores obtiveram resultados diferentes, uma vez que observaram uma maior frequência de isolados comensais pertencente ao grupo B1 (Clermont *et al.*, 2000; Sabaté *et al.*, 2006). Essas diferenças podem estar relacionadas à variação geográfica, a diferenças nas características individuais e/ou da população hospedeira ou a combinação destes fatores (Zhang *et al.*, 2002). Além disso, os resultados até agora descritos podem ser explicados pelo pequeno número de estudos envolvendo análise filogenética de amostras da microbiota indígena, especialmente a microbiota intestinal, uma vez que ela é considerada um reservatório natural de linhagens patogênicas (Blattner *et al.*, 1997).

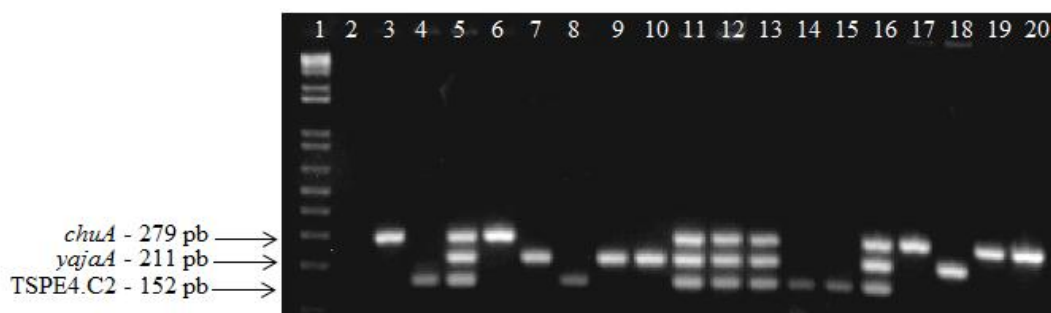


Figura 5. Gel de agarose 2%, apresentando a amplificação dos fragmentos gerados a partir da PCR triplex, específica para os grupos filogenéticos de *E. coli*. 1. Marcador de peso molecular 1kb (invitrogen, EUA); 2. Controle negativo; 3. Grupo D; 4. Grupo B1; 5. Grupo B2; 6. Grupo D; 7. Grupo A; 8. Grupo B1; 9 e 10. Grupo A; 11, 12 e 13. Grupo B2; 14 e 15. Grupo B1; 16. Grupo B2; 17. Grupo D; 18. Grupo A; 19 e 20. Grupo D.

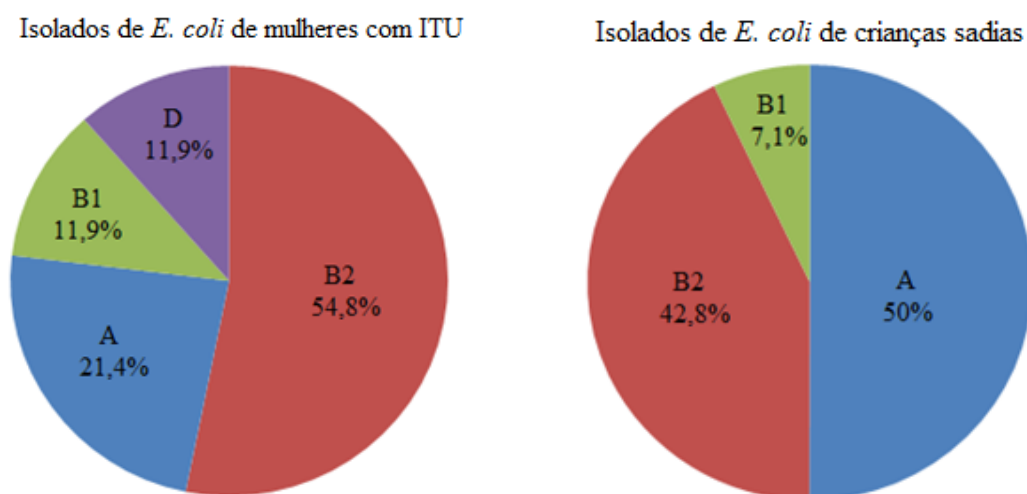


Figura 6. Porcentagem de isolados de *E. coli*, classificados nos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D.

Tabela 4. Classificação dos isolados de *E. coli* de mulheres com ITU e de crianças saudáveis em grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D)

Isolados de mulheres com ITU	Grupo filogenético	Isolados de crianças saudáveis	Grupo filogenético
01	D	H22	B2
02	B1	H7	A
03	B2	H19	A
04	D	H12	B2
05	A	H5	B2
06	B1	H2	A
07	A	H16	B2
08	A	H20	B2
10	B2	H18	B2
11	B2	H23	A
12	B2	H1	A
13	B1	H8	A
15	B1	H3	B2
16	B2	H11	B2
17	D	M14	B2
19	A	M4	A
20	D	M3	A
21	D	M13	A
23	B1	M11	A
24	A	M12	B1
26	A	M8	B1
27	A	M6	A
31	B2	M2	A
32	B2	P25	B2
34	B2	P21	A
38	A	P1	B2
43	B2	P24	B2
45	B2	P23.2	B2
46	B2	P32	B2
56	B2	P29.1	B2
59	B2	P9.1	B1
60	B2	P5	A
62	B2	P9.2	B2
70	B2	T21	A
74	B2	T9.1	A
78	B2	T23	B2
88	B2	T22	B2
90	B2	SP14	A
92	A	SP3	A
94	B2	SP11	A
98	B2	SP13	A
100	B2	SP4	A

### 3.2.4 - Determinação do fenótipo de resistência

A resistência aos antimicrobianos tem aumentado em todo o mundo e especialmente a multirresistência é um problema importante, uma vez que representa um desafio ao tratamento de infecções (Tenover, 2006). O desenvolvimento da resistência bacteriana é consequência da rápida evolução do genoma bacteriano sob pressão seletiva dos antimicrobianos e/ou do meio ambiente. Portanto, a pressão seletiva exercida pelo uso dos antimicrobianos é a condição mais importante para o aumento da frequência de bactérias multirresistentes (Kolár *et al.*, 2001). A Organização Mundial de Saúde aponta outros fatores que têm contribuído para o aumento da incidência da multirresistência microbiana: pobreza, acesso inadequado aos medicamentos, erro no diagnóstico e na prescrição da quantidade do antimicrobiano, medicamentos falsificados, preferência pelas drogas de largo espectro e deficiência na vigilância epidemiológica intra e extra-hospitalar, dentre outros (OMS 2000).

A resistência bacteriana a antimicrobianos não é restrita a bactérias patogênicas, mas também envolve a microbiota comensal de seres humanos e outros, uma vez que esses micro-organismos são continuamente expostos à pressão seletiva gerada pelo tratamento com antimicrobianos, podendo tornar-se um importante reservatório de linhagens resistentes e de genes de resistência (APUA).

Neste estudo, foi determinada a CIM dos antimicrobianos sobre os isolados de *E. coli* de mulheres com ITU e de crianças saudáveis. De acordo com os limites propostos pelo CLSI (2012) para técnica de diluição em ágar, todos os isolados foram interpretados como resistentes aos antimicrobianos quando apresentaram CIMs iguais ou maiores do que os valores de resistência padronizados para ampicilina ( $\geq 32$  µg/mL), amoxicilina ( $\geq 32$  µg/mL), canamicina ( $\geq 64$  µg/mL), tetraciclina ( $\geq 16$  µg/mL), ácido

nalidíxico ( $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$ ), ciprofloxacina ( $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ ) e sulfametoxazol/trimetoprim ( $\geq 76$  e  $4$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). Para estreptomicina, foi considerado resistente o isolado que apresentou CIM  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ , baseado em estudo anterior (Chiew *et al.*, 1998). A interpretação dos resultados foi realizada pela observação visual da presença ou ausência de crescimento das colônias, em cada concentração dos antimicrobianos testados. No ensaio foram incluídas duas placas controle, sem antimicrobiano, para confirmar a viabilidade dos isolados bacterianos, no início e fim do teste. Todos os isolados de *E. coli* de mulheres com ITU foram resistentes a tetraciclina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina e sulfametoxazol/trimetoprim, enquanto para canamicina, 59,5% dos isolados foram resistentes.

Os antimicrobianos mais utilizados no tratamento de pacientes com ITU são os aminoglicosídeos, betalactâmicos, sulfametoxazol-trimetoprim, quinolonas e nitrofurantoína (Camargo *et al.*, 2002). O tratamento empírico de infecções urinárias baixas, em pacientes da comunidade, particularmente nas mulheres é prioritariamente feito com a associação sulfametoxazol/trimetoprim, ou apenas esta última droga (Warren *et al.*, 1999). As quinolonas também são amplamente utilizadas no tratamento das ITUs. No entanto, vem sendo observado um aumento significativo da resistência bacteriana a estas drogas (Rodrigues *et al.*, 2006). No presente estudo, verificou-se a resistência de todos os isolados de mulheres com ITU aos antimicrobianos, sulfametoxazol/trimetoprim e à quinolona ácido nalidíxico e à fluoroquinolona ciprofloxacina. A emergente resistência a fluoroquinolonas em linhagens de *E. coli* tem causado crescente preocupação, devido aos problemas terapêuticos. Um aumento gradual da resistência à ciprofloxacina em *E. coli* foi observada de 1995 (0,7%) a 2001 (2,5%) por Bolon e colaboradores (2004).



A Figura 7 apresenta os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *E. coli*. Os isolados bacterianos recuperados de crianças saudáveis apresentaram uma menor frequência de resistência em relação aos isolados de mulheres com ITU para todos os antimicrobianos testados, exceto para a tetraciclina, onde a frequência de resistência também foi de 100%. Essa alta frequência de resistência à tetraciclina em *E. coli* relacionada a ITU poderia ser explicada pela pressão seletiva devido ao uso extensivo deste antimicrobiano desde sua descoberta. As tetraciclina foram descobertas nos anos de 1940, apresentam baixo custo, e desde então vêm sendo usadas na prevenção e tratamento de infecções em seres humanos e animais e também em níveis subterapêuticos em alimentos para animais, como promotores de crescimento (Chopra & Roberts, 2001). Deve-se destacar que os isolados de crianças saudáveis foram obtidos em 1978 de comunidades isoladas da Amazônia, caracterizadas pelo baixo uso de antimicrobianos, devido à longa distância de centros urbanos e a dificuldade de transporte de medicamentos na época. A alta frequência de bactérias resistentes à tetraciclina em ambiente onde a bactéria presumivelmente não tenha entrado em contato com antimicrobianos, sugere que genes de resistência podem também ser mantidos estáveis na ausência ou baixa pressão seletiva. Além disso, pode-se considerar que plasmídios abriguem outros genes que conferem alguma vantagem seletiva como, por exemplo, enzimas que aumentam a eficiência da colonização e genes que conferem resistência a metais pesados, dentre outros (Salyers & Amabile-Cuevas, 1997).

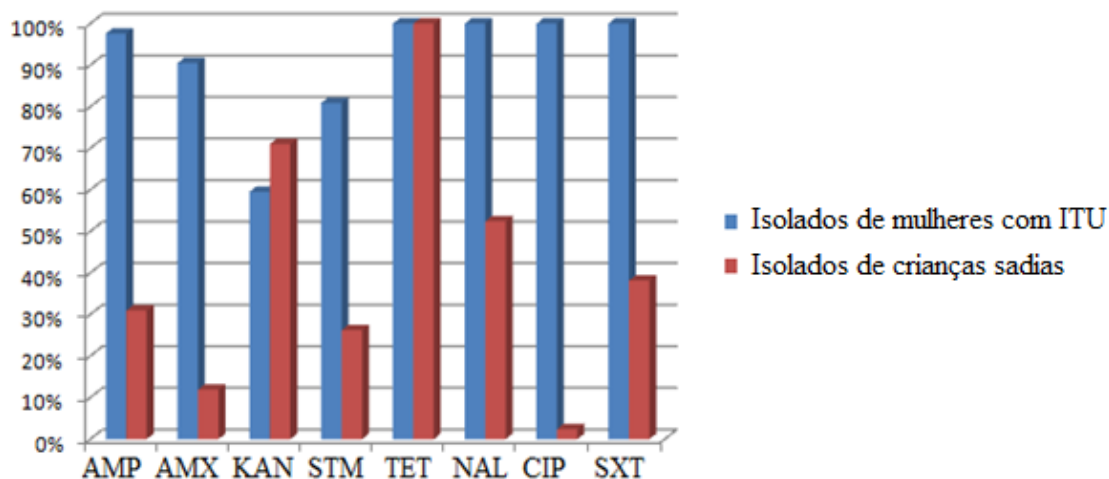


Figura 7: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *E. coli* de mulheres com ITU e de crianças saudáveis. AMP, ampicilina; AMX, amoxicilina; KAN, canamicina; SMT, estreptomicina; TET, tetraciclina; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; SXT, sulfametoxazol/trimetoprim.

Para os demais antimicrobianos, as frequências de resistência variaram de 2,4% para a ciprofloxacina a 52,4% para o ácido nalidíxico. Alguns estudos têm demonstrado que a resistência a fluoroquinolonas não está restrita a isolados clínicos, mas está presente na população saudável e em animais de criação. Prevalências de resistência elevadas foram relatadas para adultos saudáveis na Espanha (24%), em crianças mexicanas saudáveis (54%) e animais de fazenda, como frango (90%) e suínos (50%) (Garau *et al.*, 1999; Zaidi *et al.*, 2003; Saenz *et al.*, 2004). No trabalho de Yang e colaboradores (2009) com amostras de *E. coli* comensais recuperadas de indivíduos saudáveis, as frequências de resistência foram maiores do que as encontradas no presente trabalho para os antimicrobianos ampicilina (50,2%), estreptomicina (52%), trimetoprim/sulfametoxazol (47,6%) e ciprofloxacina (10,7%).

Todos os isolados de mulheres com ITU apresentaram perfil de multirresistência (MDR), ou seja, foram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos e dentre estes isolados, 42,8% (18/42) foram resistentes a todos os antimicrobianos testados. O relato de isolados de *E. coli* multirresistentes é frequente e é considerado um grave

problema de saúde (Maynard *et al.*, 2003, Japoni *et al.*, 2008). Nos trabalhos de Fallah e colaboradores (2012) e Hussain e colaboradores (2012), em diferentes localizações geográficas, com isolados de *E.coli* recuperados de indivíduos com ITU, as frequências de isolados multirresistentes foram 77,5% e 75%, respectivamente. Esses resultados sugerem que são necessárias alterações no tratamento de pacientes com infecções causadas por *E. coli* (Fallah *et al.*, 2012).

Nenhum dos isolados bacterianos de crianças saudáveis foi resistente a todos os antimicrobianos testados e, além disso, eles apresentaram uma menor frequência de multirresistência 52,4% (22/42), em comparação aos isolados de mulheres com ITU. A tabela 5 apresenta os valores da CIM para os isolados.

Tabela 5. CIM dos antimicrobianos para as amostras de *E. coli* de mulheres com ITU e de crianças saudáveis (n=84)

Isolados de mulheres com ITU	CIM (µg/mL)							
	AMP	AMX	KAN	STR	TET	NAL	CIP	SXT
01	>1024	>512	08	>512	256	512	08	>512
02	>1024	>512	08	128	256	>512	64	>512
03	>1024	>512	08	64	256	>512	64	>512
04	>1024	>512	08	>512	256	>512	08	>512
05	>1024	>512	>512	>512	256	>512	08	>512
06	>1024	>512	>512	>512	256	512	08	>512
07	>1024	>512	512	32	256	>512	>512	>512
08	>1024	>512	512	128	256	512	128	>512
10	>1024	>512	64	>512	256	>512	64	>512
11	>1024	>512	08	32	128	>512	64	>512
12	>1024	>512	32	>512	256	>512	64	>512
13	1024	>512	32	32	256	>512	08	>512
15	>1024	>512	08	>512	512	>512	64	>512
16	>1024	>512	08	32	128	256	04	>512
17	>1024	>512	08	>512	512	>512	64	>512
19	>1024	>512	512	32	512	>512	256	>512
20	>1024	>512	>512	>512	512	>512	>512	>512
21	>1024	>512	256	>512	512	>512	>512	>512
23	>1024	>512	>512	32	512	>512	64	>512
24	>1024	>512	512	128	512	>512	128	>512
26	32	>512	08	128	128	>512	64	32
27	>1024	>512	32	>512	16	>512	08	>512
31	>1024	>512	64	>512	512	>512	64	>512
32	>1024	>512	64	>512	512	>512	64	>512
34	>1024	>512	32	>512	512	>512	64	>512
38	>1024	>512	08	>512	512	>512	64	>512
43	>1024	>512	08	512	512	>512	64	>512
45	>1024	>512	08	>512	512	>512	64	>512
46	>1024	>512	64	>512	512	>512	16	>512
56	>1024	>512	32	>512	512	>512	08	>512
59	08	04	32	16	512	>512	32	04
60	16	04	32	512	512	>512	32	04
62	>1024	>512	08	512	512	>512	128	16
74	>1024	>512	08	512	512	>512	16	16
78	16	08	>512	512	512	>512	16	512
88	>1024	>512	128	>512	512	>512	16	512
90	>1024	>512	>512	>512	512	>512	08	512
92	>1024	>512	>512	512	512	>512	16	512
94	32	04	08	16	256	>512	16	16
98	>1024	>512	08	>512	512	>512	256	512
100	>1024	>512	128	>512	512	>512	16	512

Tabela 5. Continuação

Isolados de crianças saudias	AMP	AMX	KAN	STR	TET	NAL	CIP	SXT
H22	08	04	08	512	512	32	02	02
H7	08	04	08	128	32	32	02	02
H19	08	04	08	512	512	32	02	02
H12	16	04	08	512	512	>512	32	08
H5	08	04	08	16	32	32	02	02
H2	16	02	08	16	128	>512	02	32
H16	08	02	08	>512	512	32	02	02
H20	08	04	08	16	512	16	02	02
H18	1024	04	08	16	128	16	02	02
H23	04	04	>512	256	512	16	02	02
H1	08	04	08	16	32	16	02	08
H8	08	04	08	16	512	16	02	32
H3	16	04	08	16	128	16	02	02
H11	128	04	08	16	128	16	02	02
M14	>1024	>512	08	512	512	32	02	02
M4	16	08	>512	512	256	32	02	08
M3	04	04	08	16	32	16	02	02
M13	04	04	08	128	512	64	02	04
M11	64	32	08	32	128	16	02	04
M12	16	04	16	32	32	128	02	04
M8	64	04	04	4	32	64	02	04
M6	04	04	08	16	32	16	02	04
M2	04	04	08	32	16	16	02	04
P25	04	04	08	32	16	16	02	02
P21	16	04	08	32	16	32	02	04
P1	04	04	16	32	16	16	02	04
P24	04	08	08	32	16	16	02	04
P23.2	04	08	16	32	16	16	02	04
P32	04	08	08	32	16	16	02	02
P29.1	08	08	08	32	16	16	02	02
P9.1	08	08	08	32	16	16	02	04
P5	04	04	32	32	16	16	02	32
P9.2	08	08	08	16	16	32	02	02
T21	16	32	08	32	16	32	02	04
T9.1	16	32	16	32	16	512	02	16
T23	04	04	08	16	16	16	02	02
T22	04	04	08	512	512	16	02	04
SP14	04	04	08	32	16	64	02	32
SP3	04	32	08	32	16	32	02	02
SP11	04	04	16	32	16	64	02	32
SP13	04	04	08	32	16	64	02	16
SP4	04	04	08	>512	512	16	02	02

AMP, ampicilina ( $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$ ); AMX, amoxicilina ( $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$ ); KAN, canamicina ( $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ ); SMT, estreptomicina ( $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ ); TET, tetraciclina ( $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$ ); NAL, ácido nalidíxico ( $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$ ); CIP, ciprofloxacina ( $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ ); SXT, sulfametoxazol/trimetoprim ( $\geq 76$  e 4  $\mu\text{g/mL}$ ). A cor cinza representa que na maior concentração testada (512/1024  $\mu\text{g/mL}$ ) ainda houve crescimento bacteriano.

Em 2006, Paauw e colaboradores demonstraram que a multirresistência em Enterobacteriaceae está fortemente associada com a presença de integrons e é independente da espécie ou da origem do isolado. Esses elementos genéticos também são considerados como fatores cruciais para o desenvolvimento de multirresistência em muitas outras bactérias, uma vez que abrigam cassetes gênicos (Bass *et al.*, 1999; Ochman *et al.*, 2000; Roe *et al.*, 2003; Stokes *et al.*, 2001). Em estudo com *E. coli* isoladas de amostras de fezes de animais produtores de alimentos, fezes de humanos e pacientes com infecções do trato urinário em Hong Kong, a frequência de multirresistência foi de 92,5% e o gene *intI* estava presente em 61,5% dos isolados (Ho *et al.*, 2009).

No presente estudo, dentre os 42 isolados de *E. coli* de mulheres com ITU que foram multirresistentes, 28 apresentaram integron. Dos 22 isolados recuperados de crianças saudáveis que apresentaram perfil de multirresistência, apenas três continham integron. Entretanto, esse elemento genético também foi detectado em dois isolados (T22 e H23), não-multirresistentes. De acordo com os resultados sobre a presença de integrons e os fenótipos de resistência, os integrons de classe 1 podem estar relacionados ao fenótipo de MDR. No entanto, não se pode atribuir aos integrons de classe 1 a determinação desse fenótipo, uma vez que a maioria dos cassetes gênicos encontrados confere resistência aos aminoglicosídeos. Além disso, a frequência de integrons vazios foi de 28,6% dentre os isolados bacterianos de origem clínica. Portanto, a relação entre a presença de integrons e o fenótipo de multirresistência pode ser devida a outros genes que coexistem com os integrons no mesmo plasmídeo fora da região de cassetes gênicos (Clímaco, 2011).

Tabela 6. Presença do gene *intI*, dos cassetes gênicos e do fenótipo resistente aos antimicrobianos testados nos isolados de *E. coli* de mulheres com ITU e de crianças saudáveis

Isolados	Presença do gene <i>intI</i>	Presença de cassete gênico	Fenótipo
*01	+	+	AMP, AMX, STR, TET, CIP, SXT, NAL
*02	+	+	AMP, AMX, STR, TET, CIP, SXT, NAL
*03	+	+	AMP, AMX, STR, TET, CIP, SXT, NAL
*04	+	+	AMP, AMX, STR, TET, CIP, SXT, NAL
*05	+	+	AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*06			AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*07			AMP, AMX, KAN, TET, NAL, CIP, SXT
*08			AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*10	+		AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*11			AMP, AMX, TET, NAL, CIP, SXT
*12	+	+	AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*13			AMP, AMX, KAN, TET, NAL, CIP, SXT
*15	+		AMP, AMX, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*16			AMP, AMX, TET, NAL, CIP, SXT
*17	+	+	AMP, AMX, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*19			AMP, AMX, KAN, TET, NAL, CIP, SXT
*20	+		AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*21	+		AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*23	+	+	AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*24	+		AMP, AMX, KAN, TET, NAL, CIP, SXT
*26	+		AMP, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*27	+	+	AMP, AMX, KAN, STR, TET, CIP, SXT
*31	+		AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*32	+	+	AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*34	+	+	AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT

Tabela 6. Continuação

Isolados	Presença do gene <i>intI</i>	Presença de cassete gênico	Fenótipo
*38	+	+	AMP, AMX, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*43	+	+	AMP, AMX, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*45	+	+	AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*46	+	+	AMP, AMX, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*56	+	+	AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*59			KAN, TET, NAL, CIP, SXT
*60			AMP, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*62			AMP, AMX, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*70	+	+	AMP, AMX, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*74			AMP, AMX, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*78			AMP, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*88	+	+	AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*90	+	+	AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*92			AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*94			AMP, TET, NAL, CIP, SXT
*98	+	+	AMP, AMX, STR, TET, NAL, CIP, SXT
*100	+		AMP, AMX, KAN, STR, TET, NAL, CIP, SXT
**H22			STR, TET, NAL
**H7			STR, TET, NAL
**H19			STR, TET, NAL
**H12	+	+	AMP, STR, TET, NAL, CIP, SXT
**H5			NAL, TET
**H2			AMP, TET, NAL, SXT
**H16			STR, TET, NAL
**H20			TET, NAL
**H18			AMP, TET
**H23	+	+	KAN, TET, STR
**H1			SXT, TET
**H8			TET, SXT, NAL
**H3			AMP, NAL, TET
**H11			AMP, TET
**M14	+	+	AMP, AMX, STR, TET, NAL
**M4			AMP, KAN, STR, TET, NAL, SXT
**M3			TET
**M13	+	+	STR, TET, NAL, SXT
**M11			AMP, AMX, TET, SXT
**M12			AMP, TET, NAL, SXT



Tabela 6. Continuação

Isolados	Presença do gene <i>intI</i>	Presença de cassete gênico	Fenótipo
**M8			AMP, TET, NAL, SXT
**M6			TET, SXT
**M2			TET, SXT
**P25			TET
**P21			AMP, TET, NAL
**P1			TET
**P24			TET
**P23.2			TET
**P32			TET
**P29.1			TET
**P9.1			TET
**P5			KAN, TET, SXT
**P9.2			TET, NAL
**T21			AMP, AMX, NAL, TET
**T9.1			AMP, AMX, TET, NAL, SXT
**T23			TET
**T22	+	+	STR, TET
**SP14			TET, NAL, SXT
**SP3			AMX, TET, NAL
**SP11			TET, NAL, SXT
**SP13			TET, NAL, SXT
**SP4			STR, TET

\*isolados de mulheres com ITU \*\*isolados de crianças saudáveis AMP, ampicilina; AMX, amoxicilina; KAN, canamicina; SMT, estreptomicina; TET, tetraciclina; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; SXT, sulfametoxazol/trimetoprim.

### 3.3 - Conclusões

Este estudo revelou que os isolados bacterianos de mulheres com ITU apresentaram uma maior frequência de genes *intI* e cassetes gênicos comparados aos isolados de crianças saudáveis. A maioria dos cassetes gênicos presentes nos isolados de *E. coli* determina resistência a aminoglicosídeos (*aadA5*, *aadA22* e *aadA1*) e, em menor frequência, resistência à trimetoprim (*dfrA1* e *dfrA17*). O grupo filogenético de *E. coli* mais representativo dentre os isolados de mulheres com ITU foi o grupo B2 e nos isolados de crianças saudáveis, o grupo A. Os isolados bacterianos recuperados de crianças saudáveis apresentaram uma menor frequência de resistência em relação aos isolados de mulheres com ITU, para todos os antimicrobianos testados, exceto para a tetraciclina. Além disso, todos os isolados de mulheres com ITU apresentaram perfil de

multirresistência, enquanto apenas 52,4% dos isolados de crianças saudáveis apresentou esse perfil, para os antimicrobianos testados. Os integrons podem contribuir com a multirresistência, porém, não são únicos responsáveis por esse fenótipo. Ficou evidente neste trabalho que os integrons são relativamente comuns em amostras clínicas e que a pressão seletiva devido à utilização constante e indiscriminada dos antimicrobianos, ao longo dos anos, têm resultado na resistência aos antimicrobianos. Além disso, os dados sugerem uma tendência na aquisição de integron nos isolados multirresistentes de origem clínica provavelmente devido ao aumento da pressão seletiva nas últimas três décadas nos isolados do trato urinário de mulheres infectadas.

**4 - Capítulo II: Pesquisa de integron cassette em  
sedimento do Córrego da Mina contaminado por  
arsênio**

## **4.1 Material e Métodos**

### **4.1.1 Amostragem**

Amostras de sedimento foram colhidas no Córrego da Mina (19°58'46.80"S e 43°49'17.07"W) localizado no Quadrilátero Ferrífero, Bacia do Rio das Velhas, Minas Gerais, Brasil, durante as estações chuvosa (Novembro de 2010) e seca (Junho de 2011). Temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram medidos *in situ*. Este córrego foi escolhido por estar localizado próximo a uma área impactada pela mineração. Os primeiros 5 cm de sedimento foram assepticamente coletados em duplicata e reunidos. As concentrações de metais e metaloide das amostras foram determinadas usando Espectrometria de Absorção Atômica (ICP-OES, Optima 7300 DV, PerkinElmer).

### **4.1.2 Extração do DNA total**

A extração de DNA total das duas amostras de sedimento (10g de peso úmido) foi realizada com o MoBio Power Max Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C.

### **4.1.3 Construção de bibliotecas de clones dos cassetes gênicos**

Os cassetes gênicos foram recuperados a partir do DNA ambiental das duas amostras de sedimento por meio de amplificação por PCR, utilizando os iniciadores GCP1 e GCP2 direcionados à região terminal conservada de *attC*, de acordo com

Elsaied *et al.* (2007) (Tabela 7). Os amplicons dos cassetes gênicos foram purificados por reação de precipitação com solução polietilenoglicol e NaCl 2,5 M e clonados no vetor pJET1.2/blunt Cloning Vector utilizando o CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Canadá), de acordo com as instruções do fabricante. A bactéria *E. coli* XL1 Blue eletrocompetente foi transformada e semeada em placas contendo meio LB e ampicilina (100 µg/ml), que foram incubadas à 37°C, por 18 horas. As colônias contendo os plasmídios com os insertos foram selecionadas através da resistência à ampicilina. Essas colônias foram transferidas, com palitos esterilizados, para microplacas com 96 poços contendo 300 µl de meio LB e ampicilina (100 µg /mL) e glicerol (25% v/v), incubadas a 37°C por 24 horas e estocadas a -80°C.

Tabela 7. Iniciadores e programa usados para amplificação dos cassetes gênicos das amostras de sedimento colhidas nas estações seca e chuvosa

<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Amplicon (pb)</b>
GCP1	GCSGCTKANCTCVRRCGTTRRRY	variável
GCP2	TCSGCTKGAAMTTGTTRRRY	
<b>Étapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>
1. Desnaturação inicial	94	3 min
2. Desnaturação	94	30 s
3. Anelamento	55	30 s
4. Extensão	72	2 min
5. Extensão final	72	5 min

#### 4.1.4 PCR de cassete gênicos das bibliotecas de clones e sequenciamento

Os cassette gênicos das bibliotecas de clones foram amplificados por PCR, usando iniciadores específicos do vetor pJET1.2 forward e pJET1.2 reverse, para a verificação do tamanho do fragmento contido no vetor. Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A reação de sequenciamento foi realizada em um termociclador

utilizando um programa com os seguintes passos: desnaturação a 95°C, por 15 minutos 35 ciclos de 95°C por 25 segundos, a 50°C por 15 segundos e 60°C por 3 minutos. Os produtos foram purificados por precipitação com EDTA/ acetato de sódio/etanol, e sequenciados no sequenciador automático ABI PRISM™ 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências parciais foram checadas para a qualidade, alinhadas e editadas para a produção de um consenso usando os programas Phred v.0.020425 (Erwing & Green, 1998), Phrap v.0.990319 (Green, 1994) e Consed 12.0 (Gordon *et al.*, 1998). A análise das sequências dos amplicons clonados foi realizada utilizando o ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>), seção 11 código bacteriano e BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) software para procurar supostos quadros de leitura aberta e proteínas correspondentes no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As OTUs (Unidade Taxonômica Operacional) foram definidas como cassetes gênicos que compartilham 95% de similaridade de sequência de ácidos nucleicos a partir do programa DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005). A cobertura das bibliotecas foi calculada usando-se a equação  $C = 1 - (n/N) \times 100$ , onde n significa o número de OTUs e N o número de sequências analisadas na biblioteca (Good, 1953). Para avaliar a diversidade das bibliotecas de clones, foi calculado o índice de Shannon que considera igual peso entre as espécies raras e abundantes. Este índice varia de 1 a 5 e quanto mais próximo de 5 maior a diversidade (Magurran, 1988).

Tabela 8. Iniciadores e programa usados para amplificação dos clones de cassetes gênicos das bibliotecas de sedimento colhidas nas estações seca e chuvosa

<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Amplicon (pb)</b>
pJET1.2 forward	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	variável
pJET1.2 reverse	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	
<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>
1. Desnaturação inicial	95	15 min
2. Desnaturação	94	30 s
3. Anelamento	60	30 s
4. Extensão	72	1 min
5. Extensão final	72	10 min

#### 4.1.5 PCR quantitativa em tempo real (q-PCR)

O gene *intI1* presente nas amostras de sedimento das estações chuvosa e seca foi quantificado através de qPCR. O procedimento foi realizado utilizando o ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). As amplificações foram realizadas com o SYBR green PCR Master Kit (Applied Biosystems). O conjunto de iniciadores utilizados para amplificar o gene *intI1* foram qINT-3 (5'TGCCGTGATCGAAATCCAGATCCT3') e qINT-4 (5'TTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTG3') (Rosewarne *et al.*, 2010). O programa utilizado foi: 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 59°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos, 59°C por 15 segundos e 95°C por 15 segundos. Todas as reações foram conduzidas em triplicata, incluindo o controle negativo. A curva padrão foi gerada a partir de sete diluições, em triplicata, através de amplicons do gene *intI1* de *E. coli* BH100. Para determinar o número de cópias do gene *intI1* e foi construída a curva padrão através da calculadora online: <http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html> (Staroscik , 2004).

## 4.2 Resultados e Discussão

### 4.2.1 Caracterização físico-química da amostra

As concentrações de metais e metaloide das amostras de sedimento do Córrego da Mina colhidas nas estações chuvosa (SMC) e seca (SMS) são apresentadas na Tabela 9. Temperatura, pH e oxigênio dissolvido são apresentados na Tabela 10. As amostras de água apresentaram valores de pH próximos da neutralidade. Os sedimentos das duas coletas apresentaram concentrações diferentes de metais e metaloide. Como esperado, a amostra SMS apresentou a maior concentração destes metais e metaloide, com exceção do Fe.

Tabela 9. Concentração de metais e metaloide ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) no sedimento do Córrego da Mina nas estações seca (SMS) e chuvosa (SMC).

Metais e metalóide	SMC	SMS
Ferro (Fe)	968,25	492,8
Níquel (Ni)	<0,05	9,0
Manganês (Mn)	300,25	1284,5
Cobre (Cu)	71,9	387,7
Chumbo (Pb)	3,7	8,7
Zinco (Zn)	68,6	180,9
Arsênio (As)	32,01	297,1
Cromo (Cr)	<0,01	17,3

Tabela 10. Características gerais da água do Córrego da Mina

Características	SMC	SMS
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	24	18
pH	6,9	6,2
Oxigênio dissolvido ( $\text{mg/L}$ )	6,78	9,1



#### 4.2.2 Características gerais das bibliotecas de cassetes gênicos

Um total de 158 clones (31 SMC e 127 SMS) foi escolhido aleatoriamente das bibliotecas de clones SMC e SMS. Os clones continham insertos de tamanhos que variaram de cerca de 300 a 1650 pb. A biblioteca SMC teve uma cobertura de 87%, com 31 clones seqüenciados, e a biblioteca SMS 96% de cobertura, com 127 clones seqüenciados. As OTUs foram definidas como cassetes gênicos que compartilhavam 95% de similaridade de seqüência de nucleotídeos.

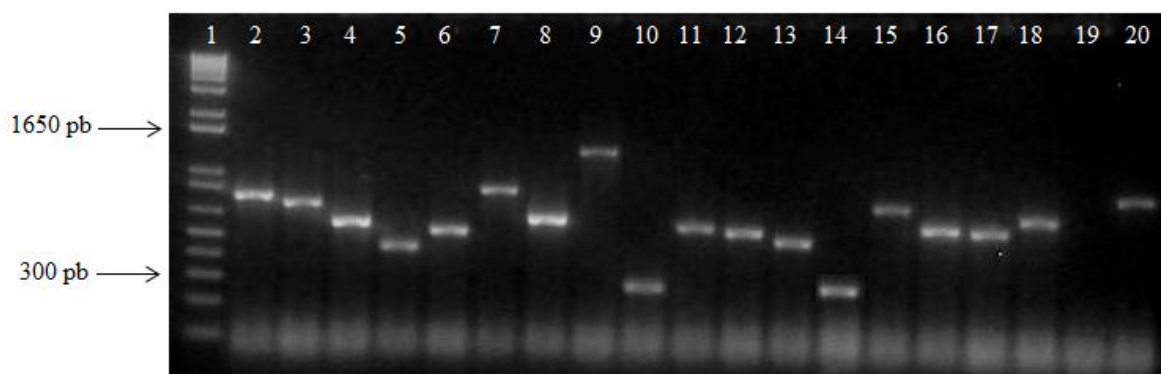


Figura 8. Gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação dos cassetes gênicos. 1. marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen, EUA); 2-6. Amplicons dos cassetes gênicos da biblioteca SMC; 7-18. Amplicons dos cassetes gênicos da biblioteca SMS; 19. Controle negativo; 20. Controle positivo - amplicon do cassete gênico de *E. coli* BH100.

Tabela 11. Distribuição geral dos clones e OTUs das bibliotecas

Parâmetros	SMC	SMS
Nº de clones	31	127
Nº de OTUS	15	47
Cobertura da biblioteca (%)	87	96
Índice de diversidade de Shannon	2,57	3,73

As curvas de rarefação das bibliotecas (Figura 9) obtidas, plotando o número de OTUs encontradas para cada biblioteca em relação ao número de clones sequenciados, demonstraram uma tendência à estabilidade do número de OTUs detectadas, indicando que a maioria dos cassetes gênicos presentes nestas amostras foi detectada, o que foi comprovado pelo cálculo de cobertura das bibliotecas (Tabela 11). O índice de diversidade de Shannon (Tabela 11) mostrou que a biblioteca SMS apresentou uma maior diversidade de cassetes gênicos (3,73), com 47 OTUs identificadas.

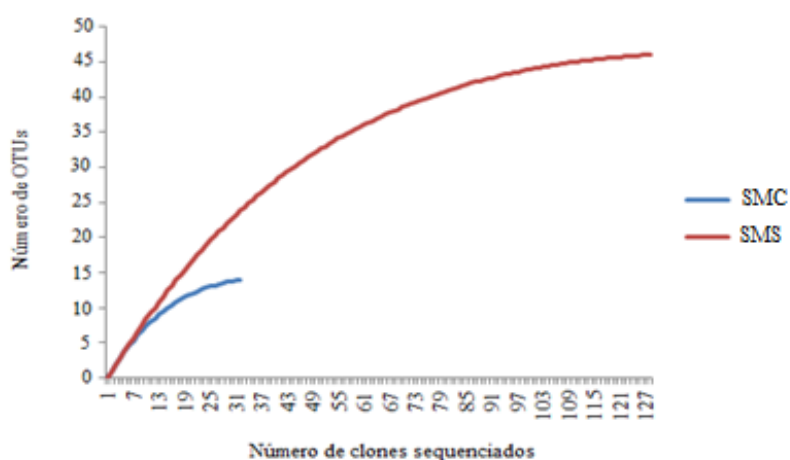


Figura 9. Curvas de rarefação representando a diversidade observada dos clones sequenciados dos cassetes gênicos das bibliotecas do sedimento do Córrego da Mina, das estações chuvosa (SMC) e de seca (SMS).

#### 4.2.3 Análise dos cassetes gênicos das bibliotecas de clones

As bactérias apresentam um grau elevado de diversidade funcional. A adaptação destes micro-organismos é amplamente facilitada pela transferência lateral de genes. Este fluxo da informação genética implica no surgimento de muitos novos fenótipos bacterianos, particularmente em resposta a fortes pressões seletivas (Ochman *et al.*, 2000; van Elsas & Bailey, 2002). Além disso, as altas densidades bacterianas promovem

a formação de biofilmes e a ocorrência de eventos de transferência horizontal de genes (Schluter *et al.*, 2007).

Alguns estudos têm demonstrado que ORFs associadas com cassetes gênicos apresentam uma grande diversidade de sequências e que as diferentes proteínas codificadas englobam uma vasta gama de características potencialmente vantajosas (Stokes *et al.*, 2001; Holmes *et al.*, 2003; Boucher *et al.*, 2007; Elsaied *et al.*, 2007; Koenig *et al.*, 2008; Rosewarne *et al.*, 2010).

Para investigar a diversidade de cassetes gênicos presentes nas amostras de DNA ambiental, recuperados do sedimento do Córrego da Mina, os insertos das bibliotecas de clones SMS e SMC foram sequenciados. A maioria dos insertos continha uma única ORF, sendo identificadas 15 ORFs na biblioteca SMC e 38 ORFs em SMS. A tradução das sequências de nucleotídeos das ORFs revelou que elas podem codificar várias proteínas putativas (Tabelas 12 e 13), embora 66% das sequências não apresentassem homologia identificada no GenBank. As sequências de proteínas deduzidas a partir das ORFs da biblioteca SMC variaram de cerca de 50 a 272 aminoácidos (aa), representando enzimas putativas envolvidas no transporte de aa, regulação de diversos processos celulares, oxidação, reparo e excisão de nucleotídeos, recombinação de plasmídeo, resposta ao stress e modificação pós-traducional (Tabela 12). As sequências de proteínas deduzidas a partir das ORFs da biblioteca SMS variaram de cerca de 35 a 277 aa, representando enzimas putativas envolvidas na resistência múltipla aos antimicrobianos, transporte de aa, modificação pós-traducional, transporte de íons inorgânicos, metabolismo e estrutura ribossômica (Tabela 13). Deve-se destacar que embora a maioria das ORFs detectadas nas bibliotecas fosse diferente, algumas ORFs foram comuns às duas bibliotecas (*dihydroorotate dehydrogenase 2*, *sodium:alanine symporter family protein*).

O pH do Córrego da Mina na estação chuvosa foi próximo da neutralidade enquanto o pH da estação seca foi ligeiramente ácido. Por outro lado, as concentrações de metais e metaloide foram maiores na amostra de sedimento coletada na estação seca (SMS). Além disso, a biblioteca SMS apresentou uma maior diversidade de cassetes gênicos em comparação com a biblioteca SMC. Esses dados sugerem que as comunidades bacterianas presentes no Córrego da Mina podem estar sujeitas a pressões seletivas, que variam ao longo das estações do ano, podendo essas variações influenciar a diversidade de genes relacionados à adaptação dos micro-organismos nesse ambiente.

Os resultados deste estudo não estão de acordo com os de Wright e colaboradores (2008) que não encontraram diferenças na diversidade de cassetes gênicos em comunidades bacterianas de ambientes aquáticos com diferentes graus de contaminação. No presente estudo, os resultados sugerem que o ambiente pode selecionar micro-organismos com fenótipo que favoreça a adaptação de acordo com as pressões exercidas. Nemergut e colaboradores (2004) também mostraram o papel dos cassetes gênicos como fonte de diversidade de proteínas, além do contexto de resistência antimicrobiana.

Além disso, na biblioteca SMS foram encontradas ORFs com sequências homólogas a proteínas putativas de integron e cassetes gênicos previamente relatadas em sedimentos marinhos contaminados e em efluentes urbano e de abatedouro (Koenig *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2010), sugerindo que estas sequências podem codificar proteínas que desempenham papel importante na adaptação bacteriana às pressões seletivas características destes ambientes. A maioria dos cassetes gênicos presentes nas bibliotecas não apresentou homologia com sequências do GenBank, demonstrando que as comunidades bacterianas de ambientes naturais apresentam uma gama de ORFs de cassetes gênicos ainda não caracterizados. Outros estudos nestes ambientes são

importantes para elucidar o papel destes cassetes gênicos desconhecidos e determinar se as condições ambientais específicas promovem a expressão do gene e / ou a disseminação dos integrons (Moura *et al.*, 2010).

Tabela 12. Produtos dos cassetes gênicos com correspondências em banco de dados a partir da biblioteca de clones SMC.

ORF	nº de aa	Correspondência máxima (e-value)	Organismo – Número de acesso
01	82	<i>sodium:alanine symporter family protein</i> (1e-31)	<i>Gillisia sp.</i> (ZP_11222501)
02	88	<i>hypothetical protein GTP1/OBG</i> (2e-20)	Crenarcheota marinha não cultivável (ABZ08675.1)
03	140	<i>hypothetical protein OB2597_02642</i> (6e-29)	<i>Oceanicola batsensis</i> (ZP_00999232)
06	137	<i>hypothetical protein OB2597_02642</i> (2e-29)	<i>Oceanicola batsensis</i> (ZP_00999232)
09	50	<i>Dihydroorotate dehydrogenase 2</i> (2e-04)	<i>Methylobacterium nodulans</i> (YP_002499706)
11	69	<i>Excinuclease ABC subunit A</i> (2e-16)	<i>Beggiatoa SP.</i> (ZP_01998146)
16	80	<i>hypothetical protein GTP1/OBG</i> (8e-18)	Crenarchaeota marinha não cultivável (ABZ08675)
17	159	<i>TonB-dependent receptor plug domain protein</i> (1e-50)	<i>Microscilla marina</i> (ZP_01694577)
19	76	<i>Mob_Pre</i> (4e-18)	<i>Oceanimonas sp.</i> (YP_005093727)
20	135	<i>hypothetical protein O71_07771</i> (1e-52)	<i>Pontibacter sp.</i> (ZP_10400519)
24	272	<i>GTPase ObgE</i> (0.0)	<i>Polynucleobacter necessarius</i> <i>subsp. necessarius</i> (YP_001797126)
25	229	<i>glucose/sorbosone dehydrogenase-like protein</i> (2e-58)	<i>Roseiflexus castenholzii</i> (YP_001430541)
29	64	<i>Endoribonuclease L-PSP</i> (2e-18)	<i>Fluviicola taffensis</i> (YP_004344062)
31	66	<i>FKBP-type peptidylprolyl isomerase</i> (9e-22)	<i>Psychrobacter sp.</i> (YP_001280981)

Tabela 13. Produtos dos cassetes gênicos com correspondências em banco de dados à partir da biblioteca de clones SMS.

ORF	n <sup>o</sup> de aa	Correspondência máxima (e-value)	Organismo – Número de acesso
01	101	<i>fructosamine/Ketosamine-3-kinase</i> (2e-16)	<i>Rhodothermus marinus</i> (YP_004825172)
02	201	<i>hypothetical protein PMI38_02963</i> (5e-49)	<i>Pseudomonas sp.</i> (ZP_10603583)
06	82	<i>sodium:alanine symporter family protein</i> (1e-31)	<i>Gillisia SP.</i> (ZP_11222501)
09	78	<i>hypothetical protein NIDE2427</i> (0.45)	<i>Candidatus nitrospira defluvii</i> (YP_003798062)
10	277	<i>Sulphatase-modifying factor protein</i> (1e-51)	<i>Oscillatoria 61igro-viridis</i> (YP_007116394)
13	114	<i>Orf108</i> (1e-70)	Bactéria não cultivável (ACS73633)
17	204	<i>Zn-finger domain-containing protein (topoisomerase type I-like)</i> (5e-70)	<i>Thiocystis violascens</i> (YP_006412367)
24	66	<i>hypothetical protein SpyoM01001385</i> (0.26)	<i>Streptococcus pyogenes</i> (ZP_00365391)
27	165	<i>outer membrane protein/peptidoglycan-associated lipoprotein</i> (0.026)	<i>Pantoea sp.</i> (ZP_10554743)
33	132	<i>hypothetical protein Varpa_4445</i> (4e-54)	<i>Variovorax paradoxus</i> (YP_004156724)
35	75	<i>LuxR family transcriptional regulator</i> (0.19)	<i>Conexibacter woesei</i> (YP_003395618)
41	208	<i>hypothetical protein mll3391</i> (3e-05)	<i>Mesorhizobium loti</i> (NP_104507)
44	145	<i>hypothetical protein ESRG_00655</i> (7e-47)	<i>Escherichia coli</i> (ZP_16974021)
56	117	<i>XisI protein</i> (4e-26)	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i> (YP_004448723)
57	50	<i>dihydroorotate dehydrogenase 2</i> (2e-04)	<i>Methylobacterium nodulans</i> (YP_002499706)
58	137	<i>Metallophosphoesterase</i> (7e-62)	<i>Pontibacter sp.</i> (ZP_10400399)
62	93	<i>hypothetical protein</i> (6e-24)	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i> (YP_004449529)
64	136	<i>NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 2</i> (4e-62)	<i>Nitrosomonas sp.</i> (YP_004696070)
65	74	<i>Arylsulfatase</i> (1e-10)	<i>Pseudomonas putida</i> (NP_943152)

Tabela 13. Continuação

ORF	n <sup>o</sup> de aa	Correspondência máxima (e-value)	Organismo – Número de acesso
67	155	<i>GCN5-like N-acetyltransferase</i> (1e-58)	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> (YP_004782765)
70	107	<i>multiple antibiotic resistance (MarC)-like protein</i> (7e-42)	<i>Chitinophaga pinensis</i> (YP_003120818)
71	136	<i>anti-sigma H sporulation factor, LonB</i> (1e-78)	<i>Emticicia oligotrophica</i> (YP_006872732)
72	97	<i>Beta-lactamase</i> (1e-36)	<i>Runella slithyformis</i> (YP_004654509)
74	132	<i>hypothetical protein Varpa_4445</i> (6e-57)	<i>Variovorax paradoxus</i> (YP_004156724)
80	132	<i>hypothetical protein Varpa_4445</i> (1e-58)	<i>Variovorax paradoxus</i> (YP_004156724)
81	99	<i>histidine kinase A domain-containing protein</i> (4e-36)	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i> (YP_004449410)
86	169	<i>hypothetical protein PE36_08006</i> (8e-13)	<i>Moritella sp.</i> (ZP_01899591)
90	136	<i>ribosomal protein S4E</i> (1e-16)	<i>Solitalea canadensis</i> (YP_006255047)
91	238	<i>von Willebrand factor type A</i> (1e-32)	<i>Rhodothermus marinus</i> (YP_004826341)
93	97	<i>ATPase AAA</i> (2e-34)	<i>Chitinophaga pinensis</i> (YP_003120992)
94	35	<i>putative integron gene cassette protein</i> (1.6)	Bactéria não cultivável (CAS02911)
99	65	<i>ribosomal protein S4E</i> (1e-17)	<i>Solitalea canadensis</i> (YP_006255047)
109	64	<i>hypothetical protein BMB171_C3892</i> (3e-11)	<i>Bacillus thuringiensis</i> (YP_003666421)
111	107	<i>hypothetical protein XGA_3787</i> (1e-18)	<i>Xanthomonas gardneri</i> (ZP_08184755)
116	224	<i>glycosyl hydrolase</i> (1e-59)	<i>Algoriphagus sp.</i> (ZP_07720449)
117	76	<i>Aldo/keto reductase</i> (1e-19)	Bactéria não cultivável (EKD65600)

#### 4.2.4 Quantificação dos genes de rRNA 16S e *intI 1* nas amostras de sedimento

A qPCR foi realizada para determinar a abundância do gene *intI1* no sedimento do Córrego da Mina nas duas diferentes coletas. O número de cópias dos genes *intI1* foi calculado de acordo com a respectiva curva padrão. A quantificação através de qPCR do gene rRNA 16S da amostra de sedimento coletada na estação chuvosa realizada por Reis e colaboradores (2013) e da amostra coletada na estação seca por Costa e colaboradores (dados não publicados), foram utilizadas para estimar a proporção de células bacterianas que abrigavam um integron de classe neste ambiente. O valor da quantificação do gene *intI 1* foi dividido pelo valor da quantificação do gene de rRNA 16s a fim de normalizar quaisquer diferenças nas concentrações iniciais de DNA entre as amostras. A proporção de células que abrigavam o gene *intI 1* em cada amostra, foi calculada multiplicando a abundância *intI1* normalizada por quatro, porque a célula bacteriana contém em média quatro cópias do gene de rRNA 16S (Hardwick *et al.*, 2008). A quantificação do gene *intI 1* das amostras de sedimento SMC e SMS geraram *slope* de -3,53 e o valor de R<sup>2</sup> de 0,99 (Figura 10C).



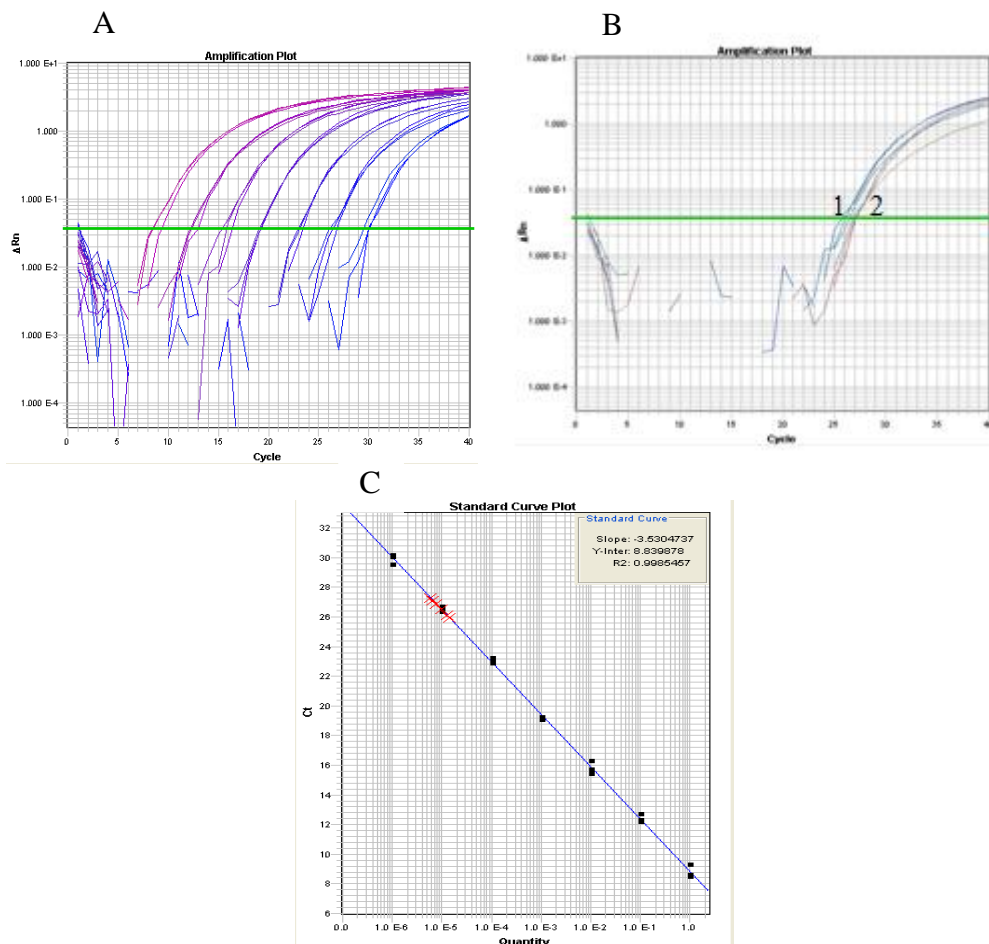


Figura 10. (A) Curva de diluição; (B) valor de  $C^t$  da amplificação do gene *intI1*, 1-SMS, 2 – SMC; (C) Curva padrão

A análise da qPCR revelou que nas amostras de sedimento SMC e SMS 8,5 % e 41,6 % das células bacterianas, respectivamente, apresentaram o gene *intI1*. Estes resultados sugerem que a abundância de integrons classe 1 encontrada neste estudo pode estar correlacionada ao grau de estresse ambiental, que parece variar durante as estações do ano nesse ambiente. Este resultado condiz com o de Wright e colaboradores (2008), que reportaram maior abundância de genes *intI1* em comunidades bacterianas sujeitas a um maior nível de contaminação industrial do que aquelas expostas a um menor nível de contaminação.

Pouco se sabe sobre a distribuição ou abundância de integrons classe 1 fora do ambiente clínico, embora vários grupos tenham relatado a sua presença em ecossistemas

distintos, incluindo ambientes sujeitos a pressões seletivas extremas (Rosser & Young, 1999; Barlow *et al.*, 2004; Nandi *et al.*, 2004; Nemergut *et al.*, 2004; Gaze *et al.*, 2005; Hardwick *et al.*, 2008; Wright *et al.*, 2008). No estudo realizado por Rosser e Young (1999), a incidência de integrons classe 1 em bactérias ambientais isoladas do estuário Tay, foi de 3,6%. Hardwick e colaboradores (2008) encontraram uma proporção média de 2,65% de células abrigando um integron classe 1 em amostras ambientais da Austrália. Estudos baseados em métodos dependentes de cultivo em bactérias de origem ambiental indicam que entre 1 % e 10 % das bactérias possuem o gene *intI1* (Nemergut *et al.*, 2004; Nandi *et al.*, 2004; Boucher *et al.*, 2007). No entanto, Biyela e colaboradores encontraram integrons de classe 1 em mais de 50 % dos isolados multirresistentes de um rio urbano Sul-Africano. Nestes estudos, a prevalência de integrons classe 1 em bactérias de ambientes naturais foi menor que o encontrado em isolados clínicos, no entanto é provável que a proporção de bactérias que abrigam integrons pode ser muito maior, uma vez que <1% das bactérias em amostras ambientais são cultiváveis (Xu *et al.*, 1982).

A abundância de integrons em amostras ambientais por meio de métodos independente de cultivo tem sido pouco explorada, portanto, não é possível determinar se a frequência de integrons classe 1 detectada em nosso estudo reflete a abundância geral de integrons em ambientes naturais. Os fatores que influenciam a abundância e distribuição de integrons classe 1 dentro de comunidades bacterianas naturais permanecem desconhecidos. Com base em estudos anteriores, no entanto, é possível afirmar que os integrons estão dispersos fora do contexto clínico em uma ampla gama de organismos hospedeiros, incluindo muitas espécies bacterianas não cultiváveis. Além disso, estes elementos apresentam um papel importante na adaptação bacteriana, uma vez que eles são capazes de abrigar e expressar uma variedade de cassetes gênicos que

codificam proteínas envolvidas em funções adaptativas diversas, proporcionando vantagens seletivas relevantes frente a diversas pressões ambientais, além de conferir fenótipo de resistência a antimicrobianos (Stokes *et al.*, 2001; Holmes *et al.*, 2003; Michael *et al.*, 2004; Nemergut *et al.*, 2004; Stokes *et al.*, 2006; Koenig *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2010; Rosewarne *et al.*, 2010).

#### **4.2.5 Conclusões**

Observou-se diferença na diversidade de cassetes gênicos e na abundância do gene *intI 1* entre as amostras de sedimento. A amostra SMS, coletada na estação seca, apresentou maiores concentrações da maioria de metais e de arsênio em relação à amostra SMC, coletada na estação chuvosa. A biblioteca de clones SMS apresentou um maior índice de diversidade de cassetes gênicos, sendo detectados cassetes gênicos que contêm ORFs previamente relatadas em estudos com bactérias de ambientes naturais. No entanto, a maioria dos cassetes gênicos presentes nas duas bibliotecas não apresentou homologia com sequências do GenBank. Portanto, as comunidades bacterianas de ambientes naturais apresentam uma variedade de ORFs contidas nos cassetes gênicos, ainda não caracterizadas. Portanto, o sedimento pode ser um importante reservatório de cassetes gênicos codificadores de proteínas de diversas funções. Os resultados obtidos pela técnica de qPCR demonstraram uma abundância cinco vezes maior de células bacterianas presentes na amostra de DNA total de SMS e que abrigavam o gene *intI1* do que a amostra SMC. Estes resultados sugerem que os integrons classe 1 podem proporcionar vantagens seletivas relevantes frente a uma variedade de pressões ambientais, dependendo do tipo de pressão seletiva à qual as bactérias são submetidas.

# **5 - Conclusão Geral**

Por meio deste estudo foi possível concluir que os integrons favorecem a adaptação e sobrevivência das bactérias tanto em ambientes clínicos como no ambiente natural. Os cassetes gênicos associados ao integron, apresentam funções diversas. Nos isolados de *E. coli*, recuperados de fezes de crianças saudáveis e da urina de mulheres com ITU foram encontrados cassetes relacionados a resistência bacteriana a antimicrobianos e na amostra de sedimento, a comunidade bacteriana abriga cassetes gênicos que favorecem a adaptação destes micro-organismos às pressões do ambiente. Esses achados refletem a disseminação dos integrons entre bactérias de diferentes habitats e sua importância na adaptação das bactérias a diferentes pressões ao longo do tempo.

## **6 - Referências**

- Alliance for the Prudent Use of Antibiotics (APUA).** Reservoirs of Antibiotic Resistance (ROAR). Commensal bacteria are reservoirs of resistance. Available at: [http://www.tufts.edu/med/apua/ROAR/project .htm](http://www.tufts.edu/med/apua/ROAR/project.htm). Acessado em 07 de janeiro de 2012.
- Alonso A., Sanchez P., Martinez J. L.** (2001) Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 3, 1-9.
- Andremont, A.** (2003) Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance. *ASM News* 63, 601–607.
- Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, et al.** (2010) Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. *J Med Microbiol.*;59:1331-9.
- Baquero, F., J. L. Martinez, R. Canton** (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19:260–265.
- Barlow, R. S., Pemberton, J. M., Desmarchelier, P. M. & Gobius, K. S.** (2004) Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 838–842.
- Barraud O., Badell E., Denis F., Guiso N., Ploy M.C.** (2011) Antimicrobial drug resistance in *Corynebacterium diphtheriae mitis*. *Emerg Infect Dis* 17: 2078–2080.
- Bartoloni, A., Pallecchi, L., Rodri´guez, H., Fernandez, C., Mantella, A., Bartalesi, F., Strohmeyer, M., Kristiansson, C., Gotuzzo, E. & other authors** (2009). Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. *Int J Antimicrob Agents* 33, 125–129.
- Bass, L., Liebert, C.A., Lee, M.D., Summers, A.O., White,D.G., Thayer, S.G., Maurer, J.J.** (1999). Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 43, 2925–2929.
- Bergthorsson, U.; Ochman, H.** (1998) Distribution of Chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, Il., v. 15, n.1, p. 6–16.
- Bingen, E., B. Picard, N. Brahimi, S. Mathy, P. Desjardins, J. Elion, and E. Denamur.** (1998). Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J. Infect. Dis.* 177:642–650.

- Binh C.T., Heuer H., Kaupenjohann M., Smalla K.** (2009) Diverse *aadA* gene cassettes on class 1 integrons introduced into soil via spread manure Res. Microbiol., 160 , pp. 427–433.
- Biyela P.T., Lin J., Bezuidenhout C.C.** (2004) The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. Water Sci Technol 50: 45–50.
- Blattner F.R., Plunkett G.I., Bloch C.A.** (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science 277:1453–1461.
- Bolon, M.K., S.B. Wright, H.S.Gold and Y. Carmeli.** (2004) The magnitude of the association between fluoroquinolone use and quinolone-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* may be lower than previously reported. Antimicrob. Agents. Chemother. 48:1934–1940.
- Borba, A., R.P., Figueiredo, B.R., Rawllins, B.G., Matschullat, J.** (2000) Arsenic in water and sediment in the Iron Quadrangle, Minas Gerais state, Brasil. Revista Brasileira de Geociências, v.30, n.3, p.554-557.
- Borba, A, R.P., Figueiredo, B.R., Rawllins, B.G., Matschullat, J.** (2003) Geochemical distribution of arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from Iron Quadrangle, Brazil. Environmental Geology, v.4, p.39-52.
- Borba, R.P.; Figueiredo, B.R.; Cavalcanti, J.A.** (2004) Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). Revista Esc. Minas, v. 57, p. 45-51.
- Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J.E., Stoke, H.W.** (2007) Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. Trends Microbiol. 15, 301–309.
- Bruins M. R., Kapil, S. e Oehme, F. W.** (2000) Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicol Environ Saf 45, 198-207.
- Bryson, V. & Szybalski, W.** (1952). Microbial selection. Science 115, 45-51.
- Camargo C.B., Pedro, C.C., Lourenço D.S., Giorini R.H.A., Martinez R.** (2002) Infecções de vias urinárias na comunidade de Ribeirão Preto – SP: etiologia, sensibilidade bacteriana a antimicrobianos e implicações terapêuticas. Medicina, Ribeirão Preto, v.35, p.173-178.
- Cambray G., Guérout A.M. & Mazel D.** (2010) Integrons. Annual Review of Genetics 44:141-66.



- Car J.** (2006) Urinary tract infections in women: diagnosis and management in primary care. *BMJ*; 332: 94–7.
- Carattoli, A.** (2001) Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, v. 32, p. 243-259.
- Chopra I. & Roberts M.** (2001) Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, **molecular** biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 232–260.
- Chiew Y.F., Yeo S.F., Hall R.M., Livermore D.M.** (1998) Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting use? The case of streptomycin versus *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41: 247–251.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E.** (2000) Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, USA, v. 66, n. 10, p. 4555- 4558.
- Clímaco E. C.** (2011) Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* ssp. Ribeirão Preto: Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. Universidade de São Paulo, 76p. (Tese de Doutorado)
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute.** (2012) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement, M100-S22, v. 32, n. 03.
- Conly J.** (2002) Antimicrobial resistance in Canada. *CMAJ* 167:885-91.
- Costa A. T., Nalini Jr. H. N., Castro P. T. A., Lena J. C., Morgenstern P., Friese K.** (2006) Sediment contamination in floodplains and alluvial terraces as a historical record of gold exploitation in the Carmo river basin, Southeast Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. *Acta hydrochim. Hydrobiol.*, 34, p. 245-256.
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.** (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections *Science*, 284 pp. 1318–1322.
- Díaz-Cruz, M. S., Alda, M. J. L. d. and Barceló, D.** (2003) Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends Anal Chem* 22, 340-351.
- Drasar, B. S. & Hill, M. J.** (1974) *Human Intestinal Flora*. Academic Press, London, U.K.

- Eleutério L.** (1997) Diagnóstico da situação ambiental da cabeceira da bacia do Rio Doce, MG, no âmbito das contaminações por metais pesados, em sedimentos de fundo. Ouro Preto: Departamento de Geologia, Universidade Federal de Ouro Preto, 154 p. (Dissertação de Mestrado).
- Elsaied H., Stokes H.W., Nakamura T., Kitamura K., Fuse H. & Maruyama A.** (2007) Novel and diverse integron integrase genes and integron-like gene cassettes are prevalent in deep-sea hydrothermal vents. *Environ Microbiol* 9: 2298–2312.
- Elsaied H., Stokes H. W., Kitamura K., Kurusu Y., Kamagata Y., Maruyama A.** (2011) Marine integrons containing novel integrase genes, attachment sites, attI, and associated gene cassettes in polluted sediments from Suez and Tokyo Bays. *ISME J.* 5, 1162–1177. doi: 10.1038/ismej.2010.208.
- Ewing B., Green P.** (1998) Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II, Error probabilities. *Genome Research*, Woodbury, v, 8, p. 186 -194.
- Fajardo A., Linares J.F. & Martinez J.L.** (2009) Towards an ecological approach to antibiotics and antibiotic resistance genes. *Clin Microbiol Infec* 15: 14–16.
- Fallah F., Karimi A., Goudarzi M., Shiva F.** (2012) Determination of Integron Frequency by a Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Method in Multidrug-Resistant *Escherichia coli*, Which Causes Urinary Tract Infections. *Microbial Drug Resistance* 18(6): 546-549
- Farmer III J. J., Boatwright K.D, Janda M.** (2007) *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. In: Murray,P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Landry, M.L.; Pfaller, M.A. Manual of clinical microbiology, 9<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, v.1, cap 42, p. 649-699.
- Fedler KA, Biedenbach DJ, Jones RN.** (2006) Assessment of pathogen frequency and resistance patterns among pediatric patient isolates: report from the 2004 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program on 3 continents. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Dec; 56(4):427-36.
- Fluitz A.C., Schmitz F.J.** (2004) Resistance integrons and super-integrons. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol.10, p.272-288.
- Fry, J.** (2000). Bacterial diversity and 'unculturables'. *Microbiol Today* 27, 186-188.
- Furuya, E.Y., Lowy, F. D.** (2006) Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature*, v. 4.

- Garau, J., Xercavins, M., Rodriguez-Carballeira, M., Gomez- Vera, J.R., Coll, I., Vidal, D., Llovet, T., Ruiz-Bremon, A.** (1999) Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2736–2741.
- Gaze W.H., Abdousslam N., Hawkey P.M. & Wellington E.M.H.** (2005) Incidence of Class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1802–1807.
- GenBank** (2012) NCBI. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
- Goldstein C., Lee M.D., Sanchez S. et al.** (2001) Incidence of Class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 723–726.
- Good IJ** (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40:237–262
- Gordon D., Abajian C., Green P.** (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* 8:195-202
- Gordon, D. M.** (2004) The influence of ecological factors on the distribution and **genetic** structure of *Escherichia coli*. In *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*.
- Grape M, Farra A, Kronvall G & Sundström L.** (2005) Integrons and gene cassettes in clinical isolates of co-trimoxazoleresistant Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 11:185–192.
- Green P.** (1994) PHRAP documentation. <http://www.phrap.org>. Acessado em 30 de março de 2011.
- Guerin E., Cambray G., Sanchez-Alberola N., Campoy S., Erill I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbe, J., Ploy, M.C., Mazel, D.** (2009) The SOS response controls integron recombination. *Science* 324, 1034.
- Hall, R. M. & Stokes, H. W.** (1993). Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica* 90, 115–132.
- Hall R.M., Collis C.M.** (1995) Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination, *Mol. Microbiol.* 15, 593-600.
- Hall, R.M. and C.M. Collis** (1998) Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist. Updates* 1:109-119.

- Hall, R.M., Collis, C.M., Kim, M.J., Partridge, S.R., Recchia, G.D., Stokes, H.W.** (1999) Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 870, 68e80.
- Hall-Stoodley L, Stoodley P.** (2005) Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol*;13:7e10.
- Hanau-Berçot, B., Podglajen, I., Casin, I., Collatz, E.** (2002) An intrinsic control element for translational initiation in class 1 integrons. *Molecular Microbiology*, v. 44, p. 119–130.
- Hancock REW** (2007) The end of an era? *Nat Rev Drug Discovery* 6: 28.
- Hardwick S.A., Stokes H.W., Findlay S., Taylor M. & Gillings M.R** (2008) Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Lett* 278: 207–212.
- Hillier S, Bell J, Heginbothom M et al** (2006) When do general practitioners request urine specimens for microbiology analysis? The applicability of antibiotic resistance surveillance based on routinely collected data. *J Antimicrob Chemother*; 58: 1303–6.
- Hillier S, Roberts Z, Dunstan F et al.** (2007) Prior antibiotics and risk of antibiotic-resistant community-acquired urinary tract infection: a case-control study. *J Antimicrob Chemother*; 60: 92–9.
- Ho P.L., Wong R.C., Chow K.H., Que T.L.** (2009) Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. *Lett Appl Microbiol*, 49:627-34.
- Holmes A.J., Gillings M.R., Nield B.S., Mabbutt B.C., Nevalainen K.M.H. & Stokes H.W.** (2003) The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution. *Environ Microbiol* 5: 383–394.
- Holmes AJ, Gillings MR, Nield BS, Mabbutt BC, Nevalainen KM, Stokes HW.** (2003) The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution. *Environ Microbiol* 5: 383–394.
- Hussain A., Ewers, C., Nandanwar, N., Guenther, S., Jadhav, S., Wieler L. H. e Ahmed N.** (2012) Multiresistant Uropathogenic *Escherichia coli* from a Region in India Where Urinary Tract Infections Are Endemic: Genotypic and Phenotypic Characteristics of Sequence Type 131 Isolates of the CTX-M-15 Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Lineage. *Antimicrob. Agents Chemother.* vol. 56 no. 126358-6365

- Japoni, A., M. Gudarzi, S.H. Farshad, E. Basiri, M. Ziyaeyan, A. Alborzi, N. Rafaatpour.** (2008) Assay for integrons and pattern of antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* strains by PCR-RFLP in southern Iran. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61:85–88.
- Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK.** (2010) Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology.* 156, 3216–3223.
- Johnson, J. R., & A. L. Stell.** (2000) Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.* 181:261–272.
- Jones, RN.** (2003) Global epidemiology of antimicrobial resistance among community-acquired and nosocomial pathogens: a five-year summary from the SENTRY. Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Semin Respir Crit Care Med.* Feb; 24(1): 121-34.
- Kang, H.Y., Jeong, Y.S., Oh, J.Y., Tae, S.H., Choi, C.H., Moon, D.C., Lee, W.K., Lee, Y.C. et al.** (2005) Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *J Antimicrob Chemother* 55, 639–644.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L.** (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123–140.
- Kieleczawa J.** (2006) Fundamentals of sequencing of difficult templates—An overview. *J Biomol Tech.*;17:207–217.
- Koczura, R.; Mockracka, J.; Jablonska, L.; Gozdecka, E.; Kubek, M.; Kaznowski, A.** (2011) Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. *Sci. Total Environ.* ,10.1016/j.scitotenv.2011.10.036
- Koenig JE, Boucher Y, Charlebois RL, Nesbo C, Zhaxybayeva O, Bapteste E, Spencer M, Joss MJ, Stokes HW & Doolittle WF** (2008) Integron-associated gene cassettes in Halifax Harbour: assessment of a mobile gene pool in marine sediments. *Environ Microbiol* 10: 1024–1038.
- Koenig J.E., Sharp C., Dlutek M., Curtis B., Joss M., Boucher Y., Doolittle W.F.** (2009) Integron gene cassettes and degradation of compounds associated with industrial waste: the case of the Sydney tar ponds *PLoS ONE*, 4, p. e5276

- Kolár, M., Urbánek, K. and Tomás, L.** (2001) Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *Int J Antimicrob Agents* 17, 357-363.
- Koneman E. W., William, M.J. , Schreckenberger, P.C. , Winn, W.C. , Allen, S.D., Woods, G.L.** (2008) *Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 1565p.
- Kopezinski I.** (2000) *Mineração X meio ambiente: considerações legais, principais impactos ambientais e seus processos modificadores*. Editora da Universidade.
- Kosek, M., Bern, C. & Guerrant, R. L.** (2003) The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull. World Health Organ.* 81, 197–204.
- Lawrence, J. G.** (1999) Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Curr Opin Microbiol* 2, 519-23.
- Lester, S. C., del Pilar Pla, M., Wang, F., Perez Schael, I., Jiang, H. & O'Brien, T. F.** (1990) The carriage of *Escherichia coli* resistant to antimicrobial agents by healthy children in Boston, in Caracas, Venezuela, and in Qin Pu, China. *N Engl J Med* 323, 285–289.
- Leverstein-van Hall, M.A., Box, A.T., Blok, H.E., Paauw, A., Fluit, A.C., Verhoef, J.** (2002) Evidence of extensive interspecies transfer of integron-mediated antimicrobial resistance genes among multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in a clinical setting. *J. Infect. Dis.* 186, 49e56.
- Lévesque, C., Piche, L., Larose C. Roy, P. H.** (1995) PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 39, p. 185-191.
- Lévesque C, Roy P H.** (1993) PCR analysis of integrons. In: Persing D H, Smith T F, Tenover F C, White T J, editors. *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; pp. 590–594.
- Levy, S. B., Marshall, B., Schluederberg, S., Rowse, D. & Davis, J.** (1988) High frequency of antimicrobial resistance in human fecal flora. *Antimicrob Agents Chemother* 32, 1801–1806.
- Levy, S. B.** (2002) The 2000 Garrod lecture. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 49, 25-30.
- Lima-Bittencourt CI, Cursino L, Gonçalves-Dornelas H, Pontes DS, Nardi RMD,**

- Callisto M, Chartone-Souza E & Nascimento AMA** (2007) Multiple antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* isolates from pristine freshwater. *Genet Mol Res* 6:510-521.
- Lina, T.T., Rahman, S.R. and Gomes, D.J.** (2007) Multiple antibiotic-resistance mediated plasmids and integrons in uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Microbiol* 24, 19–23.
- Livermore, D.M.; Woodford, N.** (2006) The  $\beta$ -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*, v. 14, n. 9, 413-420.
- Lopes HV, Tavares W.** (2005) Diagnóstico das infecções do trato urinário. *Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo*, 51(6).
- Lorian, V.** (2005) *Antibiotics in Laboratory Medicine*, fifth ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Hong Kong, London, Munich.
- Luck, S. N.; Bennett-Wood, V.; Poon, R.; Robinsbrowne, R. M.; Hartland, E. L.** (2005) Invasion of Epithelial Cells by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 73, n. 5, p. 3063–3071.
- Lukkana M, Wongtavatchai J, Chuanchuen R.** (2012) Class 1 integrons in *Aeromonas hydrophila* isolates from farmed Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*). *J Vet Med Sci.* Apr;74(4):435-40.
- Ma L., Zhang X.-X., Cheng S., Zhang Z., Shi P., Liu B., Wu B., Zhang Y.** (2011). Occurrence, abundance and elimination of class 1 integrons in one municipal sewage treatment plant. *Ecotoxicology* 20, 968–973.
- Magurran, A.E.** Ecological diversity and its measurement. Magurran, A.E., eds. 1988, 177 p.
- Marrs, C. F.; Zhang, L.; Foxman, B.** (2005) *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E.coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiology letters*, 252, p. 183-190.
- Martínez-Freijo, P., A. C. Fluit, F. J. Schmitz, J. Verhoef, and M. E. Jones** (1999) Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:686-689.
- Mazel, D.** (2006) Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Ver Microbiol* 4: 608–620.

- Maynard C, Fairbrother JM, Bekal S et al.** (2003) Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother*; 47: 3214–21.
- McArthur, J. V. e Tuckfield, R.** (2000) Spatial patterns in antibiotic resistance among Stream bacteria: effects of industrial pollution. *Appl Environ Microbiol* 66, 3722-3726.
- McManus MC.** (1997) Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 54, 1420–1433.
- Michael, C. A., Gillings, M. R., Holmes, A. J., Hughes, L., Andrew, N. R., Holley, M. P. & Stokes, H. W. (2004).** Mobile gene cassettes: a fundamental resource for bacterial evolution. *Am Nat* 164, 1–12.
- Moura A, Henriques I, Smalla K, Correia A** (2010) Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res. Microbiol.* 161: 58-66
- Muyzer G, De Waal E.C, Uitterlinden, AG** (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol* 59:695-700
- Nandi S, Maurer JJ, Hofacre C, Summers AO** (2004) Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7118–7122.
- Nascimento A. M. A., Campos, C.E.P, Campos, E.P, Azevedo, J.L ; Chartone-Souza, E.** (1999) Re-evaluation of antibiotic and mercury resistance in *Escherichia coli* populations isolated in 1978 from Amazonian rubber tree tappers and Indians. *Research in Microbiology (Paris)*, Paris, v. 150, p. 407-411.
- Nemergut, D.R., Martin, A.P., Schmidt, S.K.** (2004) Integron diversity in heavy-metal-contaminated mine tailings and inferences about integron evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1160-1168.
- Neu HC.** The crisis in antibiotic resistance. *Science* 1992;257:1064-73.
- Nwosu, V. C.** (2001) Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Res Microbiol* 152, 421-430.
- O'Brien, T. F.** (2002) Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin Infect Diseases* 34, 78-84.



- Ochman, H., Lawrence, J.G., Groisman, E.A.** (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299–304.
- Okeke, I. N. & Edelman, R.** (2001) Dissemination of antibiotic-resistant bacteria across geographic borders. *Clin Infect Dis* 33, 364-9.
- Organização Mundial de Saúde.** Vencendo a resistência microbiana [texto na Internet]. OMS; 2000 [World Health Report on Infections Diseases 2000]. Disponível em: <http://www.ccih.med.br/vencendoresistencia.html>. Acessado em 07 de janeiro de 2013.
- Osterblad, M., Hakanen, A., Manninen, R., Leistevuo, T., Peltonen, R., Meurman, O., Huovinen, P. & Kotilainen, P.** (2000) A between species comparison of antimicrobial resistance in enterobacteria in fecal flora. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1479–1484.
- Paauw, A., A.C. Fluit, J.Verhoef, A. Maurine, and M.A. Leverstein-van Hall.** (2006) Enterobacter cloacae outbreak and emergence of quinolone resistance Gene in dutch hospital. *Emerg. Infect. Dis.* 12:807–812.
- Paiva, M. C.** (2011) Estudo Molecular do mecanismo de resistência a quinolonas de amostras uropatogênicas de *Escherichia coli*. Belo Horizonte: Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 78 p. (Dissertação de Mestrado).
- Pallecchi, L., Lucchetti, C., Bartoloni, A., Bartalesi, F., Mantella, A., Gamboa, H., Carattoli, A., Paradisi, F. & Rossolini, G. M.** (2007) Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 1179–1184.
- Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR** (2009) Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 33: 757–784.
- Pinilla G, Muñoz L, Ruiz AI, Chavarro B, Cifuentes Y.** (2009) Isolation of *Staphylococcus epidermidis* strain carrier of the class one integron in a septic neonatal patient. *Infectio* 13: 196–202.
- Pontes DS, Pinheiro FA, Lima-Bittencourt CI, Guedes RLM, Cursino L, BarbosaF, Santos FR, Chartone-Souza E, Nascimento AMA.** (2009) Multiple Antimicrobial Resistance of Gram-Negative Bacteria from Natural Oligotrophic Lakes Under Distinct Anthropogenic Influence in a Tropical Region. *Microb Ecol*, 58:762–772.

- Putman, M., H.W. van Veen, and W.N. Konings.** (2000) Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (4), 672-693.
- Raskin L, Stromley JM, Rittmann BE, Stahl DA** (1994) Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl Environ Microbiol* 60:1232-1240
- Reis M. P., Barbosa, F. A. R., Chartone-Souza, E., Nascimento A. M. A.** (2013) The prokaryotic community of a historically mining-impacted tropical stream sediment is as diverse as that from a pristine stream sediment. *Extremophiles* DOI 10.1007/s00792-013-0517-9
- Rice LB** (2006). Antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. *Am J Infect Control* 34: S11-19.
- Robinson A, Guilfoyle A, Harrop S, Boucher Y, Stokes HW, Curmi P *et al.*** (2007) A putative house-cleaning enzyme encoded within an integron array: 1.8Å crystal structure defines a new MazG subtype. *Mol Microbiol* 66: 610–621.
- Roe, M.T., A. Byrd, P. Smith, and S.D. Pillai.** (2003) Class 1 and Class 2 integrons in poultry carcasses from broiler house and poultry processing environments. *J. Food Prot.* 6:1426-1431.
- Rodrigues, F.; Alves, A.F.; Lemos, L.** (2006) Infecções urinárias diagnosticadas num serviço de urgência: dados microbiológicos e implicações na terapêutica e profilaxia. *Acta Pediátrica Portuguesa*, v.37, p. 5-8.
- Rossello-Mora, R. & Amann, R.** (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25, 39-67.
- Rosser SJ & Young H-K** (1999) Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antimicrob Chemother* 44: 11–18.
- Rosewarne C. P., Pettigrove V., Stokes H. W., Parsons Y. M.** (2010) Class 1 integrons in benthic bacterial communities: abundance, association with Tn402-like transposition modules and evidence for co-selection with heavy-metal resistance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 35–46.
- Russo TA, Stapleton A, Wenderoth S, Hooton TM, Stamm WE.**(1995) Chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. *J. Infect. Dis.* 172:440–445.

- Russo, T. A. & Johnson, J. R.** (2000) Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* 181, 1753–1754
- Russo, T. A. & Johnson, J. R.** (2003) Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 5, 449–456.
- Russo, T. A. & Johnson, J. R.** (2003) Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 5, 449–456.
- Sabaté, M. et al.** (2006) Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, France, v. 12, n. 9, p.880–886.
- Saenz, Y., Brinas, L., Dominguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., Torres, C.** (2004) Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 3996e4001.
- Sader, H. S., Gales, A. C., Pfaller, M. A. et al.** (2001) Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Brazilian Journal of Infectious Disease* 5, 200–14.
- Shi L, Zheng M, Xiao Z, Asakura M, Su J, et al.** (2006) Unnoticed spread of class 1 integrons in gram-positive clinical strains isolated in Guangzhou, China. *Microbiol Immunol* 50: 463–467.
- Sahm DF; Thornsberry C; Mayfield DC; Jones ME & Karlowsky JA.** Multidrug — resistant urinary tract isolates of *Escherichia coli*: prevalence and patient demographics in the United States in 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1402-1406, 2001.
- Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S et al.** (1995) Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Microb Drug Resist*; 1: 195–202.
- Salyers, A. A. & Amábile-Cuevas, C. F.** (1997) Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob Agents Chemother* 41, 2321–2325.
- Schleifer, K. H.** (2004). Microbial diversity: facts, problems and prospects. *Syst Appl Microbiol* 27, 3-9.

- Schloss PD, Handelsman J** (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* 71:1501–1506
- Schlüter A, Szczepanowski R, Pühler A, et al.** (2007) Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiol Rev*;31:449–477.
- Schwartz T., Kohonen W., Jansen B., Obst U.** (2003) Detection of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43, 325-335
- Smith JL, Drum DJ, Dai Y, et al.** (2007) Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*; 73: 1404–1414.
- Spier C.A., Barros S.M. & Rosiere C.A.** (2003) Geology and geochemistry of the Águas Claras and Pico Iron Mines, Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. *Miner Depos.* 38:751-774.
- Staroscik A** (2004) Calculator for determining the number of copies of a template. <http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>. Acessado em 15 de dezembro 2012.
- Stokes HW, Holmes AJ, Nield BS, Holley MP, Nevalainen KM, Mabbutt BC et al.** (2001) Gene cassette PCR:sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. *Appl Environ Microbiol* 67:5240–5246.
- Sunde M, Sørum H.** (1999) Characterization of integrons in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microb Drug Resist*; 5: 279–87.
- Sunde, M., Solheim, H. and Slette梅花°, J.S.** (2008) Genetic linkage between class 1 integrons with the dfrA12-orfF-aadA2 cassette array and sul3 in *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 130, 422–425.
- Sweeney, N. J. et al.** (1996) The *Escherichia coli* K-12 *gntP* gene allows *E. coli* F-18 to occupy a distinct nutritional niche in the streptomycin-treated mouse large intestine. *Infect.Immun.* 64, 3497–3503.
- Tauch A, Götzker S, Pühler A, Kalinowski J, Thierbach G.** (2002) The 27.8-kb Rplasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette aadA9 and the regulated tetracycline efflux system

Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100. Plasmid 48: 117–129.

- Tenaillon, O., Taddei, F., Radmian, M. & Matic, I.** (2001) Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation. *Res Microbiol* 152, 11-6.
- Tenaillon, O., D. Skurnik, B. Picard, E. Denamur** (2010) The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:207-217.
- Teng LJ, Hsueh PR, Liaw SJ, et al.** (2004) Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. *J. Microbiol Immunol Infect* 37:327-334.
- Tenover, F. C.** (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Med.* 119, S3–S10; discussion S62–S70
- Thorton, I.; Farago, M.** (1997) The geochemistry of arsenic. In: ABERNATHY, C.O.; CALDERON, R.L.; CHAPPELL, W. R. (Ed.). *Arsenic exposure and health effects*. New York: Chapman & Hall, p. 1 – 16.
- Torsvik, V., Ovreas, L. and Thingstad, T. F.** (2002) Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296, 1064-6.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA)** (2000) Science Policy Council Handbook: Peer Review, 2 nd Edition, EPA 100-B00-001, Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- van Elsas JD & Bailey MJ** (2002) The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol Ecol* 42: 187–197.
- Vidal, M.; Kruger, E.; Durán, C.; Lagos, R.; Levine, M.; Prado, V.; Toro, C.; Vidal, R.** (2005) Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. *Journal of Clinical Microbiology, United States*, v. 43, p.5362–5365.
- Vinué L, Sáenz Y, Somalo S, Escudero E, Moreno MA, Ruiz-Larrea F, and Torres C.** (2008) Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. *J Antimicrob Chemother*;62:934–937.
- Warren JW; Abrutyn E; Hebel JR; Johnson JR; Schaffer AJ & Stamm WE.** (1999) Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. *Clin Infect Dis* 29: 745-758,

- Weldhagen, G. F.** (2004) Integrons and  $\beta$ -lactamases - a novel perspective on resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 23, p. 556–562.
- Weston, D.P.** (1996) Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aqua-culture. In: Baird, D.J., Beveridge, M.C.M., Kelly, L.A., Meier, J.M. (Eds.), *Aquaculture and Water Resource Management*. Blackwell Science, Oxford, pp. 140–165.
- White, D. G. and Mcdermott, P. F.** (2001) Emergence and transfer of antibacterial Resistance. *J Dairy Sci* 84, 151-155.
- WHO 2000.** Overcoming antibiotic resistance. World Health Organization Report in Infectious Diseases. World Health Organization, Geneva.
- Witte, W.** (2000) Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *J Antimicrob Agents* 14, 321-325.
- Wright MS, Baker-Austin C, Lindell AH, Stepanauskas R, Stokes HW & McArthur JV** (2008) Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *ISME J* 2: 417–428.
- Xu, H.-S., Roberts, N., Singleton, F. L., Atwell, R. W., Grimes, D. J. & Colwell, R. R.** (1982) Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology* 8, 313–23.
- Xu Z, Li L, Alam MJ, Zhang L, Yamasaki S, et al.** (2008) First confirmation of integron-bearing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* 57: 264–268.
- Yan, H., Li, L., Zong, M., et al.** (2010) Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in clinical bacterial isolates from patients in South China. *J. Health Sci.*, 56, 442–450.
- Yang, C.M., M.F. Lin, C.H. Lin, Y.T. Huang, C.T. Hsu, and M.L. Liou.** (2009) Characterization of antimicrobial resistance patterns and integrons in human fecal *Escherichia coli* in Taiwan. *J. Infect. Dis.* 62, 177–181.
- Zaidi, M.B., Zamora, E., Diaz, P., Tollefson, L., Fedorka- Cray, P.J., Headrick, M.L.** (2003) Risk factors for fecal quinolone-resistant *Escherichia coli* in Mexican children. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1999–2001.
- Zhang L, Foxman B, Marrs C.** (2002) Both Urinary and Rectal *Escherichia coli* Isolates Are Dominated by Strains of Phylogenetic Group B2. *J Clin Microbiol* 40:3951-3955.

## 7 - Anexos

Tabela 14. Resultado da busca de sequências homólogas no GenBank para caracterização dos cassetes gênicos dos isolados de *E. coli*.

Isolados	pb	Gene correspondente	Fenótipo	Organismo (Número de acesso)	Identidade máxima
*56	346	<i>dfr1</i>	Trimetoprim	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (HE583392.2)	90%
*23	1294	<i>aadA5</i>	Estreptomicina e spectiomicina	<i>E. coli</i> (JF806495)	98%
*43	624	<i>dfr17</i>	Trimetoprim	<i>E. coli</i> (HQ611044)	100%
*46	696	<i>dfrA17</i>	Trimetoprim	<i>E. coli</i> (JF806498)	99%
**T22	601	<i>aadA22</i>	Estreptomicina e spectiomicina	<i>E. coli</i> (JF806492)	99%
**M13	910	<i>aadA1</i>	Estreptomicina e spectiomicina	<i>E. coli</i> (HQ880267)	99%
**H12	636	<i>aadA1</i>	Estreptomicina e spectiomicina	<i>E. coli</i> (HQ880267)	100%
**H23	903	<i>aadA1</i>	Estreptomicina e spectiomicina	<i>E. coli</i> (HQ880267)	99%

\*isolados de mulheres com ITU

\*\*isolados de crianças sadias



## Sequências da integrase dos isolados que não apresentaram cassetes gênicos

### >Isolado 10

GAGGTCCTCCGATCTCCTGAAGCCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAAGCAAGG  
CCGCCAATGCCTGACGATGCGTGGAAGCTTGACCGCCAGCCGCTGCATGTCGGGCATCAAATGCCAGCA  
ACATAAAGCCACAAGCCATCAGCAGTAAGCCAAAGGCAAACCTCAGCCAGACGCGCAATGCTGAATTGC  
CGCGCTTTCTGGCGACGCCAGCCAGGCCAGAACAAACCCAGCGAGCATCACCGCAATAGCATTACCG  
ACTGGAATAGTGCTGTAGGTACTTCAATATTGAATGCCTGACGATGCGTGGAAGGGGGGGGGGGCCTCC  
CACCCCCCGTCTTGTAATAATTGATCCACAATTTGAAATCTCGTGCTGAAGCCGAATCGACCCACAACAC  
TTGTACCACCGTCTTAAAAAGTTTCTTCGGATTGTGAACGGAGCCCGAGGACGGGGAAGCCGGCCAA  
CCACTG

### >Isolado 15

CCTCCCGCACGATGATCGTGCCGTGATCGAAATCCAGATCCTTGACCCGCAGTTGCAAACCCTCACTGAT  
CCGATGCCCGTTCCATACAGAAGCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCG  
AACCACTTCATCCGGGTACGACACCAGCCGCAAGCGCCGACGGCCGAGGTCTTCCGATCTCCTGAAG  
CCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAAGCAAGGCCGCAATGCCTGACGATGCGT  
GGAATGCTGATGATCTACGCTTGTCTGGCGTGTCTATGCCTTTGGCGGGATGTTAGAAGCCGGACGTAT  
CGGCTCTGCCACCAACAACCTCGGCTTTATGTATGAGCTGGATGCTATCGCGCGTGCCTGGTAGGCGGT  
GTATCGTTCACCGCGGTGTGGGGACGGTGATTGGCGTGGTGACCCGGGTAATATTTTTACCGTCATCA  
ACTATGGCCTGA

### >Isolado 20

GACCCGCAGTTGCAAACCCTCACTGATCCGCATGCCCGTTCCATACAGAAGCTGGGCGAACAAACGATG  
CTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCACTTCATCCGGGGTCAGCACACCAGCCGCAAGCGCCGCG  
ACGGCCGAGGTCTTCCGATCTCCTGAAGCCAGGGCAGATCCGTGC

### >Isolado 21

TCCCGCACGATGATCGTGCCGTGATCGAAATCCAGATCCTTGACCCGCAGTTGCAAACCCTCACTGATCC  
GCATGCCCGTTCCATACAGAAGCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAA  
CCACTTCATCCGGGGTCAGCACACCAGCCGCAAGCGCCGACGGCCGAGGTCTTCCGATCTCCTGAAGCC  
AGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAAGCAAGGCCGCAATGCCTGACGATGCGTGT  
GAAGCTTGACCGCCAGCCGCTGCATGTCGGGCATCAAATGCCAGCAACATAAAGCCACAAGCCATCAGC  
ACGTAAGCCAAAGGCAAACCTTCAGGCCAGACGCGCAATGCTGAATTGCCGCGGCTTTCTGGCGACGCCA  
GCCAGGCCAGAACAAACCCAGCGAGCATCACCGCAATAGCATTACCGACTGGAATAGTGCTGTAGGTA  
CTTCAATATTGAATGCCTCGACGATGCGT

### >Isolado 24

ACCCGCAGTTGCAAACCCTCACTGATCCGCATGCCCGTTCCATACAGAAGCTGGGCGAACAAACGATGC  
TCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCACTTCATCCGGGGTCAGCACACCAGCCGCAAGCGCCGCGA  
CGGCGGAGGTCTTCCGATCTCCTGAAGCCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAAGCA  
CAAGGCCGCAATGCCTGACGATGCGTGGAAAGCTTGACCGCCAGCCGCTGCATGTCGGGCATCAAATGC  
CAGCAACATAAAGCCACAAGCCATCAGCAGTAAGCCAAAGGCAAACCTTCAGCCAGACGCGCAATGCTG  
AATTGCCGCGGCTTTCTGGCGACGCCAGCCAGGCCAGAACAAACCCAGCGAGCATCACCGCAATAGCAT  
TCACCGACTGGAATAGTGCTGTAGGTACTTCAATATTGAATGCCT

### >Isolado 26

CCAGAATGCCTTGACCCGCAGTTGCAAACCCTCACTGATCCGCATGCCCGTTCCATACAGAAGCTGGGCG  
AACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCACTTCATCCGGGGTCAGCACACCAGCCG  
AAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTTCCGATCTCCTGAAGCCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCG  
TAGAAGAACAGCAAGGC

### >Isolado 31

ATCCAGATCCTTGACCCGCAGTTGCAAACCCTCACTGATCCGCATGCCCGTTCCATACAGAAGCTGGGCG  
AACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCACTTCATCCGGGGTCAGCACACCAGCCG  
AAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTTCCGATCTCCTGAAGCCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCT

### >Isolado 100

CGCTTAAAAAGGTCTCCCGCACGATGATCGTGCCGTGATCGAAATCCAGATCCTTGACCCGCAGTTGCA  
AACCCCTCACTGATCCGCATGCCCGTTCCATACAGAAGCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAA  
AACCGAGGATGCGAACCACTTCATCCGGGGTCAGCACACCAGCCGCAAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTT  
CCGATCTCCTGAAGCCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAAGCAAGGCCGCAAT  
GCCTGACGATGCGTGGAA