

**MARIA CECILIA CERGOLE NOVELLA**

Caracterização fenotípica e genotípica da resistência a antimicrobianos e análise da diversidade genética em amostras de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga e *Escherichia coli* isoladas de sítios extraintestinais

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo - UNIFESP para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências

**São Paulo**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

# MARIA CECILIA CERGOLE NOVELLA

Caracterização fenotípica e genotípica da resistência a antimicrobianos e análise da diversidade genética em amostras de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga e *Escherichia coli* isoladas de sítios extraintestinais

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo - UNIFESP para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências

**Orientador:** Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari. Disciplina de Infectologia - Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Beatriz Ernestina Cabilio Guth. Disciplina de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

**São Paulo**

**2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA**

**Chefe do Departamento:**

Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paula

**Coordenador do curso de Pós-graduação:**

Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro fornecido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

**São Paulo**

**2010**

# MARIA CECILIA CERGOLE NOVELLA

Caracterização fenotípica e genotípica da resistência a antimicrobianos e análise da diversidade genética em amostras de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga e *Escherichia coli* isoladas de sítios extraintestinais

## **Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Mauro Batista de Moraes - Professor Adjunto da Disciplina de Gastropediatria do Departamento de Pediatria da UNIFESP

Profa. Dra. Rosa Maria da Silva - Professora Associada do Departamento de Micro-Imuno-Parasitologia da UNIFESP

Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez - Professora Titular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP - São Paulo

Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira - Profa. Dra. do Instituto de Ciências Biológicas da USP - São Paulo

## **Suplentes:**

Dra Tânia Mara Ibelli Vaz - Pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e Doutora pela UNIFESP

Profa. Dra. Ana Cristina Gales - Professora Adjunta da Disciplina de Infectologia do Departamento de Medicina da UNIFESP

Aprovada em: 17/05/2010

# *Dedicatórias*

*Aos meus queridos pais MAFALDA e JOÃO pelo amor incondicional e pela dedicação às filhas.*

*Ao meu querido marido DINO, pela dedicação à nossa família, pelo companheirismo, incentivo e, acima de tudo, pelo amor.*

*Aos meus queridos filhos STEFANO e ISABELLA, como estímulo nessa luta constante por alcançar nossos sonhos.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS CAMPOS  
PIGNATARI pelas oportunidades oferecidas, pelos  
ensinamentos, por ter me acolhido em seu laboratório e  
pelo cuidado com seus alunos.*

*À Profa. Dra. BEATRIZ ERNESTINA CABILIO  
GUTH pelos ensinamentos, por ter me acolhido em seu  
laboratório, pela amizade, por ter me apoiado e  
colaborado com muita dedicação.*

Agradeço a **DEUS** por me dar força, discernimento, perseverança e saúde para cumprir os objetivos que tracei em minha vida.

Às minhas queridas irmãs **Dra. MARIA CRISTINA e MARIA DO CARMO** pelo incentivo, confiança e sabedoria nos momentos difíceis.

À minha querida sobrinha **DANIELLA** pelo incentivo e momentos de descontração no trânsito.

À **Dra. MARIANA CASTANHEIRA**, ex-aluna do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) e do laboratório ALERTA, pela ajuda no desenvolvimento do projeto deste trabalho e análise dos resultados.

À **Dra. VICKY IRENE ENNE** e todos seus colaboradores pela prestatividade e empenho durante o desenvolvimento dos meus experimentos no laboratório do Departamento de Medicina Celular e Molecular da Universidade de Bristol, Inglaterra.

À **FERNANDA MATSIKO INOUE**, aluna de doutorado dos laboratórios LEMC/ALERTA, pelo envio das amostras de *E. coli* ao laboratório do Departamento de Medicina Celular e Molecular da Universidade de Bristol, Inglaterra.

À **Dra. MIRIAN SILVA DO CARMO**, aluna de pós-doutorado dos laboratórios LEMC/ALERTA, pela amizade e ajuda na execução deste trabalho.

À **Dra. MARTHA GABRIELA CELLE RIVERO**, aluna de pós-doutorado dos laboratórios LEMC/ALERTA, pela amizade, pelo auxílio na formatação do trabalho, pelo bom humor e prestatividade.

À **ANNA CAROLINA KOCKSKROH** e **FERNANDA MARQUES CASTRUCCI** alunas de mestrado e doutorado dos laboratórios LEMC/ALERTA pela análise do dendograma do PFGE.

À **Profa. Dra. ANA CRISTINA GALES** que com seu dinamismo e conhecimento, supera todas as expectativas, e aos alunos, colegas e amigos dos laboratórios LEMC/ALERTA pela dedicação, auxílio e presteza no excelente trabalho realizado em conjunto.

À secretária dos laboratórios LEMC/ALERTA **ROSANA CAPECCE** pela colaboração nos detalhes administrativos.

À Secretaria da Pós-Graduação em Infectologia **CÁSSIA GARCIA** e ao ex-secretário **CHARLYS COSTA** pela colaboração nos detalhes administrativos.

Ao secretário da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa UNIFESP do Setor de Acompanhamento de Bolsas e Editais CAPES no País e Exterior, **MARCELO VASCONCELLOS**, pela colaboração nos detalhes administrativos do doutorado-sanduíche.

À **Dra. FÁBIA A. SALVADOR**, ex-aluna do laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP), pela ajuda na extração plasmidial das amostras de *E. coli* estudadas e, sobretudo pela grande amizade.

À **Dra. SUELY CARLOS SAMPAIO**, aluna de pós-doutorado do laboratório de Microbiologia do DMIP, pela especial amizade e incentivo nos momentos de dificuldades.

Aos alunos **CAMILA GRAFE VON GAL, CECÍLIA MATHEUS GUIMARÃES, FRANCIELE TAFARELLO BISCOLA, KATHELIN MELO E SILVA LASCOWSKI, LUIS FERNANDO DOS SANTOS, MIRIAN GUIRRO** pelas risadas, amizade, carinho e dedicação.

Às **Profas. Dras. TÂNIA A. T. GOMES, ROSA MARIA SILVA e SYLVIA L. P. CARDOSO LEÃO**, seus alunos, colegas e amigos dos laboratórios de Microbiologia do DMIP pela amizade e dedicação nesses anos de convívio.

À **Técnica EVANILDE MARIA GONÇALVES** e à **Dra. MÔNICA A. M. VIEIRA** dos laboratórios de Microbiologia do DMIP pelo auxílio técnico e pela amizade do convívio diário.

À equipe de apoio aos laboratórios de Microbiologia do DMIP **DARCI CLEMÊNCIA DA SILVA, MARIA CRISTINA SANTOS LISBOA, VITÓRIA DE AMORIN DIAS, MARIA ZORAIDE VASCONCELOS** pela prestatividade e amizade.

Aos secretários da Microbiologia do DMIP **PAOLA ROSSI e FREDERICO LOURENÇO DE BARROS** e à ex-secretária **MAGDA DE JESUS NISTI** pela colaboração nos detalhes administrativos.

## SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiv
ÍNDICE DE TABELAS.....	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xviii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1. 1. <i>Escherichia coli</i> produtoras de toxina Shiga.....	3
1. 2. <i>Escherichia coli</i> isoladas de sítios extraintestinais.....	5
1. 3. Resistência a antimicrobianos.....	6
1. 3. 1. Produção de $\beta$ -lactamase.....	6
1. 3. 1. 1. Produção de $\beta$ -lactamase TEM.....	9
1. 3. 1. 2. Produção de $\beta$ -lactamase SHV.....	10
1. 3. 1. 3. Produção de $\beta$ -lactamase CTX-M.....	11
1. 3. 1. 4. Produção de $\beta$ -lactamase OXA.....	13
1. 3. 2. Resistência às quinolonas/fluoroquinolonas.....	14
1. 4. Integron.....	16
1. 5. Transferência de determinantes de resistência bacteriana.....	19
1. 6. Custo biológico bacteriano na aquisição e expressão de genes de resistência e/ou virulência.....	22

	Página
2. OBJETIVOS.....	26
3. RESULTADOS.....	28
Artigo 1.....	30
Artigo 2.....	51
Artigo 3.....	73
4. RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	96
4. 1. Presença de sequências genéticas relacionadas a toxinas, prováveis adesinas e proteases.....	97
4. 2. Identificação de mesmo integron nos diferentes patotipos de <i>E. coli</i> estudados.....	102
5. DISCUSSÃO.....	104
6. CONCLUSÕES.....	113
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
8. APÊNDICES.....	138
8. 1. Produção de $\alpha$ -hemolisina (Hly <sub>a</sub> ).....	139
9. ANEXOS.....	140
Comissão de ética.....	141
Ofício do orientador brasileiro pós-estágio doutorado-sanduíche.....	142
Ofício do orientador estrangeiro pós-estágio doutorado-sanduíche.....	143

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>aadA</i>	Gene que codifica aminoglicosídeo adeniltransferase
Afa/draBC	Adesina afimbrial/adesina da família Dr
APEC	<i>E. coli</i> patogênica aviária
<i>bla</i>	Gene que codifica $\beta$ -lactamase
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Cdt-V	Toxina distensora citoletal tipo-V
CH	Colite Hemorrágica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
Cnf	Fator citotóxico necrosante
CTX	Cefotaximase
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente aderente
DEC	<i>E. coli</i> diarreio gênicas
DM25	Meio Mínimo Davis com 25mg/mL de glicose
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos Trifosfatos
D. O.	Densidade Óptica
<i>eae</i>	Gene que codifica intimina
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético
Efa1	Fator de aderência das EHEC
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EhxA	Enterohemolisina
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
ESBL	$\beta$ -Lactamase de Espectro Ampliado
Espl	Serino protease cromossomal
EspP	Serino protease plasmidial
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EUA	Estados Unidos da América

ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
FimH	Adesina fimbrial tipo 1
GECA	Gastroenterocolite aguda
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-1-2-etanosulfônico
HlyA	Alfa hemolisina
<i>intl1</i>	Gene que codifica integrase associado ao integron classe 1
ITU	Infecção do trato urinário
Iha	Adesina homóloga a IrgA de <i>Vibrio cholerae</i>
IutA	Receptor de ferri-aerobactina
kDa	Kilodalton
KpsMT II	Sistema capsular tipo II
LB	Meio de cultura Lúria Bertani
LEE	<i>Locus of Enterocyte Effacement</i>
LEMC	Laboratório Especial de Microbiologia Clínica
Lesão A/E	Lesão <i>Attaching-and-Effacing</i>
Lpf	Fímbria polar longa
mg	Miligrama
MH	Ágar Müller-Hinton
MIC	Concentração Inibitória Mínima
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MNEC	<i>E. coli</i> associada à meningite do recém nascido
NaOH	Hidróxido de Sódio
Nm	Nanomolar
ORF	Fase de Leitura Aberta
OXA	Oxacilinase
PapC	Fímbria P associada a pielonefrite
Pb	Pares de base
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR inc/rep	PCR - Grupos de incompatibilidade plasmidial
PCR-RFLP	PCR - Análise do Polimorfismo de Restrição
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

<i>qacE</i> Δ1	Gene que codifica resistência ao composto amônio quaternário
q.s.p.	Quantidade suficiente para
Saa	Adesina autoaglutinante
SDS	Dodecyl Sulfato de Sódio
SfaS	Adesina fimbrial S
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica
SHV	Enzima variável sulfidríla
SPATE	Família de proteínas autotransportadoras das <i>Enterobacteriaceae</i>
SSC	Solução de suspensão celular
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
<i>strA</i>	Gene que codifica estreptomicina fosfotransferase
Stx	Toxina Shiga
Sub-AB	Citotoxina subtilase
<i>sul</i>	Gene que codifica sulfonamidas
TAE	Solução tampão Tris-Acetato EDTA
TE	Solução Tampão Tris-EDTA
TEB	Solução Tampão Tris-EDTA-Borato
TEM	Beta-lactamase tipo TEM
<i>Tet</i>	Gene que codifica resistência a tetraciclina
ToxB	Adesina presente na amostra Sakai EHEC O157:H7
TSA	Ágar Triptona de soja
TSB	Caldo Triptona de soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPEC	<i>E. coli</i> Uropatogênica
Vat	Toxina com atividade vacuolizante
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromol

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
3. RESULTADOS	
Artigo 1. Tabela 1. Sequências iniciadoras e condições utilizadas para os ensaios de PCR.....	42
Artigo 1. Tabela 2. Características das amostras de <i>E. coli</i> .....	45
Artigo 2. Tabela 1. Características das amostras de STEC.....	69
Artigo 3. Tabela 1. Características fenotípica e genotípica das amostras de <i>E. coli</i> .....	80
Artigo 3. Tabela 2. Características fenotípicas e genotípicas das amostras de <i>E. coli</i> na determinação do <i>fitness cost</i> .....	88
4. RESULTADOS COMPLEMENTARES	
Tabela 1. Sequências iniciadoras e condições utilizadas para os ensaios de PCR.....	99
Tabela 2. Marcadores de virulência presentes nas amostras de STEC.....	100
Tabela 3. Marcadores de virulência presentes nas amostras de <i>E. coli</i> isoladas de sítios intestinais e extraintestinais.....	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. INTRODUÇÃO	
Figura 1. Estrutura do integron.....	17
Figura 2. Estrutura do integron e cassete gênico.....	18
3. RESULTADOS	
Artigo 1. Figura 1A. Perfil plasmidial das amostras de <i>E. coli</i> carreadoras de <i>int1</i> .....	43
Artigo 1. Figura 1B. Representativo do ensaio de hibridização/ <i>Southern blot</i> com sonda específica <i>int1</i> .....	43
Artigo 1. Figura 2. Dendrograma relacionado às amostras de <i>E. coli</i> .....	44
Artigo 2. Figura 1. Análise PCR-RFLP das amostras de STEC carreadoras de <i>int1</i> .....	70
Artigo 2. Figura 2A. Perfil plasmidial das amostras de STEC carreadoras de <i>int1</i> .....	71
Artigo 2. Figura 2B. Representativo do ensaio de hibridização/ <i>Southern blot</i> com sonda específica <i>int1</i> .....	71
Artigo 2. Figura 3A. Dendrograma relacionado às amostras de STEC O111 de origem humana e animal.....	72
Artigo 2. Figura 3B. Dendrograma relacionado às amostras de STEC O118 de origem humana e animal.....	72
Artigo 3. Figura 1A. Extração plasmidial das amostras de STEC Ec120/00, <i>E. coli</i> HS e transconjugante HS Ec120/00.....	89
Artigo 3. Figura 1B. Extração plasmidial das amostras de STEC BY-1, <i>E. coli</i> HS e transformante HS BY-1amp.....	90
Artigo 3. Figura 1C. Extração plasmidial das amostras de <i>E. coli</i> 36, <i>E. coli</i> HSrif <sup>R</sup> e transconjugante HSrif <sup>R</sup> 36.....	91
3. RESULTADOS COMPLEMENTARES	
Figura 3. Representativo da análise PCR-RFLP das amostras de STEC e <i>E. coli</i> carreadoras de <i>int1</i> .....	103

## RESUMO

O perfil de resistência a antimicrobianos e análise da diversidade genética foi analisado em 32 amostras de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) isoladas de infecção humana (n = 21) e das fezes de bovinos saudáveis (n = 11) e em 12 amostras de *E. coli* de origem humana isoladas de sítios extraintestinais, exceto uma delas isolada de diarreia. As amostras foram isoladas no Estado de São Paulo. Multiresistência (resistência a  $\geq 3$  grupos de antimicrobianos) foi observada tanto nas amostras de STEC (21/32 - 65,6%) como nas demais *E. coli* estudadas (8/12 - 66,7%). As amostras de STEC foram resistentes à tetraciclina (100%), seguida à estreptomicina (78,1%) e trimetoprim-sulfametoxazol (56,2%). Onze amostras de STEC resistentes a ampicilina carregavam a enzima  $\beta$ -lactamase TEM ( $bla_{TEM}$ ) e foram sensíveis a todas as cefalosporinas e quinolonas analisadas. As amostras de *E. coli* associadas a infecções intestinais e extraintestinais foram resistentes a um maior número de grupos de antimicrobianos. Foi observado resistência à estreptomicina (91,7%), tetraciclina (75%) e trimetoprim-sulfametoxazol (66,7%). Resistência à ampicilina (58,3%) foi também identificada. Três amostras de *E. coli* mostraram resistência a cefalosporinas de terceira geração, uma delas isolada de infecção intestinal carregava  $bla_{CTX-M-14}$  e  $bla_{TEM-1}$  e outra amostra isolada de secreção traqueal carregava  $bla_{CTX-M-15}$  e  $bla_{OXA-1}$ . Cinco das 12 amostras de *E. coli* mostraram resistência à quinolonas. O gene da integrase associada ao integron classe 1 (*intI1*) foi encontrado em 6 (28,6%) das 21 amostras de STEC isoladas de humanos pertencentes ao sorogrupo O111 e em uma amostra isolada de bovino (9,1%) pertencente ao sorogrupo O118. Oito das 12 amostras de *E. coli* associadas a infecções intestinais e extraintestinais apresentaram *intI1* e pertenciam a vários sorotipos. As amostras *intI1* positivas carregavam plasmídeos com uma diversidade de tamanho, mas perfil plasmidial similar foi observado em algumas delas. O ensaio de hibridização indicou que *intI1* estava localizado em plasmídeos em 5 das 7 amostras de STEC e em 6 das 8 demais amostras de *E. coli*. Análise dos integrons por PCR-RFLP revelou perfil idêntico em 4 amostras de STEC e em uma *E. coli* extraintestinal. Esses integrons tinham tamanho uniforme e continham o cassete gênico *aadA1*. O agrupamento filogenético mostrou que a

maioria das amostras de STEC pertencia ao grupo B1, enquanto os grupos A, B2 e D foram observados entre as demais amostras de *E. coli* em 33,3%, respectivamente. Quatro amostras de *E. coli* isoladas de infecções extraintestinais foram denominadas como típicas *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC). Entre as 44 amostras de *E. coli* estudadas 54,5% apresentaram serino-proteases autotransportadoras (SPATE). A toxina vacuolizante Vat foi identificada somente em 3 das 12 *E. coli* associadas a infecções intestinais e extraintestinais, e essas amostras apresentaram fímbria tipo 1, fator necrosante citotóxico, Alfa hemolisina e a adesina de membrana externa, Iha (100%, 8,3%, 8,3% e 25%, respectivamente). A tipagem por PFGE das amostras de STEC O111 e O118 mostrou uma diversidade de perfis, mas a maioria das amostras foi agrupada em um mesmo grupo (80% a 97% de similaridade). Por outro lado, a tipagem molecular confirmou que a maioria das amostras de *E. coli* associadas a infecções intestinais e extraintestinais era epidemiologicamente não relacionada (similaridade genética  $\geq 80\%$ ), exceto 2 amostras de *E. coli* isoladas do mesmo paciente, no mesmo dia, e que apresentaram padrões de PFGE com similaridade de 93,3%. Os plasmídeos das amostras de *E. coli* associadas a infecções intestinais e extraintestinais carreando genes de resistência e/ou virulência, acarretaram um custo biológico de pequeno a neutro por geração, quando inseridos às amostras laboratoriais de *E. coli*. Em conclusão, apesar da aquisição de genes ter interferido pouco na capacidade das amostras de *E. coli* laboratoriais em se multiplicarem e consequentemente se disseminarem, a presença de integrons e de outros elementos genéticos móveis tanto em amostras de STEC como entre as amostras de *E. coli* extraintestinais é preocupante, principalmente em relação as amostras de *E. coli* extraintestinais considerando a provável aquisição de resistência a outros antimicrobianos, como recentemente descrito aos carbapenens.

## ABSTRACT

Phenotypic and genotypic characterization of resistance to antimicrobials and genetic diversity were analyzed in 32 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from human infections (n = 21) and cattle feces (n = 11), and 12 human extraintestinal *E. coli* strains, except one isolated from diarrhea. The *E. coli* strains were isolated in Sao Paulo State. Multiresistance (resistance to  $\geq 3$  antimicrobial groups) was observed in both STEC (21/32 – 65.6%) and ExPEC strains (8/12 - 66.7%). The STEC strains were resistant to tetracycline (100%) followed by streptomycin (78.1%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (56.2%). The eleven STEC strains resistant to ampicillin possessed  $\beta$ -lactamase TEM ( $bla_{TEM}$ ) enzyme and all strains were susceptible to third-generation cephalosporins, and also to quinolones. On the other hand, *E. coli* strains associated with intestinal and extraintestinal infections were resistant to a larger number of antimicrobial groups than STEC. Resistance was observed to streptomycin (91.7%), tetracycline (75%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (66.7%). Resistance to ampicillin (58.3%) was also identified. Three *E. coli* strains were non-susceptible to third-generation cephalosporins, one isolated from diarrhea carried  $bla_{CTX-M-14}$  and  $bla_{TEM-1}$  whereas other, isolated from tracheal secretion, carried  $bla_{CTX-M-15}$  and  $bla_{OXA-1}$ . Five of the 12 *E. coli* strains showed resistance to quinolones. Integrase associated with class 1 integron (*int1*) was detected in six (28.6%) of the 21 human STEC strains belonging to O111 serogroup and in one (9.1%) bovine strain belonging to O118 serogroup. Eight of the 12 *E. coli* strains associated with intestinal and extraintestinal infections presented *int1* and belonged to various serotypes. The *int1*-positive isolates carried plasmids showing a diversity of sizes, but similar plasmid profiles were observed in some strains. Southern blot hybridization assay with *int1*-specific probe indicated that *int1* was located on plasmids in five out of the seven STEC strains and in six out of the eight *E. coli* strains. Analysis of integrons by PCR-RFLP revealed identical profiles in 4 STEC strains and in one extraintestinal *E. coli* strain. These integrons had a uniform size and contained a single gene cassette *aadA1*. The phylogenetic grouping showed that most of the STEC strains belonged to B1 group, while groups A, B2 and D (33.3%), respectively were observed among the other *E. coli* isolates.

Four *E. coli* strains isolated from extraintestinal infection were classified as typical extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). Among 44 *E. coli* strains studied, 54.5% presented the Spate protease autotransporter. The Vat vacuolating toxin was identified only in 3 of the 12 *E. coli* strains associated with intestinal and extraintestinal infections, and these strains presented type-1 fimbriae, cytotoxic necrotizing factor, alpha-hemolysin and the IrgA homologue adhesin, Iha (100%, 8.3%, 8.3% e 25%, respectively). PFGE analysis of O111 and O118 STEC strains showed a diversity of profiles, but most of the strains were grouped in the same cluster (80% to 97% of similarity). On the other hand, PFGE analysis revealed that most *E. coli* strains associated with intestinal and extraintestinal infections were epidemiologically unrelated, and were not grouped in any cluster with significant similarity ( $\geq 80\%$ ), except 2 *E. coli* strains, isolated at the same day from the same patient, and that presented PFGE patterns with similarity of 93.3%. The plasmids of the *E. coli* strains associated with intestinal and extraintestinal infections carrying resistance and/or virulence genes, resulted in a low or neutral biological cost per generation, when inserted into laboratory *E. coli* strains. In conclusion, despite the acquisition of genes has shown a low interference in the ability of laboratory *E. coli* strains to grow and consequently to spread, the presence of integrons and other mobile genetic elements in both STEC and *E. coli* associated with extraintestinal infections is worrisome, mainly in relation to extraintestinal *E. coli* strains considering the probable acquisition of resistance to other antimicrobials, as recently reported to carbapenems.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* é um bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo, membro da família *Enterobacteriaceae* que pode ser classificado em três grandes grupos, considerando-se características moleculares e critérios clínicos: amostras comensais não patogênicas, amostras patogênicas extraintestinais e amostras diarreiogênicas. As amostras não patogênicas usualmente não causam danos ao hospedeiro se o epitélio estiver íntegro. As infecções por amostras patogênicas podem ocorrer quando a integridade do epitélio intestinal está comprometida, a exemplo da mucosite observada em pacientes submetidos à quimioterapia e em pacientes imunocomprometidos (RUSSO e JOHNSON, 2000; ZINNER *et al.*, 1999; KAPER *et al.*, 2004). As amostras de *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC) possuem genes de virulência que as capacitam a causar infecções extraintestinais, como infecção urinária, sepse ou meningite, dentre outros quadros infecciosos (NATARO e KAPER, 1998). As amostras de *E. coli* envolvidas em infecções intestinais são coletivamente denominadas *E. coli* diarreiogênicas (DEC), sendo classificadas em seis patotipos de acordo com o conjunto de marcadores de virulência e os sinais e sintomas que determinam no hospedeiro. *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (KAPER *et al.*, 2004). Embora os fatores e mecanismos de virulência destes enteropatógenos afetem o hospedeiro de formas distintas, a principal manifestação clínica é a diarreia, que pode ser branda, moderada ou intensa. Alguns genes que codificam fatores de virulência

das DEC localizam-se em plasmídeos, enquanto outros se encontram integrados ao cromossomo bacteriano.

### **1. 1. *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga**

Infecções causadas por *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) estão associadas a um amplo espectro de doenças que compreende desde diarreias brandas ou mesmo inaparentes, até quadros clínicos extremamente graves e exacerbados como a colite hemorrágica (CH) e a síndrome hemolítica urêmica (SHU) (NATARO e KAPER, 1998). Embora o sorotipo O157:H7 tenha sido o primeiro a ser associado a surtos e casos esporádicos de CH e SHU, atualmente já está estabelecido que alguns sorogrupos não-O157 têm igualmente um papel importante nas infecções por STEC, inclusive prevalecendo em diversos países.

Desta forma, o termo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) tem sido utilizado para se referir ao conjunto de amostras mais virulentas, responsáveis por provocar diarreia com complicações como CH e SHU. EHEC seria, portanto, um subgrupo dentro do conjunto das STEC e os sorogrupos mais frequentemente relacionados a surtos e/ou casos esporádicos de CH e SHU, em diversos países, são O26, O91, O103, O111, O113 e O157 (NATARO e KAPER, 1998).

A principal característica de virulência das STEC, a produção de toxina Shiga, é responsável pela sintomatologia intestinal e extraintestinal da doença, porém, outros fatores são também considerados relevantes para a virulência destas bactérias, como supostas adesinas (DOUGHTY *et al.*, 2002; NICHOLLS

*et al.*, 2000; PATON *et al.*, 2001; KAPER *et al.*, 2004) e outras toxinas (BIELASZEWSKA *et al.*, 2004). Alguns sorotipos, considerados altamente virulentos para o homem, abrigam *locus of enterocyte effacement* (LEE), onde estão localizados todos os genes necessários para a formação da lesão *attaching-and-effacing* (A/E). A proteína responsável pela aderência íntima observada na lesão A/E é denominada intimina, que é codificada pelo gene *eae*. Contudo, a presença de LEE não é essencial para o desenvolvimento de infecções severas por STEC, incluindo SHU, uma vez que cepas desprovidas de *eae* também tem sido isoladas de casos graves (PATON e PATON, 1998).

Diferindo de outras categorias diarreiogênicas de *E. coli* que afetam exclusivamente o homem, STEC apresenta reservatórios naturais entre os quais se podem destacar os ruminantes, principalmente os bovinos (PATON e PATON, 1998). Consequentemente, STEC é transmitida ao homem principalmente através de alimentos cárneos e lácteos de origem bovina e quaisquer outros alimentos contaminados direta ou indiretamente com material fecal bovino. Além da transmissão através do alimento contaminado, a água e a transmissão direta pessoa-pessoa, embora menos comum, também tem sido considerada uma via de transmissão da infecção (ACKMAN *et al.*, 1997; VARMA *et al.*, 2003).

Bactérias resistentes a antimicrobianos via cadeia alimentar (alimento e água) talvez atue sobre a seleção e disseminação de resistência a antimicrobianos entre patógenos bacterianos humanos. Estreita relação existe entre o uso de agentes antimicrobianos no tratamento de infecções de animais e o alto nível de resistência observado nas amostras de STEC (ZHAO *et al.*, 2001; WHITE, *et al.*, 2002).

## 1. 2. *Escherichia coli* isoladas de sítios extraintestinais

As *Escherichia coli* isoladas de sítios extraintestinais são responsáveis por ampla variedade de infecções extraintestinais comunitárias ou hospitalares e podem envolver qualquer órgão ou sítio anatômico (RUSSO e JOHNSON, 2000). De acordo com os critérios estabelecidos pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), infecção comunitária é a infecção constatada nas primeiras 48 horas da admissão do paciente em um hospital e infecção hospitalar ou nosocomial é a infecção constatada após 48 horas da admissão do paciente. Atualmente, o termo infecção hospitalar está sendo substituído por infecção relacionada à assistência a saúde, devido a sua maior abrangência como infecções desenvolvidas em pacientes que necessitam de hemodiálise ou *homecare*. É comum isolar amostras de *E. coli* em infecção do trato urinário, pneumonia, osteomielite, infecções de tecidos moles e pele, bacteremia e meningite de recém nascidos levando a alta morbidade, mortalidade e alto custo para a Saúde Pública (ANVISA).

O grupo das *E. coli* extraintestinais, inclui subpatotipos como *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* associada à meningite do recém nascido (MNEC). Estes grupos apresentam considerável diversidade genômica e possuem potencial de virulência determinado pela presença de fatores de virulência (JOHNSON *et al.*, 2008b). Para causar doença, as amostras de *E. coli* extraintestinais devem alcançar um determinado sítio extraintestinal e expressar um conjunto de fatores de virulência que podem incluir: adesinas mediadas por fímbrias (como as fímbrias P, S e tipo 1) e/ou adesinas afimbriais (*Afa*, *afimbrial adhesins*) da família Dr, sistema aerobactina de aquisição de

ferro, proteinases que são normalmente secretadas para ou além da superfície da célula bacteriana, produção de citotoxinas (como o fator necrosante citotóxico – CNF e a alfa-hemolisina - Hly) e expressão de estruturas ou moléculas de escape do hospedeiro (cápsulas e lipopolissacárides) (RUSSO e JOHNSON, 2000; ANTÃO *et al.*, 2009). JOHNSON e cols (2003) propôs, como definição operacional, que uma amostra seria definida como típica *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) se possuísse ao menos 2 dos seguintes fatores de virulência: fímbria P (fímbria associada a pielonefrite codificada pelo gene *papC*), adesina fimbrial (*sfaS*), adesina da família das adesinas Afa/Dr (*afa/dra*), receptor da ferri-aerobactina (*iutA*) e cápsula tipo II (*kpsM II*). Estes 5 marcadores de virulência foram identificados como preditivos em análises estatísticas da tipagem de virulência e a partir dos resultados de 3 coleções de amostras de *E. coli* dentro das quais a categoria ExPEC poderia ser inferida sobre as bases da origem epidemiológica. Essa definição foi útil para localizar amostras de ExPEC nos vários nichos e hospedeiros facilitando estudos epidemiológicos.

### **1. 3. Resistência a antimicrobianos**

#### **1. 3. 1. Produção de $\beta$ -lactamase**

A produção de  $\beta$ -lactamase caracteriza o mecanismo de maior frequência e relevância descrita em amostras de *E. coli*. Inicialmente, o desenvolvimento de cefalosporina de espectro ampliado no final da década de 80 foi resguardado como um importante arsenal terapêutico na luta contra a

resistência bacteriana mediada pela produção de  $\beta$ -lactamase (BUSH, 2002; MEDEIROS, 1997). De forma lamentável, a emergência de *E. coli* e *K. pneumoniae* resistentes a ceftazidima e outras cefalosporinas comprometeram seriamente a atividade e potência destes antibióticos (PEREZ *et al.*, 2007).

As  $\beta$ -lactamases são enzimas que catalisam a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, impossibilitando assim a sua atividade antimicrobiana (LIVERMORE, 1995). Em geral, vários membros da família das  $\beta$ -lactamases são capazes de hidrolisar as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens. Dessa forma, a interação entre estas enzimas e seus substratos resulta em compostos inativos que permitem a sobrevivência da célula bacteriana (BUSH, 2001). Entretanto, alguns fatores podem interferir na capacidade da  $\beta$ -lactamase em conferir resistência, entre os quais se destacam a quantidade de enzima produzida, a habilidade da enzima em hidrolisar o antimicrobiano e a velocidade com que o  $\beta$ -lactâmico penetra pela membrana celular externa (LIVERMORE, 1991).

As  $\beta$ -lactamases são produzidas por inúmeras espécies bacterianas, porém com diversidades estruturais e localizações diferentes. Nas bactérias Gram-positivas, as  $\beta$ -lactamases são, em sua maioria, induzíveis e excretadas para o meio extracelular, aonde acontece hidrólise do composto  $\beta$ -lactâmico antes que este se ligue a Proteína Ligadora de Penicilina (PBP) na membrana celular. Dessa forma, irão apresentar uma atividade menor que as  $\beta$ -lactamases produzidas pelas bactérias Gram-negativas. Nestas bactérias, as  $\beta$ -lactamases encontram-se estrategicamente situadas no espaço periplasmático, podendo alcançar maiores concentrações e agir de modo mais eficaz sobre os

$\beta$ -lactâmicos que estão atravessando este espaço para atingir as PBP (BUSH *et al.*, 1995).

A síntese das  $\beta$ -lactamases pode ser cromossômica ou mediada por plasmídeos e transposons, podendo ser induzidas tanto pela presença de  $\beta$ -lactâmicos, como de dipeptídeo D-Ala-D-Ala precursor de peptidoglicano da parede celular (KONEMAN *et al.*, 2001).

Devido à grande diversidade de tipos de  $\beta$ -lactamases, três diferentes tentativas de estabelecer um sistema de classificação para estas enzimas foram propostos ao longo dos anos (BRADFORD, 2001). O primeiro esquema foi sugerido por RICHMOND e SYKES (1973) e foi baseado no perfil do substrato das enzimas e na localização do gene codificador das mesmas (RICHMOND e SYKES, 1973; BRADFORD, 2001). Atualmente, dois esquemas de classificação têm sido considerados como de maior importância. A classificação de AMBLER, desenvolvida em 1980, foi baseada nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos das enzimas e somente quatro classes moleculares de  $\beta$ -lactamases foram descritas: A) produção da enzima  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado (ESBL), penicilinas e carbenicilinas, B) metalo-beta-lactamase; C) cefalosporinas cromossomais; e D) oxacilinas (AMBLER, 1980). Em 1995, BUSH, JACOBY e MEDEIROS propuseram um esquema baseado nas propriedades bioquímicas, estrutura molecular e sequência nucleotídica das enzimas, combinando as características estruturais e funcionais das  $\beta$ -lactamases, classificando-as em grupos funcionais (BUSH *et al.*, 1995).

As ESBL representam o maior grupo de  $\beta$ -lactamases estudadas atualmente (BRADFORD, 2001; BUSH *et al.*, 1995; GNIADKOWSKI, 2008).

Descritas inicialmente em *K. pneumoniae* e *E. coli*, as ESBL encontram-se disseminadas entre as espécies das enterobactérias, sendo encontradas também em *Pseudomonas aeruginosa* (BRADFORD, 2001). São enzimas capazes de hidrolisar todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos com exceção das cefamicinas (cefoxitina, cefotetan) e dos carbapenens (imipenem, meropenem) e, são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. Pertencem à classe molecular A de AMBLER (1980) e estão distribuídas no grupo 2 de BUSH, JACOBY e MEDEIROS (1995). As ESBL apresentam uma serina no sítio ativo e são codificadas por genes localizados em plasmídeos que podem também codificar resistência aos aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol e trimetoprim/sulfametoxazol (ROSSOLINI *et al.*, 2008; WINOKUR *et al.*, 2001).

### **1. 3. 1. 1. Produção de $\beta$ -lactamase TEM**

A descrição da primeira  $\beta$ -lactamase, denominada TEM-1 (subgrupo 2b) ocorreu em 1960. Esta enzima foi encontrada em uma amostra clínica de *E. coli* isolada da corrente sanguínea de uma jovem paciente grega chamada Temoniera, origem da sigla da  $\beta$ -lactamase TEM (TURNER, 2005). Atualmente é responsável por mais de 90% da resistência a ampicilina em amostras de *E. coli*, sendo também responsável pela resistência à ampicilina e penicilina em amostras de *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (PATERSON e BONOMO, 2005; LIVERMORE, 2008). A  $\beta$ -lactamase TEM-1 é codificada por genes localizados, usualmente, em elementos genéticos móveis, plasmídeos e transposons, que por meio de uma série de eventos de transposição e rearranjos, migram para diferentes plasmídeos. Devido à grande facilidade de

disseminação, esta enzima tem sido descrita em diversas espécies de enterobactérias e em outras espécies bacterianas (PATERSON e BONOMO, 2005).

A  $\beta$ -lactamase TEM-2 foi a primeira derivada da TEM-1 e, apesar de ter sofrido alteração de um aminoácido e, conseqüentemente, uma alteração em seu ponto isoelétrico de 5,4 para 5,6, não apresentou modificação no perfil do substrato (BARTHELEMY *et al.*, 1985; BRADFORD, 2001). A  $\beta$ -lactamase TEM-3 (subgrupo 2be) reportada em 1988 foi a primeira a apresentar o fenótipo ESBL (SOUGAKOFF *et al.*, 1988). Atualmente existem mais de 160 derivados de TEM (<http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp>) sendo algumas resistentes aos inibidores de  $\beta$ -lactamase e a grande maioria apresenta o fenótipo ESBL (BRADFORD, 2001). Embora essas  $\beta$ -lactamases sejam mais frequentemente relatadas em *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* e *Salmonella* spp. (BONNET *et al.*, 1999; MARCHANDIN *et al.*, 1999; MOROSINI *et al.*, 1995; PALZKILL *et al.*, 1995; PERILLI *et al.*, 2000; TESSIER *et al.*, 1998), têm sido também, reportadas entre bactérias Gram-negativas não *Enterobacteriaceae*.

### **1. 3. 1. 2. Produção de $\beta$ -lactamase SHV**

A maioria das ESBL do tipo SHV é encontrada em amostras de *K. pneumoniae*. Contudo, essas enzimas são encontradas em *Citrobacter diversus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (BRADFORD, 2001). A  $\beta$ -lactamase SHV-1 é comumente encontrada em *E. coli* e é responsável por até 20% da resistência a ampicilina mediada por plasmídeos nessa espécie (TURNER, 2005). A

denominação da sigla SHV vem de uma propriedade bioquímica da enzima variável sulfidril (sulphydryl variable) (TZOUVELEKIS e BONOMO, 1999). Neste gene, o fenótipo ESBL é caracterizado a partir de substituições de aminoácidos que ocorrem no gene *bla*<sub>SHV-1</sub>, e estas alterações assemelham-se ao que acontecem com as ESBL do tipo TEM (HULETSKY *et al.*, 1993). Desde 1982, quando a ceftazidima foi disponibilizada para o uso clínico, até o momento, foram descritas mais de 140 variantes da  $\beta$ -lactamase da classe SHV (<http://www.lahey.org/Studies/webt.asp#SHV>). Os genes do tipo *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> possuem propriedades bioquímicas parecidas, conservando, assim, um grau de similaridade entre si. A diferença estrutural entre estas enzimas é discreta, e está relacionada com mudanças de aminoácidos junto ao sítio ativo da enzima (BRADFORD, 2001). Entretanto, as ESBL do tipo CTX-M apresentam apenas 40% de similaridade com as  $\beta$ -lactamases TEM e SHV (TZOUVELEKIS e BONOMO, 1999). Estas  $\beta$ -lactamases são codificadas por genes, *bla*<sub>CTX-M</sub>, localizados em plasmídeos, os quais normalmente abrigam outros genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos, ao cloranfenicol, às sulfonamidas, ao trimetoprim e à tetraciclina. De acordo com o relato de HUMENIUK (2002), acredita-se que a  $\beta$ -lactamase do tipo CTX-M foi originada a partir da enzima cromossômica AmpC de *Kluyvera ascorbata*, devido ao seu alto grau de homologia.

### 1. 3. 1. 3. Produção de $\beta$ -lactamase CTX-M

Os primeiros casos de infecções causadas por isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de CTX-M foram relatados no final dos anos 80 no

Japão, Europa e Argentina. Desde então, essas enzimas vêm se disseminando mundialmente em diferentes gêneros de enterobactérias (BONNET, 2004; ROSSOLINI *et al.*, 2008). Estas  $\beta$ -lactamases têm a propriedade de conferir resistência a todas as cefalosporinas de espectro ampliado, porém apresentam como substrato preferencial a cefotaxima e a ceftriaxona. Contudo, é descrito na literatura, a ocorrência de  $\beta$ -lactamase do tipo CTX-M com maior atividade hidrolítica contra a ceftazidima do que a cefotaxima. Esse achado pode ser justificado devido ao uso intensivo de ceftazidima na prática médica (BONNET, 2004; CARTELLE *et al.*, 2004; ROSSOLINI *et al.*, 2008). Atualmente, encontram-se descritos na literatura mais de 80 tipos de CTX-M diferentes (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). As variantes alélicas de CTX-M estão agrupadas em seis diferentes grupos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25, CTX-M-45) e cada grupo é representado pelo tipo da  $\beta$ -lactamase CTX-M que foi descrito pela primeira vez (ROSSOLINI *et al.*, 2008). As enzimas pertencentes ao mesmo grupo diferem uma das outras por apenas um, ou por pouquíssimos aminoácidos. A ES $\beta$ L CTX-M-15 difere da CTX-M-3, pertencentes ao grupo CTX-M-1, pela simples substituição do ácido aspártico na posição 240 para o aminoácido glicina (Asp240 - Gly). Esta substituição aumenta a atividade hidrolítica contra ceftazidima, que não é conhecida como o substrato preferencial para as ES $\beta$ L do tipo CTX-M (POIREL *et al.*, 2002).

No início da década de 1990, a  $\beta$ -lactamase CTX-M-2 disseminou-se rapidamente na Argentina e em países vizinhos (ROSSOLINI *et al.*, 2008). Outros membros da família CTX-M estão distribuídos em diversos lugares do mundo; CTX-M-9 e CTX-M-14 predominantemente na Ásia e na Espanha (MUNDAY *et al.*, 2004; HERNANDEZ *et al.*, 2005), CTX-M-3 e CTX-M-15 na

Europa. No Brasil, BONNET e cols (2000 e 2001) descreveram novas enzimas ESBL CTX-M produzidas por diferentes amostras da família das *Enterobacteriaceae*. Em *E. coli*, CTX-M-2 foi encontrada tanto em amostras isoladas de frango (WARREN *et al.*, 2008) como de humanos (MINARINI *et al.*, 2007) e CTX-M-9 e -16 foram isoladas de humanos (BONNET *et al.*, 2001). Durante os últimos 15 anos, estas enzimas já foram relatadas em quase todas as partes do mundo (ROSSOLINI *et al.*, 2008) e, em algumas regiões, superam a incidência das clássicas ESBL dos tipos TEM e SHV (POURNARAS *et al.*, 2004; YAN *et al.*, 2006). A disseminação da  $\beta$ -lactamase do tipo CTX-M está causando importantes e imprevisíveis mudanças na epidemiologia da resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (ROSSOLINI *et al.*, 2008).

#### **1. 3. 1. 4. Produção de $\beta$ -lactamase OXA**

As  $\beta$ -lactamases do tipo OXA não apresentam similaridade genética com as ESBL (TEM e SHV), pertencem ao grupo 2d de BUSH (1995) e a classe molecular D de AMBLER (1980). São encontradas com maior frequência em cepas de *P. aeruginosa* do que em cepas de enterobactérias. Conferem resistência à ampicilina, à cefalotina e apresentam alta atividade hidrolítica contra a oxacilina e cloxacilina, fato que deu origem ao nome do grupo. São fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, com exceção da OXA 18 (BRADFORD, 2001; PHILIPPON *et al.*, 1997).

As  $\beta$ -lactamases OXA-11, OXA-13, OXA-14, OXA-16 e OXA-19 diferem da OXA-10 por apenas um, dois ou até nove aminoácidos. Diferente da maioria das ESBL do tipo OXA, a  $\beta$ -lactamase OXA-17 confere maior nível de

resistência à cefoxitina e ceftriaxona, do que à ceftazidima (DANEL *et al.*, 1999). Atualmente, encontra-se descrito na literatura mais de 140 tipos diferentes de OXA (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). Muitos dos mais recentes membros da família de  $\beta$ -lactamase do tipo OXA não são classificados como ESBL e incluem OXA-20 (NAAS *et al.*, 1998), OXA-22 (NORDMANN *et al.*, 2000), OXA-24 (BOU *et al.*, 2000), OXA-25, -26 e -27 (AFZAL-SHAH *et al.*, 2001) e OXA-30 (SIU *et al.*, 2000). Estas enzimas foram caracterizadas em amostras bacterianas isoladas na Turquia e na França, apesar desse fato não caracterizar esses países como prováveis focos dessas enzimas (BRADFORD, 2001). DUBOIS e cols (2003) descreveram um isolado clínico de *E. coli* que foi mais resistente a cefepima do que à ceftazidima devido a uma enzima derivada de OXA-1, a OXA-30.

Outras variantes de ESBL também já foram descritas em diferentes organismos como: BES (*Serratia marcescens*), FEC-1 (*E. coli*), CME-1 (*Cryseobacterium meningosepticum*), PER (5 variantes, *P. aeruginosa* e *Salmonella enterica*), SFO (*E. cloaceae*), TLA (*E. coli*) e VEB (7 variantes, *E. coli*), sendo pouco frequentes (BRADFORD, 2001).

### **1. 3. 2. Resistência às quinolonas/fluoroquinolonas**

A descoberta acidental de um subproduto da síntese da cloroquina, levou à síntese do ácido nalidíxico, o precursor de uma classe de antimicrobianos denominada quinolonas (LESHER *et al.*, 1962). Nos anos 70, outras quinolonas, como o ácido oxolínico e a cinoxacina, foram sintetizadas. Porém, nesse mesmo período, a síntese do ácido pipemídico representou um

importante avanço no campo das quinolonas. Modificações realizadas na estrutura molecular do ácido pipemídico, levaram à síntese da norfloxacinina nos anos 80, o primeiro composto pertencente ao grupo das fluoroquinolonas (BRYSKIER e CHANTOT, 1995).

As fluoroquinolonas são mais potentes e apresentam maior espectro de ação que as antigas quinolonas, pois a introdução do flúor levou a um aumento da afinidade de ligação à DNA-girase, além de facilitar a penetração desses agentes na célula bacteriana (DOMAGALA *et al.*, 1986).

A bactéria adquire resistência às quinolonas/fluoroquinolonas através de mutações espontâneas em genes cromossômicos. Estas mutações levam a uma alteração no sítio de ação, alvo das quinolonas, como DNA girase e topoisomerase IV e/ou superexpressão das bombas de efluxo (HOOPER, 2000; HOOPER, 2001).

Durante muito tempo, acreditava-se que a resistência às quinolonas fosse somente mediada por genes cromossômicos. Porém, a descrição de um plasmídeo, pMG252, presente em uma amostra de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL, isolada na urina de um paciente hospitalizado no Centro Médico da Universidade de Alabama, Birmingham, EUA, em 1998, mudou esse conceito (MARTINEZ-MARTINEZ *et al.*, 1998). Somente quatro anos após a identificação do pMG252, foi identificado o gene *qnr* responsável por esse mecanismo de resistência (TRAN e JACOBY, 2002). CASTANHEIRA e cols (2007) isolaram uma *E. coli* produtora de QnrA da urina de uma mulher de 80 anos que estava hospitalizada em um hospital de Porto Alegre. Esse isolado mostrou resistência a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, a todas quinolonas testadas, estreptomicina e a cloranfenicol.

---

---

## 1. 4. Integron

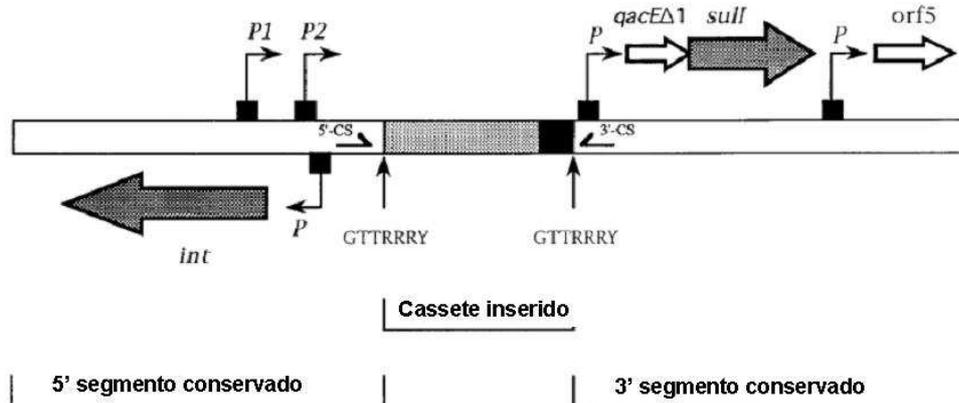
A rápida disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos é consequência da transferência de genes de resistência entre bactérias da mesma espécie ou interespecies por plasmídeos e transposons. Um terceiro mecanismo de disseminação de genes de resistência encontrados em isolados clínicos tanto em bactérias Gram-negativas (FLUIT e SCHMITZ, 1999) como em bactérias Gram-positivas (NEŠVERA *et al.*, 1998) pode estar contido em integrons (STOKES e HALL, 1989).

A grande maioria dos integrons encontrados em isolados clínicos tanto de animais (BASS *et al.*, 1999; SANCHEZ *et al.*, 2002; GUERRA *et al.*, 2006) como de humanos (CHIEW *et al.*, 1998; KANG *et al.*, 2005) pertence à classe 1 e está comumente associado a discretos elementos móveis conhecidos como cassetes gênicos que codificam genes de resistência (HALL e STOKES, 1993; ARAKAWA *et al.*, 1995; MAZEL *et al.*, 1998; HOCHHUT *et al.*, 2001). Os integrons de classes distintas apresentam diferentes sequências de nucleotídeos no gene da integrase, mas mantêm similar região conservada 3' (SÁENZ *et al.*, 2004).

Os integrons de classe 1 são elementos genéticos constituídos por um segmento conservado 5' (5' - SC), formada por um gene *int1*, uma região promotora e um sítio de recombinação (*att1*) e outro segmento conservado 3' (3' - SC) (Figura 1). Esse último segmento contém os genes truncados *qacEΔ1* (PAULSEN *et al.*, 1993) e *sul1* (STOKES e HALL, 1989; SUNDSTRÖM *et al.*, 1988) que codificam resistência a brometo de etídio e compostos de amônio quaternário, e sulfonamida, respectivamente, e fase de leitura aberta (ORF),

como *orf5* (STOKES e HALL, 1989) e *orf6* (BENNETT, 1999) de funções desconhecidas.

Figura 1. Estrutura do integron



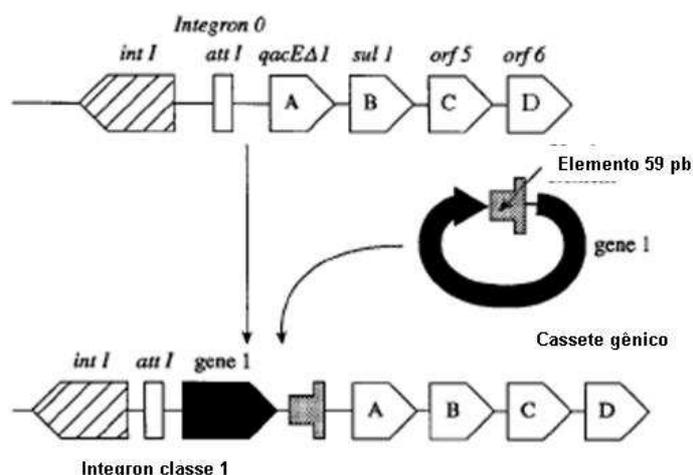
P, P1 e P2, promotores; *qacEΔ1*, gene que codifica resistência ao composto amônio quaternário; *sul*, gene que codifica sulfonamida; *orf*, fase de leitura aberta; *int*, gene que codifica o gene da integrase, CS, sequência conservada.

À montante do *int1*, integrons apresentam uma região promotora, a qual é responsável pela expressão dos cassetes gênicos inseridos entre os 5'-SC e 3'-SC (PARTRIDGE *et al.*, 2002). Essa região é formada por um promotor denominado P<sub>1</sub> e alguns integrons de classe 1 podem apresentar um segundo promotor, jusante de P<sub>1</sub> (Figura 2). Experimentos evidenciaram que a expressão dá-se de forma mais eficiente à medida que o cassete gênico encontra-se mais próximo à região promotora. Sendo assim, genes localizados nas primeiras posições serão efetivamente melhores expressos (COLLIS e HALL, 1995).

A integrase, enzima codificada pelo *int1*, é uma recombinase sítio específico e possui como substrato preferencial dois sítios de ação, um no cassete gênico (*attC*) e outro no receptor do cassete gênico (*attI1*), localizado

no integron (COLLIS e HALL, 1995; PARTRIDGE *et al.*, 2000). Cada cassette gênico consiste do gene e de uma sequência, conhecida como elemento de 59 pb, que atua como um sítio de recombinação específica ao *attI* do integron (Figura 2). A maioria dos cassetes gênicos perde seu próprio promotor, e o integron fornece o promotor responsável pela expressão de genes codificados pelos cassetes (BROWN *et al.*, 1996). Apesar das diferenças nas sequências das integrases e do sítio *att*, o mesmo cassette parece ser capaz de se inserir nas diferentes classes de integrons. O mesmo cassette gênico foi encontrado em integrons classe 1 e classe 2 (HALL *et al.*, 1991; SUNDSTRÖM e SKÖLF, 1990) ou em classe 1 e classe 3 (ARAKAWA *et al.*, 1995). Novos cassetes são continuamente descobertos e aproximadamente 70 cassetes gênicos que conferem resistência a agentes antimicrobianos já foram identificados (SUNDE, 2005).

Figura 2. Estrutura do integron e cassette gênico



*int*, gene que codifica o gene da integrase; *att*, receptor do cassette gênico; *qacEΔ1*, gene que codifica resistência ao composto amônio quaternário; *sul*, gene que codifica sulfonamida; orf, fase de leitura aberta; pb, pares de base.

Integrans foram primeiramente encontrados em espécies bacterianas Gram-negativas pertencentes aos gêneros da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* (SALLEN *et al.*, 1995; HALL 1997), mas somente no trabalho de SALLEN e cols (1995) estudou-se o conteúdo deles.

O uso intensivo de antimicrobianos tem levado a bactéria desenvolver mecanismos de resistência contra drogas terapêuticas. Estudos têm sugerido uma possível participação de integrans e plasmídeos conjugativos na disseminação de genes conferindo resistência a antimicrobianos em *E. coli* comensal à *E. coli* patogênicas (NAGACHINTA e CHEN, 2009). Além disso, uma alta prevalência de integrans foi detectada em *E. coli* fecais de humanos saudáveis demonstrando que indivíduos na comunidade poderiam ser um reservatório de integrans contidos em isolados de *E. coli* (VINUÉ *et al.*, 2008).

### **1. 5. Transferência de determinantes de resistência bacteriana**

A emergência de isolados de *E. coli* de origem humana, animal e alimentar com fenótipo de múltipla resistência (resistência a 3 ou a mais classes de antimicrobianos) é considerada um sério problema de Saúde Pública.

A transferência de determinantes de resistência por elementos genéticos móveis é um importante fator que pode contribuir para o aumento da multiresistência bacteriana. Para o melhor entendimento epidemiológico das amostras de *E. coli* vários estudos foram realizados. LÉVESQUE e cols (1995) ao analisarem amostras das famílias das *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* resistentes a aminoglicosídeos identificou 4 cassetes gênicos inseridos na

região variável de uma amostra clínica de *E. coli*. A presença de 2 ou mais genes de resistência a aminoglicosídeos sugeriu a presença de integrons de multiresistência.

CHANG e cols (2000), ao estudarem 104 isolados clínicos de *E. coli* encontrou integrons classe 1 em 51% delas. A maioria (61%) dos integrons encontrados continha os cassetes gênicos *dfr12*, *orfF* e *aadA2* conferindo resistência a trimetoprim, *orfF* (função desconhecida) e resistência a aminoglicosídeos, respectivamente. Este padrão foi também reportado em isolados de *E. coli* de infecção urinária na Turquia (HEIKKILÄ *et al.*, 1993) e Suécia (GRAPE *et al.*, 2005), em amostras de *Shigella* sp isoladas na Finlândia, mas originalmente da Ásia (HEIKKILÄ *et al.*, 1993) e em amostras clínicas multiresistentes de *E. coli* não patogênicas (SÁENZ *et al.*, 2004). CHANG (2000) revelou a presença de um integron carregando dois novos cassetes gênicos, *dfr17* e *aadA4*. Estes cassetes foram primeiramente encontrados em isolados de *E. coli* de infecção urinária na Austrália (WHITE *et al.*, 2000) e o mesmo cassete *aadA* (embora designado A5) foi encontrado em uma amostra de *E. coli* de suíno na Dinamarca (SANDVANG, 1999). Estes resultados revelam que os mesmos cassetes podem estar disseminados em diferentes espécies bacterianas, em diferentes hospedeiros e em diferentes áreas geográficas.

Inicialmente, amostras de *E. coli* O157:H7 eram sensíveis a muitos agentes antimicrobianos, no entanto estudos têm documentado um aumento na taxa de resistência nessas bactérias. Amostras de STEC não-O157, isoladas do homem e de animais também desenvolvem resistência a antimicrobianos, sendo que várias amostras são inclusive multiresistentes a antimicrobianos

comumente utilizados na medicina veterinária e humana (MENG *et al.*, 1998; ZHAO *et al.*, 2001; WHITE *et al.*, 2002; KHAN *et al.*, 2002; FLUIT e SCHMITZ, 2004).

Acredita-se que certos sorotipos de STEC estejam mais associados à resistência a antimicrobianos do que outros (MORABITO *et al.*, 2002; SINGH *et al.*, 2005). GUERRA e cols (2006) ao estudarem amostras de *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111 observaram que as amostras exibiam um amplo repertório de elementos móveis para sustentar a pressão seletiva. Para amostras de STEC O111, assim como O157, O118 e O26 entre outros, o gado é o principal reservatório e o padrão de resistência encontrado nas amostras relatadas está de acordo com o uso veterinário.

ZHAO e cols (2001) foi o primeiro grupo de pesquisadores a reportar integrons e cassetes gênicos em amostras de STEC de origem humana, animal e de alimentos pertencentes a sorogrupos O157 e não O157. O segundo trabalho molecular sobre genes de resistência encontrou uma prevalência de integrons nos sorogrupos O26 e O111 de diferentes origens e a maioria dos integron apresentava cassetes gênicos *aadA1* conferindo resistência a estreptomicina/espectinomicina, sozinho ou associado ao cassete gênico *drfA1*, o qual confere resistência a trimetoprim (MORABITO *et al.*, 2002). Resistência à estreptomicina dá-se por causa do seu uso entre as décadas de 1950 e 1970; e hoje ainda é usado no tratamento da tuberculose e de uso veterinário (WHITE *et al.*, 2000). NAGACHINTA e CHEN (2008) determinaram que genes de resistência a estreptomicina e sulfametoxazol mediados por integrons podem ser transferidos de amostras de STEC pertencentes aos sorotipos

O157:H7 e O111:H8 à amostra de *E. coli* K-12 sensível a antimicrobianos em meios como água da chuva e fezes de bovinos.

Foram descritas também três amostras de EHEC produtoras de ESBL, duas do sorotipo O26:H11 e uma pertencente ao sorotipo O157:H7. As amostras O26:H11 eram produtoras de ESBL-CTX-M-3 e ESBL-CTX-M-18 (KON *et al.*, 2005; ISHII *et al.*, 2005, respectivamente). A amostra O157:H7 resistente a estreptomicina, espectinomicina, trimetoprim/sulfametoxazol, ampicilina e tetraciclina foi isolada de um dos membros de uma família japonesa (AHMED *et al.*, 2005). A amostra apresentava integron classe 1, cassetes gênicos *dfr1* e *aadA1* e um gene  $\beta$  lactamase-TEM-1, justificando a resistência a ampicilina.

## **1. 6. Custo biológico bacteriano na aquisição e expressão de genes de resistência e/ou virulência**

Entre os isolados clínicos humanos de *E. coli*, resistência a antimicrobianos está associada com diminuição de virulência (JOHNSON *et al.*, 1988).

É aceito que, tanto na ausência da pressão seletiva por drogas, como na aquisição e expressão de genes de resistência haverá um custo adaptativo sobre a bactéria hospedeira. A aquisição de um gene de resistência é um benefício para a bactéria, mas haverá um custo biológico. A diminuição do *fitness* competitivo levará a menor replicação e conseqüentemente a menor virulência bacteriana. Acredita-se que o custo biológico em adquirir e expressar um gene de resistência surja porque a resistência pode comprometer funções

metabólicas vitais devido a mutações em genes essenciais alvos de antimicrobianos. Os genes de resistência podem estar em plasmídeos que contenham genes que permitem a sua seleção na ausência de pressão seletiva por antimicrobianos (ALONSO *et al.*, 2001). Retirando-se a pressão seletiva, o número de bactérias resistentes cairá e o número de bactérias sensíveis será maior. Portanto, as bactérias resistentes estarão em desvantagem (ANDERSSON e LEVIN, 1999; BJÖRKMAN e ANDERSSON, 2000; ANDERSSON, 2003).

O custo biológico desempenha um papel vital na determinação de um mutante resistente em aparecer e se disseminar dentro de uma população bacteriana. Isto é particularmente pertinente para a bexiga e sistema urinário que segue uma sequência de enchimento e esvaziamento, onde um uropatógeno tem que crescer rápido o suficiente para manter-se nas vias urinárias e não ser eliminado pela micção. Isto pode ser matematicamente modelado, onde a taxa de crescimento necessária para a manutenção bacteriana na bexiga é referido por GORDON-RILEY (1992).

Um problema clínico surge quando bactérias sensíveis declinam, permitindo que bactérias resistentes presentes na microflora se sobressaiam (LEVY, 2001). O agente antimicrobiano pode ser um importante fator de impacto para o surgimento da resistência bacteriana. Quando a droga é usada na dosagem correta por curto período, a emergência de bactérias resistentes é menor (GUILLEMOT, 1998). A prevalência da resistência pode persistir por causa da presença de genes de resistência a drogas já em desuso por estarem truncados a outros cassetes gênicos presentes em integrons. Bactérias isoladas de suínos ainda apresentam resistência ao cloranfenicol, mesmo

proibido desde meados de 1980 aos animais no Reino Unido (BISCHOFF *et al.*, 2005). Outro exemplo é quanto às sulfonamidas, que mesmo usadas clinicamente no Reino Unido com menor frequência desde a década de 90, a análise de plasmídeos que contém genes de resistência às sulfonamidas mostrou que, em muitos casos temos plasmídeos de multiresistência com genes que conferem resistência a outros antimicrobianos que ainda estão sendo muito usados na clínica (ENNE, 2001).

Situação semelhante pode ocorrer quando um mesmo plasmídeo contém tanto genes de resistência como genes de virulência (MARTÍNEZ e BAQUERO, 1988). Os plasmídeos de resistência são frequentemente encontrados nas bactérias patogênicas. MARTÍNEZ e BAQUERO (2002) ao analisarem o sequenciamento de plasmídeos de virulência observaram também a presença de genes de resistência. A presença de genes de resistência e virulência no mesmo elemento genético permite a co-seleção de ambos determinantes em situação não infectiva, mas na presença de antimicrobianos, o determinante de resistência permite a seleção do fator de virulência, enquanto em uma situação de infecção, a presença do fator de virulência garante a manutenção do plasmídeo e por tanto dos genes de resistência a antimicrobianos, inclusive na ausência de pressão seletiva. Estes são os dois elementos-chave na evolução da resistência e virulência bacteriana (LINARES-RODRÍGUEZ e MARTÍNEZ-MENÉNDEZ, 2005).

As bactérias podem tornar-se resistentes a antimicrobianos, quer por mutação quer por aquisição de genes de resistência. A maioria dos estudos sobre o custo biológico da resistência a antimicrobianos concentra-se sobre a resistência adquirida por mutação de genes cromossomais (BJORKMAN e

ANDERSON, 2000) como, por exemplo, a resistência a estreptomicina adquirida por mutação em *rpoB* (ENNE *et al.*, 2004; REYNOLDS, 2000; WICHELHAUS *et al.*, 2002). Poucos estudos examinaram o *fitness cost* associado a genes de resistência adquiridos, seja plasmidial, seja por transposons. ENNE e cols (2005) observaram que o *fitness cost* imposto pela aquisição natural de elementos de resistência por *E. coli* selvagem é baixo tanto *in vitro* como *in vivo*, sugerindo que uma vez estabelecida, a resistência pode ser difícil de ser eliminada pela redução somente da prescrição do antimicrobiano. É verdade também que o custo biológico pode ser compensado, usualmente sem perda da resistência, por mutações secundárias durante a evolução compensatória que restaura o *fitness*, inteiramente ou em parte (BOUMA e LENSKI, 1988; SCHRAG *et al.*, 1997; BJORKMAN e ANDERSON, 2000; DAHLBERG e LIN, 2003).

Embora terapia antimicrobiana seja uma importante ferramenta para as infecções causadas por *E. coli* extraintestinais uma estreita relação existe entre o uso de agentes antimicrobianos na veterinária no tratamento de infecções de animais e o alto nível de resistência observado tanto nas amostras de STEC como nas *E. coli* extraintestinais (AARESTRUP e WEGENER, 1999; ZHAO *et al.*, 2001; WHITE *et al.*, 2002).

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

- ◆ Caracterizar fenotípica e genotipicamente a resistência a antimicrobianos em patotipos de *Escherichia coli* associados a infecções intestinais e extraintestinais.
- ◆ Analisar a diversidade genética dos diferentes patotipos de *Escherichia coli* estudados.
- ◆ Determinar o custo biológico “*fitness cost*” na aquisição de genes de resistência e virulência.

### **3. RESULTADOS**

---

---

### 3. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram a redação de três manuscritos envolvendo distintos patótipos de *Escherichia coli* resistentes a antimicrobianos: *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* isoladas de sítios extraintestinais.

ARTIGO 1. **MARIA CECILIA CERGOLE-NOVELLA**, BEATRIZ ERNESTINA CABILIO GUTH, MARIANA CASTANHEIRA, MIRIAN S. CARMO, ANTONIO CARLOS CAMPOS PIGNATARI. First description of *bla*<sub>CTX-M-14</sub>- and *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *Microbial Drug Resistance* **(Submetido para publicação)**

ARTIGO 2. **MARIA CECILIA CERGOLE-NOVELLA**, ANTONIO CARLOS CAMPOS PIGNATARI, MARIANA CASTANHEIRA, BEATRIZ ERNESTINA CABILIO GUTH. Class 1 integron and molecular typing of antimicrobial-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC) in Brazil. *Research in Microbiology* **(Submetido para publicação)**

ARTIGO 3. **MARIA CECILIA CERGOLE-NOVELLA**, ANTONIO CARLOS CAMPOS PIGNATARI, BEATRIZ ERNESTINA CABILIO GUTH, VIRVE IRENE ENNE. Determinação do custo biológico “*fitness cost*” na aquisição de genes de resistência e virulência em patótipos de *Escherichia coli* associados a infecções intestinais e extraintestinais. **(Manuscrito em preparação)**

### **3. RESULTADOS - ARTIGO 1**

ARTIGO 1. **MARIA CECILIA CERGOLE-NOVELLA**, BEATRIZ ERNESTINA CABILIO GUTH, MARIANA CASTANHEIRA, MIRIAN SILVA DO CARMO, ANTONIO CARLOS CAMPOS PIGNATARI. First description of *bla*<sub>CTX-M-14</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> producing *E. coli* isolates in Brazil. *Microbial Drug Resistance* (Submetido para publicação)

O presente artigo estudou 12 amostras de *Escherichia coli* isoladas de sítios extraintestinais, exceto uma delas isolada de diarreia. Nove *E. coli* extraintestinais foram isoladas da corrente sanguínea de pacientes admitidos em um hospital geral privado na cidade de São Paulo, durante 4 meses em 2006. Uma amostra de *E. coli* isolada da secreção traqueal de um paciente em 2006, no mesmo hospital e durante o mesmo período, mostrando multiresistência a antimicrobianos, foi incluída neste estudo. Foram também estudadas mais uma amostra de *E. coli* isolada de bacteremia e outra isolada das fezes diarreicas isoladas no mesmo dia de um paciente com infecção intestinal admitido em 2005 no mesmo hospital e mostrando multiresistência a antimicrobianos.

O presente estudo relatou a presença de multiresistência a antimicrobianos nas amostras de *E. coli*, presença de integrons inseridos em plasmídeos, agrupamento filogenético, análise de polimorfismo de fragmentos de restrição separados por eletroforese em campo pulsado (PFGE). Pela primeira vez no Brasil foram identificadas amostras de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de terceira geração carreadoras de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado do tipo CTX-M-14 e CTX-M-15. Duas amostras de *E. coli* carreadoras de *bla*<sub>CTX</sub>, isoladas das fezes diarreicas e da corrente sanguínea do mesmo paciente, no mesmo dia, mostraram ser a mesma amostra quanto aos perfis de resistência e virulência, e apresentaram 93,3% de similaridade genética através da análise por PFGE.

**First description of *bla*<sub>CTX-M-14</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> producing *Escherichia coli* isolates in Brazil**

Maria Cecilia Cergole-Novella,<sup>1,2</sup> Beatriz E. C. Guth,<sup>2</sup> Mariana Castanheira,<sup>3</sup>  
Mirian S. Carmo,<sup>1</sup> Antonio C. C. Pignatari<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>, Infectious Disease Division, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal de São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>, JMI Laboratories, North Liberty, IA, USA

Running title: Antimicrobial resistant extraintestinal *E. coli*

\*Corresponding author. Mailing address: Infectious Disease Division, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil. Rua Leandro Dupret, 188. CEP 04025-010, Vila Clementino, São Paulo, Brasil. Phone: (11) 5081-2965 Fax: (11) 5081-2819. E-mail: [pignatari@terra.com.br](mailto:pignatari@terra.com.br)

**Abstract**

We evaluated the antimicrobial resistance patterns and molecular characteristics of 11 extraintestinal *Escherichia coli* strains and one intestinal *E. coli* from human infections collected in Brazil. Two *E. coli* strains were non-susceptible to extended spectrum cephalosporins (cefotaxime, ceftazidime and cefepime), one isolated from diarrhea carried *bla*<sub>CTX-M-14</sub> and *bla*<sub>TEM-1</sub> whereas the other, isolated from tracheal secretion, carried *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *bla*<sub>OXA-1</sub>. Five *E. coli* strains showed resistance to quinolones. Integrase associated with class 1 integron (*intI1*) was detected in 8 of the 12 *E. coli* strains belonging to various serotypes and this gene was carried by plasmids showing similar size. PFGE showed that *E. coli* strains were genetically diverse and phylogenetic grouping showed that the *E. coli* strains belonged to groups A, B2 and D (33.3%), respectively. This is the first report of *E. coli* isolates carrying *bla*<sub>CTX-M-14</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in Brazil. The presence of mobile elements containing antimicrobial resistance genes is worrisome since it could promote the dissemination of resistance and lead to the acquisition of resistance to other antimicrobials agents such as the carbapenems.

Key words: Extraintestinal *Escherichia coli*, resistance genes, class 1 integron, phylogenetic background.

No. of words: 174

## Introduction

*Escherichia coli* is an important cause of disease in animals and humans worldwide. *E. coli* strains can be classified into three major groups: commensal, intestinal pathogenic, and extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains. The ExPEC pathotype is responsible for a wide variety of community and hospital acquired extraintestinal infections and can involve almost any organ or anatomical site.<sup>37</sup> The virulence potential of extraintestinal *E. coli* is determined by the presence of virulence factors (VFs). Johnson<sup>19</sup> has proposed that a strain would be defined as typical ExPEC if it possesses at least two of the following VFs: P fimbriae (pyelonephritis-associated pilus encoded by the *papC* gene cluster), fimbrial adhesins (*sfaS*), adhesins from the Afa/Dr family of adhesins (*afa/dra*), ferri-aerobactin receptor (*iutA*), and type II capsule synthesis (*kpsMT II*), which participate in the pathogenesis of the pathotype. These 5 virulence markers were identified as independently predictive of ExPEC status by statistical analyses of virulence typing results from 3 bacterial collections within which ExPEC status could be inferred on the basis of epidemiological source (e.g., symptomatic infection vs. fecal, or observed extraintestinal virulence in experimental animals). This definition has been very useful to localize ExPEC strains in the various niches and hosts facilitating the epidemiological studies.

The use of antimicrobial agents has caused bacteria to develop resistance mechanisms against therapeutic drugs. Studies suggested a role of integrons and conjugative plasmids in dissemination of genes conferring resistance to antibiotics from pathogenic to generic *E. coli* cells.<sup>31</sup> Further, a high prevalence of integrons was detected in faecal *E. coli* of healthy humans demonstrating that individuals in the community could be a reservoir of

integron-containing *E. coli* isolates.<sup>41</sup> Previous studies focusing on the impact of *E. coli* resistance concerned essentially on extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing strains and more recently resistance to fluoroquinolones.<sup>22,23</sup> Most ESBL consist of three main genotypes based on sequence and structure: CTX-M, TEM, SHV and that are commonly found in many members of the Enterobacteriaceae family.<sup>33</sup>

Among human clinical *E. coli* isolates, resistance to antimicrobial compounds is associated with decreased virulence, phylogenetic groups other than virulence-associated group B2, and immunocompromised host.<sup>20</sup> Phylogenetic analyses have shown that *E. coli* strains fall into four main phylogenetic groups (A, B1, B2, and D) and previous studies have also given us a better understanding of how pathogenic strains acquire virulence genes.<sup>9,18,35</sup>

This study aims to identify genetic elements responsible for the antimicrobial resistant and class 1 integron that can potentially be responsible for the mobilization of genes in *E. coli* isolated in Brazil.

## **Materials and Methods**

### *Bacterial strains*

Nine extraintestinal *E. coli* strains were isolated from bloodstream of patients admitted to a private General Hospital in the city of São Paulo, Brazil, during 4 months in 2006. One extraintestinal *E. coli* isolated from tracheal secretion of a patient at the same hospital in 2006 at the same period of time, showing multiresistance to antimicrobials, was included in the study. One additional extraintestinal *E. coli* was isolated from a bloodculture at the same day from a patient admitted to the same hospital with intestinal infection (feces strain) showing antimicrobial multiresistance in 2005.

All *E. coli* strains were serotyped for their somatic antigen (O) and flagellar antigen (H) according to standard methods using antisera O1 to O181 and H1 to H56, from Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.<sup>14</sup> Infections were primarily classified as nosocomial or community acquired, in accordance with the classic Centers for Disease Control and Prevention (CDC) criteria.

#### *Antimicrobial susceptibility and ESBL screening test*

Susceptibility testing was performed for nalidixic acid (NAL), ampicillin (AMP), kanamycin (KAN), cefepime (CEF), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CFZ), ciprofloxacin (CIP), chloramphenicol (CHLO), streptomycin (STR), gentamicin (GEN), trimethoprim-sulfamethoxazole (SUT) and, tetracycline (TET) by agar dilution method and interpretative criteria according to the Clinical and Laboratory Standard Institute guidelines (CLSI<sup>10</sup>). ESBL screening test was performed using Etest strips of cefotaxime with and without clavulanic acid (AB Biodisk, Solna, Sweden) according to the manufacturer's recommendations.

#### *PCR analysis and DNA sequencing of bla<sub>CTX-M</sub> and bla<sub>TEM</sub>*

The presence of mobile elements, virulence and resistance markers were assayed by PCR (Table 1).

Amplicons were sequenced on both strands. Nucleotide and deduced amino acid sequences were analyzed using the Lasergene software package (DNASTAR, Madison, WI) and compared with sequences available through the internet using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

#### *Plasmid profiles and Southern blot hybridization assays*

Plasmid DNA was extracted by Birnboim and Doly<sup>3</sup> alkaline lysis method and analysed by electrophoresis in agarose gels. Further, Southern Blot hybridization assays with *int11*-specific probe were also performed.

#### *Phylogenetic grouping*

Triplex PCR reactions were performed with specific primers. Each combination of *chuA*, *yjaA* gene and DNA fragment TSPE4.C2 amplifications allowed the phylogenetic group determination according to Clermont<sup>9</sup> (Table 1).

#### *Pulsed-field gel electrophoresis typing (PFGE) analysis of isolates*

PFGE analysis was done as described by Gautom<sup>15</sup>, with some modifications. The digestion time was extended to 16 h, and PFGE was performed on a CHEF-DRIII PFGE apparatus (Bio-Rad). The pulse time was increased from 5 to 50 s over a 19 h period. The band patterns were analyzed by the BioNumerics program version 5.1, Applied Maths, and the similarity between PFGE patterns was evaluated using the Dice coefficient similarity (tolerance, 1.5%).

### **Results and Discussion**

In this study we evaluated antimicrobial resistance patterns and molecular characteristics of *E. coli* strains mainly implicated in extraintestinal infections. The virulence potential of extraintestinal *E. coli* is largely determined by the presence of virulence factors. Alarming progressive increases have been documented in both the incidence of ExPEC<sup>27,38</sup> and the prevalence of antimicrobial resistance.<sup>11,21</sup> The presence of antimicrobial resistance genes in

these isolates could jeopardize treatment if administration of appropriate antimicrobial therapy were delayed.<sup>25</sup>

According to Johnson<sup>19</sup>, four of the 12 (33.3%) *E. coli* strains studied in the present study possessed at least two virulence factors, classifying these strains as typical ExPEC. Aerobactin, P fimbriae and Group II capsular synthesis system genes were observed in 50%, 16.7% and 41.7% of *E. coli*, respectively (Table 2).

The phylogenetic grouping showed that groups A, B2 and D (33.3%), respectively were observed among the *E. coli* isolates studied. Three extraintestinal *E. coli* strains were isolated from patients with urinary tract infection, belonging to phylogenetic group B2, and belonging to O1, O4, and O6 serogroups (Table 2). According to Johnson<sup>17</sup> related O antigens associated with urinary tract infection included O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18, O25, and O75. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strain CFT073 (O6:K2:H1) was isolated from the blood and urine of a hospitalized patient with acute pyelonephritis.<sup>29</sup> The O6 clonal group is documented as one of the most frequent causes of UPEC infection.<sup>17,42</sup> Phylogenetic grouping have shown that *E. coli* strains from various collections or isolates belong mainly to group B2 and, to a lesser extent, to group D, whereas most commensal strains belong to group A.<sup>9</sup> Duriez<sup>13</sup> compared 168 commensal strains of *E. coli* with 118 ExPEC strains and confirmed that the strains of phylogenetic group B2 are more frequent among extraintestinal pathogenic strains (72%) than among commensal strains (11%).

PFGE analysis revealed that most *E. coli* strains were genetically unrelated, and were not grouped in any cluster with significant similarity ( $\geq 80\%$ ),

except for *E. coli* 34 (feces) and 35 (bloodculture) strains (Figure 1), isolated at the same day from the same patient, and that presented PFGE patterns with similarity of 93.3%. Moreover, these two isolates presented identical serotype, phylogenetic group, and antimicrobial susceptibility profile (Table 2).

Elevated resistance rates were noted for streptomycin (91.7%), tetracycline (75%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (66.7%). Resistance to ampicillin (58.3%) was also identified and three *E. coli* strains showed resistance to extended spectrum cephalosporins (Table 2). One of them displayed MIC values of >128 µg/mL and >32 µg/mL for cefotaxime and ceftazidime and two presented MIC of >32µg/mL and 4µg/mL, respectively. Further, five extraintestinal *E. coli* showed resistance to the quinolones nalidixic acid and ciprofloxacin (≥32 µg/mL and ≥64 µg/mL, respectively). Multiresistance (resistance to ≥3 antimicrobial groups) was observed in 8 of 12 (66.7%) of the strains analyzed. Five of the eight multiresistant *E. coli* strains were community acquired (Table 2). Maynard<sup>26</sup> reported that animal and human ExPEC isolates exhibited multiresistance profiles. Many studies suggest a possible link between resistance and virulence.<sup>27,38</sup> However, our findings argue against a direct link between virulence traits and antimicrobial resistance in the *E. coli* strains presently studied since resistance to antimicrobial compounds was associated with decreased virulence (Table 2). The acquisition of a resistance gene is a benefit for the bacteria, however, it often presents as a biological cost (fitness cost) to the cell. The decrease in competitive fitness could lead to lower reproductive ability and consequently much less bacterial virulence.<sup>1,2,4</sup>

ESBL-production was detected among 16.7% of the *E. coli* strains and the presence of *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, and *bla*<sub>SHV</sub> was evaluated using PCR methods (Table 1). Seven *E. coli* strains showed resistance to ampicillin and three of them showed also resistance to extended spectrum cephalosporins. *E. coli* 34 carried *bla*<sub>CTX-M-14</sub> and strain 36 carried *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. The strain carrying *bla*<sub>CTX-M-14</sub> also presented *bla*<sub>TEM-1</sub> whereas the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> producing strain harbored *bla*<sub>OXA-1</sub> (Table 2). Additionally, two ampicillin-resistant isolates harbored *bla*<sub>TEM</sub> and all *E. coli* strains were negative for *bla*<sub>SHV</sub>. TEM-1 is the most commonly encountered  $\beta$ -lactamase in gram-negative bacteria.<sup>7</sup> Up to 90% of ampicillin resistance in *E. coli* is due to the production of TEM-1.<sup>24</sup> Pallechi (2007)<sup>32</sup> reported *bla*<sub>TEM</sub> in 80 of the 81 ampicillin-resistant *E. coli* isolates in Bolivia. Three extraintestinal *E. coli* strains studied belonged to ONT:HNM serotype, phylogenetic group A and one of them produced *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Further, similar to our study, Blanco<sup>5</sup> also found that one CTX-M-14-producing ExPEC isolate belonged to phylogenetic group D, O102:H6 serotype, and was negative to virulence markers very frequently associated with virulent ExPEC.

The prevalence of CTX-M-producing strains is elevated in several countries. However, reports are limited in Brazil. CTX-M-2, -9 and -16-producing *E. coli* were described<sup>6,28,43</sup>, however this present study is the first report of CTX-M-14 and CTX-M-15 in *E. coli* isolates.

Resistance genes can be associated with mobile DNA plasmids, transposons, and integrons, which are known to facilitate their distribution.<sup>16,40</sup> Maynard<sup>26</sup> studying 39 ExPEC strains observed that approximately one-third of the ExPEC isolates possessed a class 1 integron. Cocchi<sup>11</sup> detected integrons in 48 (40%) clinical and commensal *E. coli* strains isolated in Switzerland from

humans and from companion and farm animals. Our study demonstrates that eight of the 12 (63.6%) *E. coli* strains belonging to different serotypes carried class 1 integrons (Table 2). We observed also *E. coli* strains carrying *int1* on plasmid bands of high molecular weights (Figure 2B).

All *E. coli* strains presented plasmid bands suggesting the presence of plasmids of high molecular weight (> 15 kb) and two of them also presented plasmid bands of low molecular weight (< 15 kb) (Figure 2A). Most of the *int1*-positive isolates carried similar plasmid profiles. Southern blot hybridization assays with *int1*-specific probe indicated that *int1* was located on plasmids in six out of the eight *E. coli* strains (Figure 2B).

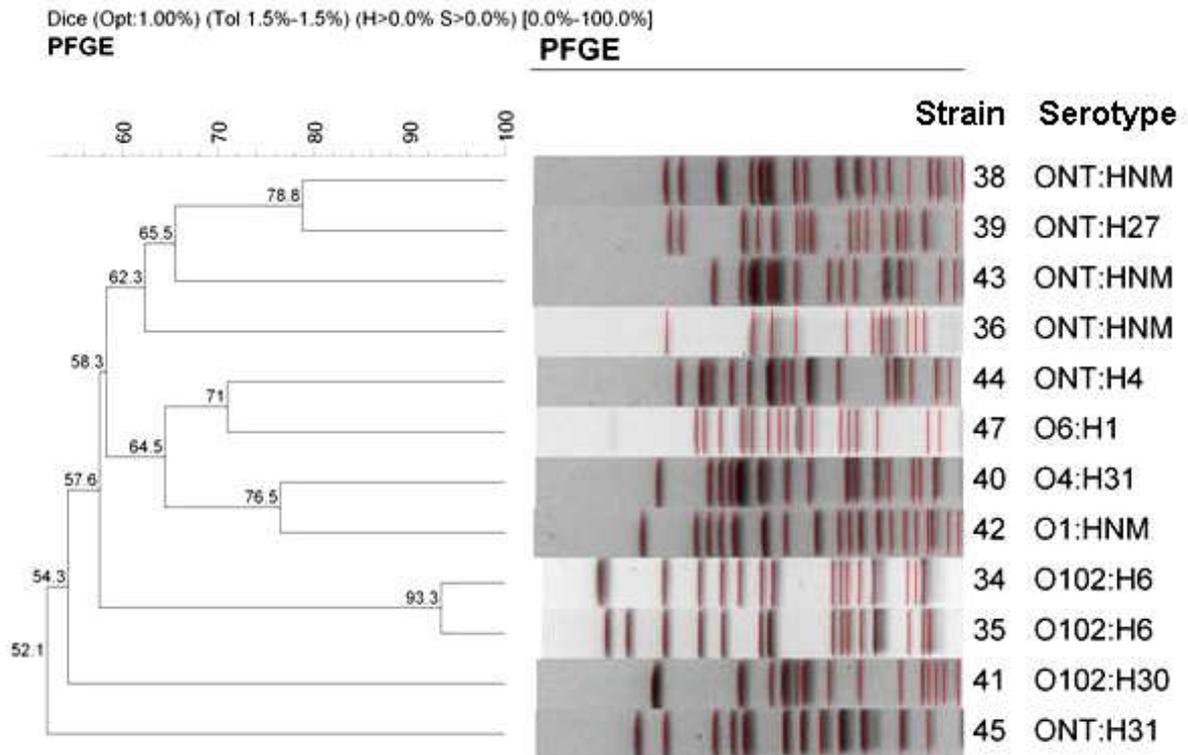
This study reports the molecular characterization of antimicrobial resistance and identifies mobile genetic elements responsible for the transmission of resistant genes in *E. coli* isolated in Brazil. The results are worrisome considering the probable acquisition of resistance to other antimicrobials, such as carbapenems by *E. coli*. The emergence of carbapenem resistant *E. coli* producing CMY-2-type AmpC  $\beta$ -lactamase in Brazil has been recently described<sup>34</sup> highlighting the need of surveillance initiatives for *E. coli* strains in clinical microbiology laboratories.

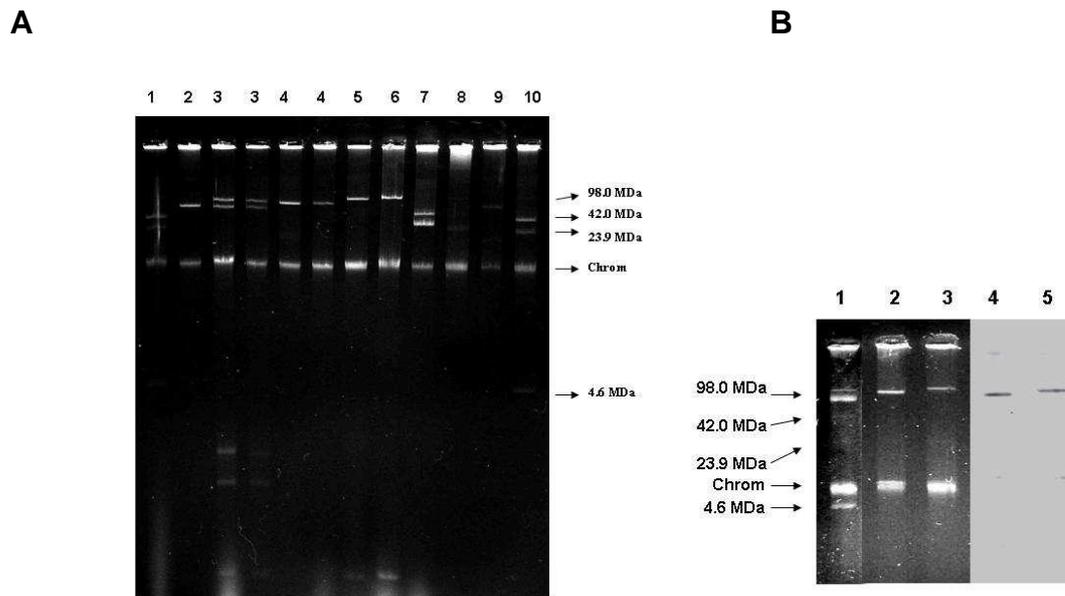
TABLE 1. PRIMERS AND PCR CONDITIONS

Gene	Target	Primers	Annealing temperature (°C)	Reference
<i>int1</i>	Class 1 integrase	5' GTT CGG TCA AGG TTC TGG 3' 5' GTA GAG ACG TCG GAA TGG 3'	67	This study
<i>int1/qacEΔ1</i>	Integron classe 1	5' GCC GTA GAA GAA CAG CAA GG 3' 5' CGG ATG TTG CGA TTA CTT CG 3'	52	Castanheira <i>et al.</i> , 2004 <sup>8</sup>
<i>afa</i>	Afimbrial adhesin	5' GGC AGA GGG CCG GCA ACA GGC 3' 5' CCC GTA ACG CGC CAG CAT CTC 3'	65	Jonshon and Stell, 2000 <sup>18</sup>
<i>kpsMTII</i>	Group II capsular synthesis system	5' GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG 3' 5' CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAG CA 3'	63	Jonshon and Stell, 2000 <sup>18</sup>
<i>papC</i>	P fimbriae	5' GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G 3' 5' ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A 3'	55	Moulin-Schouleur <i>et al.</i> , 2006 <sup>30</sup>
<i>iutA1</i>	Aerobactin receptor	5' ATG AGC ATA TCT CCG GAC G 3' 5' CAG GTC GAA GAA CAT CTG G 3'	55	Moulin-Schouleur <i>et al.</i> , 2006 <sup>30</sup>
<i>sfaS</i>	S fimbriae	5' GTG GAT ACG ACG ATT ACT GTG 3' 5' CCG CCA GCA TTC CCT GTA TTC 3'	55	Jonshon and Stell, 2000 <sup>18</sup>
<i>chuA</i>	Gene required for Heme Transport In O157:H7 <i>E. coli</i>	5' GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT 3' 5' TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA 3'	59	Clermont <i>et al.</i> , 2000 <sup>9</sup>
<i>yjaA</i>	Identified in <i>E. coli</i> K-12, function unknown	5' TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG 3' 5' ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC 3'	59	Clermont <i>et al.</i> , 2000 <sup>9</sup>
<i>tspe4C2</i>	Anonymous DNA fragment	5' GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA 3' 5' CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG 3'	59	Clermont <i>et al.</i> , 2000 <sup>9</sup>
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	CTX-M ESBL	5' GAC TAT TCA TGT TGT TGT TAT TTC 3' 5' TTA CAA ACC GTT GGT GAC G 3'	55	This study
<i>bla<sub>CTX-M-14</sub></i>	CTX-M-14 ESBL	5' GGTGACAAAGAGAGTGCAACGGAT 3' 5' TTACAGCCCTTCGGCGATGA 3'	53	This study
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	SHV ESBL	5' GGTTATGCGTTATATTCGCC 3' 5' TTAGCGTTGCCAGTGCTC 3'	55	Rasheed <i>et al.</i> , 1997 <sup>36</sup>
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	TEM ESBL	5' ATGAGTATTCAACATTTCCG 3' 5' CTGACAGTTACCAATGCTTA 3'	55	Rasheed <i>et al.</i> , 1997 <sup>36</sup>
<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	OXA-1 ESBL	5' ACA CAA TAC ATA TCA ACT TCG C 3' 5' AGT GTG TTT AGA ATG GTG ATC 3'	52	Steward <i>et al.</i> , 2001 <sup>39</sup>

ESBL, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase.

**FIGURE 1. DENDROGRAM OUTLINING THE RELATIONSHIP OF *Escherichia coli* STRAINS**





**FIGURE. 2.** Plasmid profiles of *Escherichia coli* strains carrying *int1* (A). Lanes 1 and 10, 39R861, *E. coli* strain carrying plasmids of known molecular sizes; lines 2 to 9, *E. coli* 41, 44, 44, 47, 47, 35, 34, 39, 40, and 36. Representative Southern blot hybridization assay with *int1*-specific probe (B). Line 1, 39R861, *E. coli* strain carrying plasmids of known molecular sizes; lines 2 and 3, plasmid profiles *E. coli* 47 and 35; line 4 and 5, hybridization assay with *int1*-specific probe *E. coli* 47 and 35.

TABLE 2. VIRULENCE CHARACTERISTICS OF *Escherichia coli* STRAINS

<i>E. coli</i> strains <sup>A</sup>	Nosocomial Infection	Clinical Diagnostic	Serotype <sup>C</sup>	<i>int1</i>	Antimicrobial susceptibility <sup>D</sup>	<i>bla</i>	Virulence markers	Phylogenetic group
34/35	No	Acute Gastroenterocoliti	O102:H6	+	AMP, CTX, CIP, NAL, CHLO, STR, GEN, KAN, SUT, TET	TEM <sup>E</sup> -1, CTX-M <sup>F</sup> -14	-	D
36	Yes	Pneumonia	ONT:HNM	+	AMP, CTX, CFZ, CEF <sup>E</sup> , CIP, NAL, STR, KAN, SUT, TET	OXA-1, CTX-M-15	-	A
38	Yes	Septic shock	ONT:HNM	-	STR	-	<i>iutA1</i>	A
39	No	Sepsis	ONT:H27	+	STR, SUT, TET	-	-	A
40	No	Urinary Tract Infection <sup>B</sup>	O4:H31	+	AMP, STR, SUT, TET	TEM	<i>iutA1</i> , <i>kpsMTII</i>	B2
41	No	Urinary Tract Infection	O102:H30	+	AMP, CIP, NAL, CHLO, STR, SUT, TET	-	<i>kpsMTII</i>	D
42	No	Urinary Tract Infection <sup>B</sup>	O1:HNM	-	STR	-	<i>iutA1</i> , <i>papC</i>	B2
43	No	Cholangitis	ONT:HNM	-	TET	-	<i>kpsMTII</i>	A
44	Yes	Urinary Tract Infection	ONT:H4	+	AMP, CIP, NAL, STR, SUT, TET	TEM	<i>iutA1</i>	B2
45	Yes	Urinary Tract Infection <sup>B</sup>	ONT:H31	-	STR, SUT, TET	-	<i>iutA1</i> , <i>kpsMTII</i>	D
47	No	Urinary Tract Infection <sup>B</sup>	O6:H1	+	AMP, STR	-	<i>iutA1</i> , <i>papC</i> , <i>kpsMTII</i>	B2

<sup>A</sup>, *E. coli* 34 (feces) and 35 (bloodculture) were isolated at the same day from the same patient, *E. coli* 36 (tracheal secretion), and all the remaining strains were isolated from bloodcultures; <sup>B</sup>, According to Johnson<sup>19</sup>, strains defined as typical ExPEC for the presence of  $\geq 2$  virulence factors, including *papC*, *sfaS*, *afa*, *iutA*, *kpsMTII*; <sup>C</sup>, NT, non typable with O1 and O181 antisera; NM, non motile; <sup>D</sup>, nalidixic acid (NAL), ampicillin (AMP), kanamicin (KAN), cefepime (CEF), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CFZ), ciprofloxacin (CIP), chloramphenicol (CHLO), streptomycin (STR), gentamicin (GEN), trimethoprim-sulfamethoxazole (SUT) and, tetracycline (TET); <sup>E</sup>, Intermediate resistance; <sup>F</sup>, DNA sequencing was not done for *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> of *E. coli* 35 strain.

## Acknowledgment

We gratefully acknowledge the assistance of Anna Carolina Kockskroh and Fernanda Marques Castrucci with the dendrogram analysis, and Fábía A. Salvador for helpful assistance with the plasmid extraction. This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX MCT/CNPq/FAPERJ) (to BECG).

## References

1. **Andersson, D.I., and B.R. Levin.** 1999. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:489-493.
2. **Andersson, D.I.** 2003. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:452-456.
3. **Birnboim, H.C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
4. **Björkman, J., and D.I. Andersson.** 2000. The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug Resist Updat.* **3**:237-245.
5. **Blanco, M., M.P. Alonso, M.H. Nicolas-Chanoine, G. Dahbi, A. Mora, J.E. Blanco, C. López, P. Cortés, M. Llagostera, V. Leflon-Guibout, B. Puentes, R. Mamani, A. Herrera, M.A. Coira, F. García-Garrote, J.M. Pita, and J. Blanco.** 2009. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Lugo (Spain):

- dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. J. Antimicrob. Chemother. **63**:1135-1141.
6. **Bonnet, R., C. Dutour, J.L.M. Sampaio, C. Chanal, D. Sirot, R. Labia, C. De Champs, and J. Sirot.** 2001. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-2403Gly. Antimicrob. Agents and Chemother. **45**:2269-2275.
  7. **Bradford, P.A.** 2001. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. **14 (4)**:933-951.
  8. **Castanheira, M., M.A. Toleman, R.N. Jones, F.J. Schmidt, and T. R. Walsh.** 2004. Molecular Characterization of a  $\beta$ -Lactamase Gene, blaGIM-1, Encoding a New Subclass of Metallo- $\beta$ -Lactamase. Antimicrob Agents Chemother. **48**: 4654-4661.
  9. **Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen.** 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Applied and Environmental Microbiol. **66**:4555–4558.
  10. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. CLSI document M100–S16. CLSI, Wayne, PA
  11. **Cocchi, S., G. Elena, G. Michaela, B. Cinzia, C. Maruska, and P. Jean-Claude.** 2007. Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin FEMS Immunol. Med. Microbiol. **50**:126-132.
  12. **Diekema, D.J., B.J. BootsMiller, T.E. Vaughn, R.F. Woolson, J.W. Yankey, E.J. Ernst, S.D. Flach, M.M. Ward, C.L. Franciscus, M.A.**

- Pfaller, and B.N. Doebbeling.** 2004. Antimicrobial resistance trends and outbreak frequency in United States hospitals. *Clin. Infect Dis.* **38**:78-85.
- 13. Duriez, P., O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, A. Chaventre, J. Elion, B. Picard, and E. Denamur.** 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiol.* **147**:1671-1676.
- 14. Ewing, W.H.** 1986. Edwards & Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*. 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Science publishers, New York, NY.
- 15. Gautom, R.K.** 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2877-2980.
- 16. Jacoby, G.A.** 1994. Extrachromosomal resistance in gram-negative organisms: the evolution of beta-lactamase. *Trends Microbiol.* **2**:357-360.
- 17. Johnson, J.R.** 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**:80-128.
- 18. Johnson, J.R., and 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.
- 19. Johnson, J.R., M.A. Kuskowski, K. Owens, A. Gajewski, and P.L. Winokur.** 2003. Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extend-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. *J. Infect. Dis.* **188**:759-768.
- 20. Johnson, J.R., S. Moseley, P. Roberts, and W.E. Stamm.** 1988. Aerobactin and other virulence factor genes among strains of

- Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. *Infect. Immun.* **56**:405-412.
- 21. Lautenbach, E., B.L. Strom, I. Nachamkin, W.B. Bilker, A.M. Marr, L.A. Larosa, and N.O. Fishman.** 2004. Longitudinal trends in fluoroquinolone resistance among *Enterobacteriaceae* isolates from inpatients and outpatients, 1989–2000: differences in the emergence and epidemiology of resistance across organisms. *Clin. Infect Dis.* **38**:655-662.
- 22. Lautenbach, E., J.B. Patel, W.B. Bilker, P.H. Edelstein, and N.O. Fishman.** 2001. Extended spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin. Infect. Dis.* **32**:1162-1171.
- 23. Lautenbach, E., J.P. Metlay, W.B. Bilker, P.H. Edelstein, and N.O. Fishman.** 2005. Association between fluoroquinolone resistance and mortality in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* infections: the role of inadequate empirical antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* **4**:923-929.
- 24. Livermore, D.M.** 1995.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:557-584.
- 25. MacArthur, R.D., M. Miller, T. Albertson, E. Panacek, D. Johnson, L. Teoh, and W. Barchuk.** 2004. Adequacy of early empiric antibiotic treatment and survival in severe sepsis: experience from the MONARCS trial. *Clin. Infect Dis.* **38**:284-288.
- 26. Maynard, C., S. Bekal, F. Sanschagrín, R.C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Larivière, and J. Harel.** 2004. Heterogeneity

- among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. J. Clin. Microbiol. **42**:5444-5452.
- 27. McBean, M., and S. Rajamani.** 2001. Increasing rates of hospitalization due to septicemia in the US elderly population. J. Infect Dis. **183**:596-603.
- 28. Minarini, L.A.R., I.L.B.C. Camargo, A. Pitondo-Silva, and A.L.C. Darini.** 2007. Multilocus sequence typing of uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* isolated in a Brazilian community. Curr Microbiol. **55**:524-529.
- 29. Mobley, H.L., D.M. Green, A.L. Trifillis, D.E. Johnson, G.R. Chippendale, C.V. Lockett, B.D. Jones, and J.W. Warren.** 1990. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. Infect. Immun. **58**:1281-1289.
- 30. Moulin-Schouleur, M.; C. Schouler, P. Tailliez, M. R. Kao, A. Bre´e, P. Germon, E. Oswald, J. Mainil, M. Blanco, and J. Blanco.** 2006. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. J. Clin. Microbiol. **44** (10):3484–3492.
- 31. Nagachinta, S., and J. Chen.** 2009. Integron-mediated antibiotic resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Food Prot. **72**:21-27.
- 32. Pallecchi, L., C. Lucchetti, A. Bartoloni, F. Bartalesi, A. Mantella, H. Gamboa, A. Carattoli, F. Paradisi, and G.M. Rossolini.** 2007. Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria

- from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **51(4)**:1179–1184.
33. **Paterson, D.L., and R.A. Bonomo.** 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**:657-686.
34. **Pavez, M., P. Neves, M. Dropa, M.H. Matté, R.S. Grinbaum, M.R.E. Araújo, E.M. Mamizuka, and N. Lincopan.** 2008. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC beta-lactamase in Brazil. *J. Med. Microbiol.* **57**:1590-1592.
35. **Picard, B., J.S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahimi, E. Bingen, J. Elion, and E. Denamur.** 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* **67**:546-553.
36. **Rasheed, J. K., C. Jay, B. Metchock, F. Berkowitz, L. Weigel, J. Crellin, C. Steward, B. Hill, A.A. Medeiros, and F.C. Tenover.** 1997. Evolution of extended-spectrum  $\beta$ -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **41(3)**:647–653.
37. **Russo, T.A., and J.R. Johnson.** 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect Dis.* **181**:1753-1754.
38. **Russo, T.A., and J.R. Johnson.** 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: an overlooked epidemic. *Microbes Infect.* **5**:449-456.
39. **Steward, C.D., J.K. Rasheed, S.K. Hubert, J.W. Biddle, P.M. Raney, G.J. Anderson, P.P. Williams, K.L. Brittain, A. Oliver, J.E.Jr.**

- McGowan, and F.C. Tenover.** 2001. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum  $\beta$ -lactamase detection methods. *J. Microbiol.* **39**: 2864-2872.
- 40. Tenover, F.C., and J.K. Rasheed.** 1998. Genetic methods for detecting antimicrobial and antiviral resistance genes. *In* P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed., American Society for Microbiology Publishers, Washington, D.C. 1578-1592.
- 41. Vinué, L., Y. Sáenz, S. Somalo, E. Escudero, M.A. Moreno, F. Ruiz-Larrea, and C. Torres.** 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.
- 42. Vosti, K.L.** 2002. Infections of the urinary tract in women: a prospective, longitudinal study of 235 women observed for 1-19 years. *Medicine (Baltimore)*. **81**:369-387
- 43. Warren, R.E., V.M. Ensor, P. O'Neill, V. Butler, J. Taylor, K. Nye, M. Harvey, D.M. Livermore, N. Woodford, and P.M. Hawkey.** 2008. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:504-508.

### **3. RESULTADOS - ARTIGO 2**

ARTIGO 2. **MARIA CECILIA CERGOLE-NOVELLA**, ANTONIO CARLOS CAMPOS PIGNATARI, MARIANA CASTANHEIRA, BEATRIZ ERNESTINA CABILIO GUTH. Class 1 integron and molecular typing of antimicrobial-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC) in Brazil. *Research in Microbiology* (**Submetido para publicação**)

O presente artigo estudou 21 amostras de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) isoladas de humanos com diarreia, 6 amostras isoladas de bovinos com diarreia e 5 amostras isoladas das fezes de bovinos saudáveis. Estas amostras de STEC resistentes a antimicrobianos foram isoladas no Brasil e eram pertencentes a diferentes sorotipos como O26:H11, O111:H8, O111:H11, O111:HNM, O118:H16, ONT:H2 e ONT:49 (CERGOLE-NOVELLA *et al.*, 2006; IRINO *et al.*, 2007; LEOMIL *et al.*, 2003; SALVADORI *et al.*, 2003; AIDAR-UGRINOVICH *et al.*, 2007).

O presente estudo relatou a presença de multiresistência a antimicrobianos nas amostras de STEC, presença de integrons inseridos em plasmídeos, agrupamento filogenético e análise de polimorfismo de fragmentos de restrição separados por eletroforese em campo pulsado (PFGE).

Este trabalho descreveu pela primeira vez integron classe 1 em amostras de STEC isoladas no Brasil. Adicionalmente, um mesmo integron com mesmo conteúdo genético foi encontrado em 4 das 32 amostras de STEC estudadas.

**Class 1 integron and molecular typing of antimicrobial-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC) in Brazil**

Maria Cecilia Cergole-Novella <sup>a,b</sup>, Antonio Carlos Campos Pignatari <sup>a</sup>, Mariana Castanheira <sup>c</sup>, Beatriz Ernestina Cabilio Guth <sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Infectious Disease Division, Universidade Federal de São Paulo, Sao Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal de Sao Paulo, Brazil

<sup>c</sup> JMI Laboratories, North Liberty, IA, USA

Running title: Antimicrobial resistant Shiga toxin-producing *E. coli*

\*Corresponding author. Rua Botucatu, 862, 3<sup>o</sup> andar, CEP 04023-062, São Paulo, Brazil. Phone: 55-11- 5083-2980 Fax: 55-11- 5572-4711.

E-mail address: [cecilia.cergole@unifesp.br](mailto:cecilia.cergole@unifesp.br) (M. C. Cergole-Novella), [pignatari@terra.com.br](mailto:pignatari@terra.com.br) (A. C. C. Pignatari), [mariana-castanheira@jmilabs.com](mailto:mariana-castanheira@jmilabs.com) (M. Castanheira), [bec.guth@unifesp.br](mailto:bec.guth@unifesp.br) (B. E. C. Guth)\*.

**Abstract**

The antimicrobial resistance patterns and molecular characteristics of thirty-two Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains previously identified in São Paulo State from human infections (n=21) and cattle feces (n=11) were studied. Antimicrobial susceptibility testing was performed for 12 compounds by agar dilution according to CLSI guidelines. The higher resistance rates were noted for tetracycline (100%), streptomycin (78%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (56%). Eleven STEC strains showed resistance to ampicillin and carried *bla*<sub>TEM</sub>. The class 1 integrase gene (*intI1*) was detected in seven (22%) strains, and most of them belonged to O111:H8 serotype. Analysis of *intI1* by PCR-RFLP revealed the same restriction profile in four human STEC strains, suggesting they harbor an identical class 1 integron. Southern blot hybridization assays with *intI1*-specific probe indicated that class 1 integron was located on plasmids in five out of the seven STEC strains. STEC were genetically classified in B1 group, and PFGE analysis showed that most of the strains among each serogroup were grouped in a same cluster (80% to 97% of similarity). Presence of class 1 integron and *bla*<sub>TEM</sub> genes was for the first time described among STEC isolates in Brazil and certainly represents a public health concern.

Keywords: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; resistance genes; class 1 integron; phylogenetic background.

No. of words: 194

## 1. Introduction

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are an important group of foodborne pathogens that cause a broad range of manifestations, including hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (Nataro and Kaper, 1998). STEC colonize the gastrointestinal tract of domestic and wild animals, but ruminants are regarded as the main natural reservoirs (Beutin *et al.*, 1993; Beutin *et al.*, 1997). Consumption of contaminated foods of animal origin is one of the major causes of STEC infection to humans (Cergole-Novella *et al.*, 2006). Although antimicrobial therapy is not the primary tool to treat infections caused by STEC, some reports indicate that antimicrobial resistance of STEC is on the rise (White *et al.*, 2002). Use of antimicrobial agents in the agricultural environment is believed to play a key role in dissemination of resistance genes among bacteria, and it has been suggested that overuse of antibiotics in animal husbandry creates a threat to human and veterinary medicine. Antimicrobial resistance determinants are carried mostly by mobile genetic elements such as plasmids, transposons, and integrons. In 2009, Nagachinta and Chen suggested a possible role of integrons and conjugative plasmids in dissemination of genes conferring resistance to antibiotics from pathogenic to generic *E. coli* cells.

A high prevalence of integrons was detected in faecal *E. coli* of healthy humans demonstrating that individuals in the community could be a reservoir of integron-containing *E. coli* isolates (Vinué *et al.*, 2008). Several studies have demonstrated that there is a clonal spread of resistant strains, transfer of resistance genes between human and animal bacteria, and also the share of

phylogenetic and genotypic similarities (Van Den Bogaard and Stobberingh, 2000). Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) have contributed to the recently-observed large increase resistance to beta-lactams. Many of the ESBLs arise from point mutations in genes that encode narrow-spectrum beta-lactamases, provided by plasmids such as TEM and SHV (Bradford, 2001). However, members of a newly-emerging ESBL group, CTX-M, derived from class A chromosomal beta-lactamases have been identified (Bonnet, 2004). In Japan in 2005, Kon *et al.* described a STEC O26:H11 strain resistant to cefotaxime and cefpodoxime (but not ceftazidime) producing CTX-M-3 type ESBL. Despite antimicrobial resistance in STEC has been the subject of several studies, informations on the molecular basis of antimicrobial resistance among this zoonotic group of bacteria is still limited (Guerra *et al.*, 2006; Lee, 2009; Nagachinta and Chen, 2009; Srinivasan *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2001). The aims of this study were to further characterize the antimicrobial resistance presented by several STEC strains isolated from human infections and the animal reservoir in Brazil, and evaluate their genetic relatedness.

## **2. Materials and methods**

### *2. 1. Bacterial strains*

A total of 32 antimicrobial-resistant STEC strains (Cergole-Novella *et al.*, 2006) belonging to non-O157 serotypes isolated in São Paulo, Brazil, were investigated in this study. Twenty-one STEC strains were isolated from humans with diarrhea (Guth *et al.*, 2002; Irino *et al.*, 2007; Vaz *et al.*, 2004), and 11 were

isolated from cattle (Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007; Irino *et al.*, 2005; Leomil *et al.*, 2003; Salvadori *et al.*, 2003).

## 2. 2. Antimicrobial susceptibility testing

Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by agar dilution of twelve antimicrobial agents according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007) guidelines. The antimicrobials tested were: nalidixic acid (Nal), ampicillin (Amp), kanamicin (Kan), cefepime (Cef), cefotaxime (Ctx), ceftazidime (Cfz), ciprofloxacin (Cip), chloramphenicol (Chlo), streptomycin (Str), gentamicin (Gen), trimethoprim-sulfamethoxazole (Sut) and tetracycline (Tet).

## 2. 3. PCR, PCR-RFLP and nucleotide sequencing of *intI1/qacEΔ1*

Presence of integrase associated with class 1 integron (*intI1*) (5' GTT CGG TCA AGG TTC TGG 3' and 5' GTA GAG ACG TCG GAA TGG 3'; 94 °C, 60 s; 67 °C, 60 s; 72 °C, 60 s; 35 cycles; 889 bp), *bla*<sub>TEM</sub> (Rasheed *et al.*, 1997), *intI1/qacEΔ1* (Castanheira *et al.*, 2004) were assayed by PCR. PCR-RFLP assay was carried out using specific primer sequences *intI1/qacEΔ1* followed by 3 hours of digestion with *HaeIII*. Sequencing reactions were performed with Qiaquick PCR Purification System (Quiagen) and kit "ABI PRISM Big Dye Cycle Sequencing Ready Reaction" (Perkin-Elmer, Applied Biosystems), and with sequencer ABI 3100 (Perkin-Elmer, Applied Biosystem).

#### 2. 4. *Plasmid profiles and Southern blot hybridization*

Occurrence of large plasmids was analyzed in agarose gels. After extraction of plasmid DNA by the alkaline lyses method (Birnboim and Doly, 1979) plasmid masses were estimated by using the GelCompar II system. 39R861 *E coli* strain, with known molecular size plasmid bands was used as the parameter for the analysis. Southern blot hybridization assays with *int1*-specific probe were performed and Amersham ECL Direct Nucleic Acid Labelling and detection Systems were used (GE Healthcare).

#### 2. 5. *Phylogenetic grouping and Pulsed-field gel electrophoresis typing (PFGE)*

Triplex PCR profiles specific for *E. coli* phylogenetic groups were performed with specific primers according to Clermont *et al.* (2000). The macrorestriction analysis of genomic DNA with XbaI described by Gautom *et al.* (1997) was used with some modifications for PFGE. The digestion time was extended to 16 h, and PFGE was performed on a CHEF-DRIII PFGE apparatus (Bio-Rad). The pulse time was increased from 5 to 50 s over a 19 h period. The band patterns were analyzed by using the Bionumerics, and the similarity between PFGE patterns was evaluated by using the Dice coefficient similarity (tolerance, 1.5%).

### **3. Results**

#### 3. 1. *Resistance profile to antimicrobial agents in STEC strains*

Twenty (62.5%) of 32 STEC isolates were resistant to three or more classes of antimicrobials (Table 1). The higher resistance rates were noted for tetracycline (100%), streptomycin (78.1%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (56.2%). But, resistance to ampicillin (34.4%) and kanamycin (37.5%) was also identified. The ten STEC strains resistant to ampicillin possessed *bla*<sub>TEM</sub> enzyme.

### 3. 2. Presence of *int1* gene in the STEC strains

The integrase associated with class 1 integron gene was found in 22% of STEC. Six human STEC strains that carry class 1 integron belonged to O111 serogroup and one bovine STEC strain belonged to O118 serogroup (Table 1). Analysis of integrons by PCR-RFLP revealed identical profiles in four of the seven STEC strains (Fig. 1). These four integrons had a uniform size and contained a single gene cassette *aadA1* (streptomycin resistance) in their variable region (*int1F* - *aadA1* - *qacEΔ1R*) as determined by nucleotide sequencing. Furthermore, these strains carried resistance to streptomycin and had high MICs ( $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ ).

### 3. 3. Plasmid profiles and Southern blot hybridization assays of STEC strains carrying *int1*

The plasmid profile analysis showed that all strains carrying *int1* presented 2 to 8 bands of high (>15 kb) and low (<15 kb) molecular weights.

Southern blot hybridization assays indicated that class 1 integron was located on plasmids in five out of the seven strains (Fig. 2A,2B). To elucidate if hybridization signal was detected in chromosomal DNA, genomic DNA incorporated in agarose plugs were digested with I-CeuI and DNA fragments were separated by PFGE (Shu-Lin *et al.*, 1993). Southern blot hybridization indicated that *intI1* was not located on chromosomal DNA (data not shown).

### 3. 4. *Phylogenetic grouping and PFGE*

Phylogenetic grouping classified all strains, except one O111:H8, in the B1 group (Table 1). The PFGE typing of O111 and O118 STEC strains showed a diversity of profiles (Fig. 3), but O111 STEC strains were grouped into 3 distinct clusters with more than 80% of similarity.

## 4. Discussion

Resistance genes can be associated with mobile DNA plasmids, transposons, and integrons, which are known to facilitate their distribution (Guerra *et al.*, 2006; Jacoby, 1994). In the present study almost 22% of STEC strains presenting resistance to antimicrobials possessed a class 1 integron constituting part only of plasmids (Fig. 2B), and most of these strains were isolated from human infections and belonged to O111 serogroup. This is the first description of class 1 integron among STEC strains isolated in Brazil. Zhao *et al.* (2001) found integron-associated antimicrobial resistance in STEC belonging to different serotypes, including O157:H7, which were isolated from

humans, animals, and food in the United States. Presence of multi-drug resistance, beta-lactamase and class 1 integron associated genes were also recently described in some STEC serotypes isolated from cattle faeces and soil samples in Ireland (Scott *et al.*, 2009). Furthermore, Nagachinta and Chen (2008) determined that integron-mediated streptomycin and sulfisoxazole resistance genes can be transferred from STEC strains belonging to serotypes O157:H7 and O111:H8 to a susceptible *E. coli* K-12 strain in storm water and bovine feces. Morabito *et al.* (2002) found integrons more frequently in strains belonging to serogroups O111 and O26 than in the O157 isolates.

The prevalence of the *aadA1* gene cassette among class1 integrons observed in the present study confirms previous observations (Martinez-Freijo *et al.*, 1998, 1999; Nagachinta and Chen, 2009). Moreover, integrons carrying the *aadA1* gene were widely spread among STEC strains isolated from humans, cattle, and food and belonging to serogroups O26 and O111 (Morabito *et al.*, 2002).

Similar antibiotic resistance patterns could be observed in some of the animal and human isolates presently studied. It is noteworthy that although ampicillin and sulfonamides are old antimicrobial compounds, they are still widely used. Although these antimicrobial agents are more commonly used for human therapy than for animal therapy, more animal isolates exhibited resistance (Maynard *et al.*, 2004). It was determined that the most frequent mechanism of ampicillin resistance was from a TEM-1 beta-lactamase. However, during the 1980s, novel TEM beta-lactamases emerged that were also capable of hydrolyzing extended-spectrum cephalosporins. The point mutations that caused this substrate expansion were almost certainly selected

in response to heavy usage of these antimicrobials. Since 1983, when the first extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) *bla*<sub>TEM</sub> allele was identified (Sirot *et al.*, 1987), several variants of *bla*<sub>TEM-1</sub> that differ in aminoacid sequence have been identified ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)). There are few studies in the literature describing the presence of beta-lactamase in STEC. Ahmed *et al.* (2005) and Ishii *et al.* (2005) reported for the first time a beta-lactamase TEM-1 gene in EHEC O157 and an ESBL CTX-M18-producing STEC isolate, respectively. Roest *et al.* (2007), reported the presence of beta-lactamase in *E. coli* O157 isolated from chicken. To best of our knowledge the presence of *bla*<sub>TEM</sub> gene in ampicillin-resistant STEC strains isolated from human infections has not been previously described in our settings.

Several PFGE profiles were identified among the O111 and the O118 isolates studied. However, most of the strains among each serogroup were grouped in a same cluster (80% to 97% of similarity), and were classified in the phylogenetic group B1. Interestingly, most of the O111 strains carrying *int1* were clustered into two subgroups that presented more than 90% of similarity. In relation to the O118:H16 STEC isolates, conclusions are more difficult to be drawn due to the low number of strains, but it was interesting to observe that the bovine strain with *int1* presented 80% of similarity with the human isolate. In addition, it should be mentioned that these two O118:H16 isolates were more distantly related (76.8%) to the multidrug-resistant O118:H16 STEC strain previously described in South America (Castro *et al.*, 2003).

Although antimicrobial therapy is generally not recommended for treatment of STEC infections in humans, the indirect selection of multiresistant strains may contribute to the increase of emerging, antimicrobial-resistant

pathogens, and facilitate the spread of mobile resistance elements to other bacteria. The presence of antimicrobial resistance genes among STEC strains is worrisome, and certainly may play a significant role in the acquisition and dissemination of new antimicrobial resistance. An increased surveillance and the development of adequate prevention strategies are warranted.

### **Acknowledgments**

We gratefully acknowledge the assistance of Anna Carolina Kockskroh and Fernanda Marques Castrucci with the dendrogram analysis and Fábila A. Salvador for helpful assistance with the plasmid extraction. This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX MCT/CNPq/FAPERJ) (to BECG).

### **References**

- Ahmed, A.M., Kawamoto, H., Inouye, K., Hashiwata, Y., Sakaki, M., Seno, M., Shimamoto, T., 2005. Genomic analysis of a multidrug-resistant strain of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 causing a family outbreak in Japan. *J Med Microbiol.* 54, 867-872.
- Aidar-Ugrinovich, L., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Leomil, L., Dahbi, G., Mora, A., Onuma, D.L., Silveira, W.D., de Castro, A.F.P., 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *Int J Food Microbiol.* 115(3), 297-306.

- Beutin, L., Geier, D., Steinrck, H., Zimmermann, S., Scheutz, F., 1993. Prevalence and some properties of Verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol.* 31, 2483-2488.
- Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., Aleksic, S., Gillespie, H.A., Whittam, T.S., 1997. Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Appl Environ Microbiol.* 63, 2175–2180.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bonnet, R., 2004. Growing Group of Extended-Spectrum beta-lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 48, 1-14.
- Bradford, P.A., 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 14, 933-951.
- Castanheira, M., Toleman, M. A., Jones, R. N., Schmidt, F. J., Walsh, T. R., 2004. Molecular Characterization of a  $\beta$ -Lactamase Gene, blaGIM-1, Encoding a New Subclass of Metallo- $\beta$ -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 48, 4654-4661.
- Castro, A.F.P., Guerra, B., Leomil, L., Aidar-Ugrinovitch, L., Beutin, L., 2003. Multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 0118:H16 in Latin America. *Emerg Infect Dis.* 9(8), 1027-1028.
- Cergole-Novella, M.C., Nishimura, L.S., Irino, K., Vaz, T.M.I., Castro, A.F.P., Leomil, L., Guth, B.E.C., 2006. Stx genotypes and antimicrobial resistance profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human infections, cattle and foods in Brazil. *FEMS Microbiol.* 259, 234-239.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 66, 4555-4558.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 18th informational supplement. Approved standard M100–S16. Wayne, PA, USA.

- Gautom, R.K., 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. Clin Microbiol, 35, 2877-2980.
- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Helmuth, R., Guth, B.E.C., Beutin, L., 2006. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* O111 isolates J Antimicrob Chemother. 57, 1210-1214.
- Guth, B.E.C., Souza, R.L., Vaz, T.M.I., Irino, K., 2002. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. Emerg Infect Dis. 8, 535-536.
- Irino, K., Kato, M.A., Vaz, T.M.I., Ramos, I.I., Souza, M.A., Cruz, A.S., Gomes, T.A., Vieira, M.A., Guth, B.E.C., 2005. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. Vet Microbiol. 105, 29-36.
- Irino, K., Vaz, T.M.I., Medeiros, M.I.C., Kato, M.A.M.F., Gomes, T.A.T., Vieira, M.A.M., Guth, B.E.C., 2007. Serotype diversity as a drawback in the surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Brazil. J Med Microbiol. 56(4), 565-567.
- Ishii, Y., Kimura, S., Alba, J., Shiroto, K., Otsuka, M., Hashizume, N., Tamura, K., Yamaguchi, K., 2005. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (Stx1)-positive *Escherichia coli* O26:H11: a new concern. J Clin Microbiol. 43, 1072-1075.
- Jacoby, G.A., 1994. Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect. 13, S2-1.
- Kon, M., Kurazono, T., Ohshima, M., Yamaguchi, M., Morita, K., Watanabe, N., Kanamori, M., Matsushita, S., 2005. Cefotaxime-resistance Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 isolated from a patient with diarrhea. Kansenshogaku Zasshi. 79, 161-168.
- Lee, J.H., 2009. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26 and O111 isolates from cattle and their characteristics. Vet Microbiol. 135, 401.
- Leomil, L., Aidar-Ugrinovich, L., Guth, B.E.C., Irino, K., Vettorato, M.P., Onuma, D.L., de Castro, A.F.P., 2003. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. Vet Microbiol. 97, 103-109.

- Martinez-Freijo, P., Fluit, A.C., Schmitz, F.J., Grek, V.S., Verhoef, J., Jones, M.E., 1998. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother.* 42, 689-696.
- Martinez-Freijo, P., Fluit, A.C., Schmitz, F.J., Verhoef, J., Jones, M.E., 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.
- Maynard, C., Bekal, S., Sanschagrín, F., Levesque, R.C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S., Harel, J., 2004. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J Clin Microbiol.* 42, 5444-5452.
- Morabito, S., Tozzoli, R., Caprioli, A., Karch, H., Carattoli, A., 2002. Detection and Characterization of Class 1 Integron in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance.* 8, 85-91.
- Nagachinta, S., Chen, J., 2008. Transfer of class 1 integron-mediated antibiotic resistance genes from shiga toxin-producing *Escherichia coli* to a susceptible *E. coli* K-12 strain in storm water and bovine feces. *Appl Environ Microbiol.* 74, 5063-5067.
- Nagachinta, S., Chen, J., 2009. Integron-mediated antibiotic resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Food Prot.* 72, 21-27.
- Nataro, J.P., Kaper, J. B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11, 142-201.
- Rasheed, J.K., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., Steward, C., Hill, B., Medeiros, A.A., Tenover, F.C., 1997. Evolution of extended-spectrum beta-Lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents and Chemother.* 41, 647-653.
- Roest, H.I., Liebana, E., Wannet, W., van Duynhoven, Y., Veldman, K.T., Mevius, D.J., 2007. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* O157 isolated between 1998 and 2003 in The Netherlands. *Tijdschr Diergeneeskd.* 132, 954-958.

- Salvadori, M.R., Valadares, G.F., Leite, D.S., Blanco, J., Yano, T., 2003. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Braz J Microbiol.* 34(3), 230-235.
- Scott, L., McGee, P., Walsh, C., Fanning, S., Sweeney, T., Blanco, J., Karczmarczyk, M., Earley, B., Leonard, N., Sheridan, J.J., 2009. Detection of numerous verotoxigenic *E. coli* serotype, with multiple antibiotic resistance from cattle faeces and soil. *Vet Microbiol.* 134, 288-293.
- Shu-Lin, L., Hessel, A., Sanderson, K.E., 1993. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Genetics.* 90, 6874-6878.
- Sirot, D., Sirot, J., Labia, R., Morand, A., Courvalin, P., Darfeuille-Michaud, A., Perroux, R., Cluzel, R., 1987. Transferable resistance to third generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 20, 323-334.
- Srinivasan, V., Nguyen, L.T., Headrick, S.I., Murinda, S.E., Oliver, S.P., 2007. Antimicrobial resistance patterns of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H7- from different origins. *Microb Drug Resist.* 13, 44-51.
- Van Den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E., 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents.* 14, 327-335.
- Vaz, T.M.I., Irino, K., Kato, M.A., Dias, A.M., Gomes, T.A.T., Medeiros M.I., Rocha, M.M.M., Guth, B.E.C., 2004. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *J Clin Microbiol.* 42, 903-905.
- Vinué, L., Sáenz, Y., Somalo, S., Escudero, E., Moreno, M.A., Ruiz-Larrea, F., 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.
- White, D.G., Zhao, S., Mcdermott, P.F., Ayers, S., Gaines, S., Friedman, S, Wagner, D.D, Meng, J., Needle, D., Davis, M., DebRoy, C., 2002.

Characterization of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* O111 isolates of animal and human origin. *Microb. Drug Resist* Summer. 8, 139-146.

Zhao, S., White, D.G., Ge, B., Ayers, S., Friedman, S., English, L., Wagner, D., Gaines, S., Meng, J., 2001. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 67, 1558-1564.

### Legend to figures

Fig. 1. PCR-RFLP analysis of STEC strains carrying *int1*. Lanes 1 and 8, 1 kb DNA ladder; lanes 2 to 7, human STEC strains.

Fig. 2. Plasmid profiles of STEC strains carrying *int1*. (A) Lanes 1 and 10, *E. coli* 39R861 strain carrying plasmids of known molecular sizes; lanes 2 to 7 and 9, human STEC strains; lane 8, bovine STEC strain. (B) Representative Southern blot hybridization assay with *int1*-specific probe. Lane 1, *E. coli* 39R861; lane 2, plasmid profile of STEC 1919/81 strain; lane 3, corresponding southern blot hybridization.

Fig. 3. Dendrogram outlining the relationship of antibiotic resistant O111 (A) and O118 (B) STEC strains from human and animal sources, determined by macrorestriction analysis of genomic DNA with XbaI.

\*, STEC strains carrying *int1*

**Table 1**

Characteristics of antimicrobial resistant STEC strains.

Serotype	Origin <sup>b</sup> (No strains)	Stx	<i>int1</i>	Antimicrobial Profile (No strains)	Phylogenetic group
O26:H11	HD (2)	1	-	Tet; StrTet	B1
O55:H19	DC	1	-	AmpChloKanStrTet	B1
O111:H8	HC (4)	1 <sup>c</sup>	-	SutTet; AmpKanStrSutTet; StrSutTet (2)	B1
O111:H8	DC (3)	1	-	StrSutTet; AmpKanStrSutTet (2)	B1
O111:H8	HD (4)	1	+	StrTet (2); ChloStrSutTet; AmpChloStrSutTet	B1
O111:H8	HD (5)	1	-	Tet (2); AmpChloStrSutTet; StrSutTet AmpChloKanStrSutTet	B1 <sup>d</sup>
O111:H11	HD	1	+	StrTet	B1
O111:HNM	HD	1	+	ChloKanStrTet	B1
O111:HNM	HD (5)	1	-	Tet (2); KanStrTet; AmpChloKanStrSutTet; StrSutTet	B1
O118:H16	DC	1	+	AmpChloKanStrSutTet	B1
O118:H16 <sup>a</sup>	DC	1	-	AmpKanStrSutTet	B1
O118:H16	HD	1	-	StrSutTet	B1
ONT:H2	HD (2)	1	-	AmpKanStrTet; KanStrSutTet	B1
ONT:H49	HC	1 + 2	-	Tet	B1

<sup>a</sup>, Multidrug-resistant O118:H16 STEC strain previously described in South America (Castro *et al.*, 2003); <sup>b</sup>, HD, human with diarrhea; DC, feces from diarrheic cattle; HC, feces of healthy cattle; <sup>c</sup>, One of the strains produced Shiga toxin types 1 and 2 (Stx1+2); <sup>d</sup>, One of the strains classified in the phylogenetic group A.

Figure 1

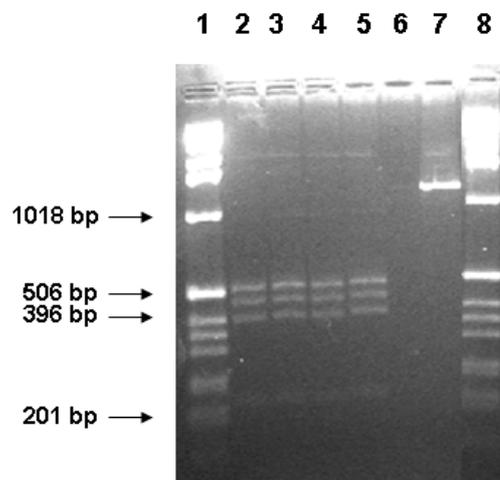


Figure 2

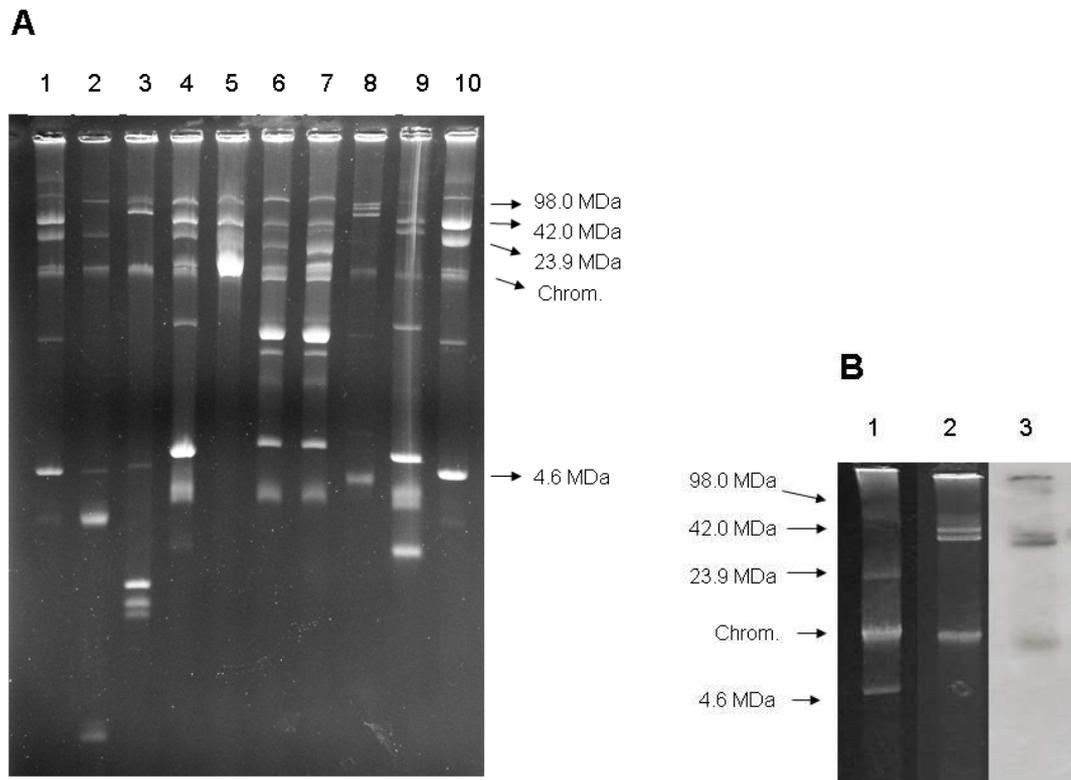
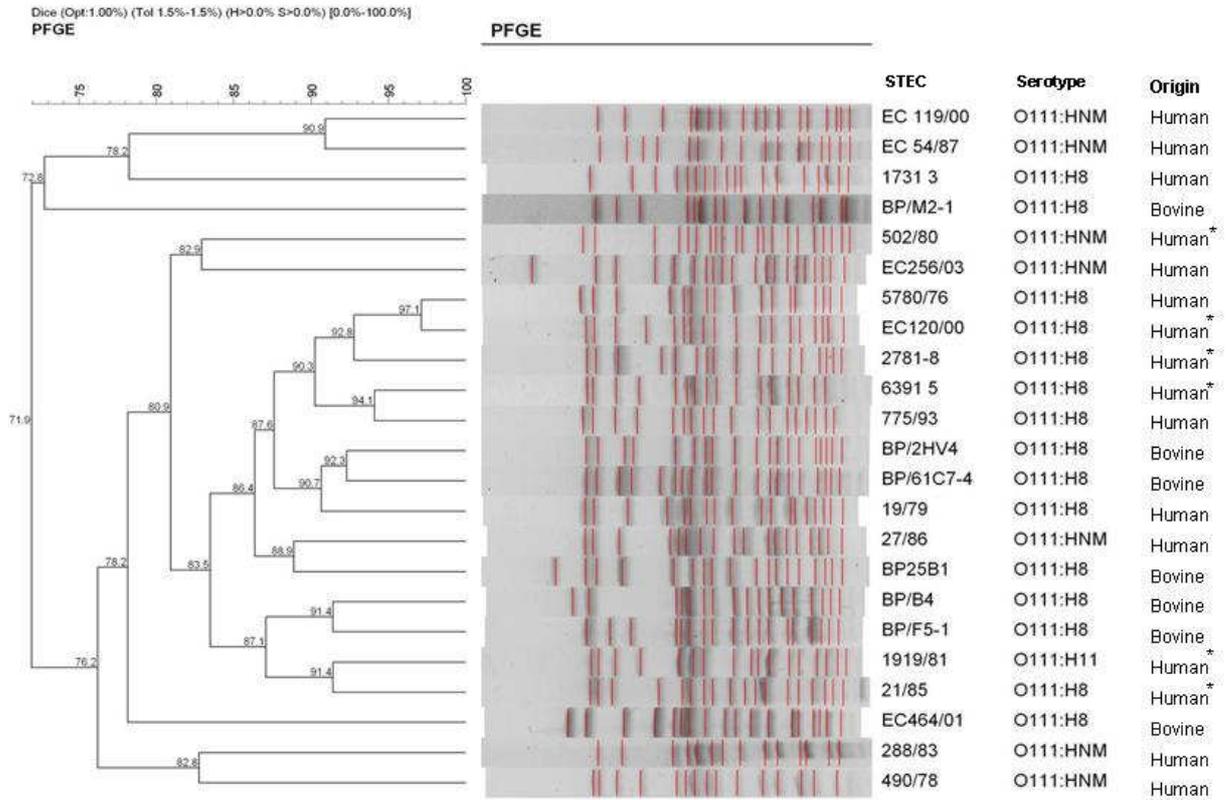
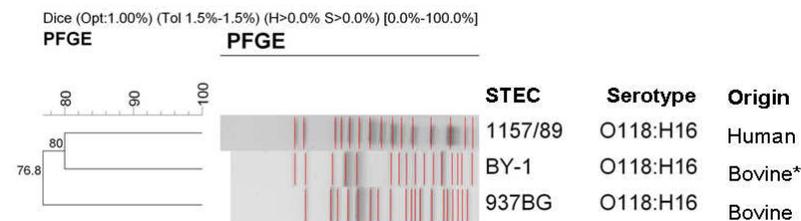


Figure 3

A



B



### **3. RESULTADOS - ARTIGO 3**

---

---

ARTIGO 3. **MARIA CECILIA CERGOLE-NOVELLA**, ANTONIO CARLOS CAMPOS PIGNATARI, BEATRIZ ERNESTINA CABÍLIO GUTH, VIRVE IRENE ENNE. Determinação do custo biológico “*fitness cost*” na aquisição de genes de resistência e virulência em patótipos de *Escherichia coli* associados a infecções intestinais e extraintestinais. **(Manuscrito em preparação)**

O presente artigo estudou 4 amostras de *E. coli* carreadoras de integrons classe 1 isoladas de infecções intestinais e extraintestinais para determinação do custo biológico ou *fitness cost* imposto à cepas de *E. coli* de linhagem laboratorial na aquisição de genes de resistência e/ou virulência.

Inicialmente, amostras transconjugantes foram obtidas a partir de ensaios de conjugação bacteriana entre as 4 amostras de *E. coli* versus cepas de *E. coli* K12 MA3456 (REIS *et al.*, 1980) e *E. coli* J53Az<sup>R</sup> (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 1998). As amostras transconjugantes contendo plasmídeos de resistência e/ou de virulência assim como as 4 amostras de *E. coli* isoladas de infecções intestinais e extraintestinais foram estudadas no laboratório do Departamento de medicina celular e molecular da Universidade de Bristol, Inglaterra (ANEXOS 9. 2. e 9. 3.).

As amostras foram caracterizadas quanto às propriedades genóticas e fenotípicas da resistência a antimicrobianos, presença de genes de virulência, custo biológico da aquisição de genes e grupo de incompatibilidade plasmidial.

Os primeiros resultados obtidos nos experimentos de competição bacteriana entre amostras de *E. coli* isoladas de infecções intestinais e extraintestinais versus cepas de *E. coli* de linhagem laboratorial, revelaram que houve um custo biológico de pequeno a neutro às cepas de *E. coli* laboratoriais. Ou seja, a aquisição de genes de resistência e/ou virulência interferiu muito pouco na capacidade das cepas de *E. coli* estudadas de se multiplicarem e conseqüentemente se disseminarem.

**Determinação do custo biológico “*fitness cost*” na aquisição de genes de resistência e virulência em patotipos de *Escherichia coli* associados a infecções intestinais e extraintestinais**

MARIA CECILIA CERGOLE-NOVELLA<sup>1,2,3</sup>, ANTONIO CARLOS CAMPOS PIGNATARI<sup>1</sup>, BEATRIZ ERNESTINA CABILIO GUTH<sup>2</sup>, VIRVE IRENE ENNE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>, Divisão de Doenças Infecciosas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>, Departamento de Medicina Celular e Molecular, Centro de Pesquisa a antimicrobianos Bristol, Universidade de Bristol, Reino Unido.

**Resumo**

A rápida disseminação de genes de virulência e genes de resistência a antimicrobianos é consequência da transferência de genes entre bactérias da mesma espécie ou interespecies por plasmídeos, integrons e transposons. A presença de genes de resistência e virulência no mesmo elemento genético permite a co-seleção de ambos determinantes em situação não infectiva, mas na presença de antimicrobianos, o determinante de resistência permite a seleção do fator de virulência, enquanto em uma situação de infecção, a presença do fator de virulência garante a manutenção do plasmídeo e, portanto dos genes de resistência a antimicrobianos, inclusive na ausência de pressão seletiva. Estes são os dois elementos-chave na evolução da resistência e virulência bacteriana. A resistência a antimicrobianos é mais frequentemente acompanhada de um custo biológico, observada por uma diminuição no *fitness*, ou seja, uma redução na taxa de crescimento e redução na virulência bacteriana. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto *fitness* que os genes de resistência a antimicrobianos e genes de virulência exercem sobre amostras de *E. coli* associadas a infecções intestinais e extraintestinais. Os primeiros resultados obtidos neste trabalho mostraram um custo biológico de pequeno a neutro quando genes de resistência e/ou virulência de amostras de *E. coli* selecionadas e associadas a infecções intestinais e extraintestinais foram inseridos em cepas de *E. coli* laboratoriais.

## Introdução

Os genes de resistência podem estar em plasmídeos que contêm genes que permitam a sua seleção na ausência de pressão seletiva por antimicrobianos (ALONSO *et al.*, 2001). Um exemplo desta situação são os plasmídeos de resistência às sulfonamidas. Estudos na Inglaterra têm mostrado que apesar da redução na prescrição de sulfonamida nos últimos anos, a resistência à sulfonamidas não tem diminuído. Análise de plasmídeos que contêm genes de resistência às sulfonamidas mostrou que, em muitos casos temos plasmídeos de multiresistência, com genes que conferem resistência a outros antimicrobianos que ainda estão sendo usados na clínica (ENNE *et al.*, 2001). Situação semelhante pode ocorrer quando um mesmo plasmídeo contém tanto genes de resistência como genes de virulência (MARTÍNEZ e BAQUERO, 1988). MARTÍNEZ e BAQUERO (2002) ao analisarem o sequenciamento de plasmídeos de virulência observaram também a presença de genes de resistência.

É aceito que, tanto na ausência da pressão seletiva por drogas, como na aquisição e expressão de genes de resistência haverá um *fitness cost* sobre a bactéria hospedeira. Acredita-se que tal custo surja pela resistência bacteriana poder comprometer as funções metabólicas normais das células devido a mutações em genes essenciais que expressam algum mecanismo de resistência bacteriana. Assim, foi sugerido que, se a pressão seletiva for removida, a incidência de resistência pode declinar e como bactérias resistentes são menos *fit* serão substituídas por bactérias mais competitivas, sensíveis a antimicrobianos (ANDERSSON e LEVIN, 1999; ANDERSSON, 2003; BJORKMAN e ANDERSSON, 2000).

O custo biológico desempenha um papel vital na determinação do aparecimento e disseminação de um mutante resistente dentro de uma população bacteriana. Isto é particularmente pertinente para a bexiga do sistema urinário que segue uma sequência de enchimento e esvaziamento, onde um uropatógeno tem que crescer rápido o suficiente para manter-se nas vias urinárias e não ser eliminado pela micção. Isto pode ser matematicamente modelado, onde a taxa de crescimento necessária para a manutenção bacteriana na bexiga é referido por GORDON-RILEY (1992).

A determinação do custo biológico bacteriano na aquisição e expressão de genes de resistência é um parâmetro chave na determinação do surgimento e disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos (LINARES-RODRÍGUEZ e MARTÍNEZ-MENÉNDEZ, 2005). A resistência bacteriana das amostras de *E. coli* está se tornando um crescente problema para a Saúde Pública e é de suma importância reduzir a pressão seletiva, na tentativa de substituir as bactérias resistentes por bactérias mais competitivas, sensíveis a antimicrobianos.

A caracterização fenotípica e genotípica da resistência a antimicrobianos e análise da diversidade genética em amostras de *E. coli* associadas a infecções intestinais e extraintestinais, identificou a presença de marcadores de virulência, multiresistência a antimicrobianos e presença de elementos genéticos móveis como integron classe 1 e plasmídeos. Tendo em vista a inexistência de dados no Brasil sobre *fitness cost* em isolados clínicos de *E. coli* este estudo teve como objetivo avaliar o impacto *fitness* que os genes de resistência a antimicrobianos exercem sobre as amostras de *E. coli* associadas a infecções intestinais e extraintestinais.

## Material e Métodos

### *Amostras Bacterianas*

Foram estudadas duas amostras de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) e duas amostras de *E. coli* intestinal e extraintestinal carreadoras de integrons classe 1 para determinação do *fitness cost* imposto na aquisição de genes de resistência a antimicrobianos e virulência (Tabela 1). Como amostras hospedeiras de plasmídeos, foram usadas a *E. coli* HS comensal isolada de humano (LEVINE *et al.*, 1978), *E. coli* K12 JM109 (YANISCH-PERRON *et al.*, 1985), *E. coli* 345-2rifC mutante espontâneo resistente à rifampicina derivado de amostra comensal isolada de suíno (ENNE *et al.*, 2005) e *E. coli* HSrif<sup>R</sup> mutante espontâneo resistente à rifampicina desenvolvido neste trabalho.

Tabela 1. Características fenotípica e genotípica das amostras de *E. coli*

Amostras	Origem	Sorotipo <sup>a</sup>	Toxina Shiga	Perfil de resistência <sup>b</sup>	Perfil de Virulência <sup>c</sup>
STEC Ec120/00	Diarréia humana	O111:H8	+	E T	<i>eae, efa1, ehxA, iha, lpfA<sub>O113</sub>, spates</i>
STEC BY-1	Fezes bovina	O118:H16	+	A C E K Sut T	<i>eae, efa1, iha, lpfA<sub>O113</sub>, spates, toxB</i>
<i>E. coli</i> 34 intestinal	Diarréia humana	O102:H6	-	A Ctx Cip C E G K Nal Sul T	<i>fimH</i>
<i>E. coli</i> 36 extraintestinal	Secreção traqueal	ONT:HNM	-	A Ctx Cfz Cip E K Nal T Sut	<i>fimH</i>

<sup>a</sup>, NT, não tipável; NM, não móvel; <sup>b</sup>, A, ampicilina; E, estreptomicina; C, cloranfenicol; Sut, sulfametoxazol-trimetoprim; T, tetraciclina; Ctx, cefotaxima; Cip, ciprofloxacina; G, gentamicina; K, kanamicina; Nal, ácido nalidíxico; <sup>c</sup>, *eae*, gene que codifica intimina; *efa1*, fator de aderência de EHEC; *ehxA*, gene que codifica enterohemolisina, *Iha*, proteína que confere aderência, similar a IrgA de *Vibrio cholerae*; *ToxB*, proteína identificada a partir do plasmídeo O157 (pO157) da amostra Sakai; *lpfA<sub>O113</sub>*, fímbria polar longa; Spate, família de proteínas autotransportadoras, *fimH*, fímbria tipo 1.

*Teste de suscetibilidade a antimicrobianos*

Para verificar a transferência de marcador de resistência foi realizado o método de disco difusão em ágar, conforme recomendações de BAUER, 1966. As amostras foram cultivadas em TSB durante 18 horas, à temperatura de 37°C. Utilizando-se uma solução salina estéril, os inóculos obtidos foram ajustados a uma turbidez de 0,5 da escala de Mac Farland e a seguir foram semeados em placa contendo ágar Iso-Sensitest com o auxílio de um *swab* estéril. Posteriormente, foi depositado sobre o ágar o disco comercial do antimicrobiano de interesse.

*Ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) para genes de virulência e resistência a antimicrobianos*

Para verificar a transferência de marcadores de virulência e resistência foi realizada PCR. As amostras bacterianas foram semeadas em TSA e cultivadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 16 a 18 horas. O DNA molde utilizado para a PCR foi preparado a partir de uma alçada do crescimento bacteriano, obtido do cultivo em TSA, e transferida para um tubo tipo *Eppendorf*, contendo 100 µL de água Milli-Q estéril. A seguir, a suspensão foi submetida à fervura por 10 minutos. Para amplificação dos genes foram utilizadas sequências iniciadoras específicas. Para cada reação foram utilizados 0,5 µM de cada uma das sequências iniciadoras, 2,5 U/µL de *Taq DNA Polymerase*, 1 µL do DNA molde, para um volume final de 25 µL. Após a amplificação no termociclador (*Eppendorf Mastercycler*) os produtos obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose. O gel foi preparado por aquecimento, fundindo-se agarose em tampão TEB 0,5X na

concentração final adequada. Os fragmentos de DNA resultantes das reações de amplificação foram acrescidos de solução corante de DNA e aplicados nas canaletas do gel. Como marcador de massa molecular foi utilizado *Ready-load™* 100pb DNA Ladder (Invitrogen) 0,1 µg/µL. Após a corrida eletroforética, realizada sob corrente de 100 V em cubas para eletroforese horizontal (Bio-Rad, USA) e com tampão TEB 0,5X, o gel foi corado em solução de brometo de etídio durante 15 minutos, e observados em transiluminador de luz ultravioleta.

#### *Ensaio de PCR inc/rep baseado na tipagem dos genes de replicação plasmidial*

O agrupamento de incompatibilidade baseado no sistema de replicação plasmidial foi determinado por PCR inc/rep (CARATTOLI *et al.*, 2005). Foram usados 18 diferentes pares de primers representativos dos principais grupos de incompatibilidade plasmidial circulantes entre as *Enterobacteriaceae* descritos por COUTURIER (1988).

#### *Perfil Plasmidial*

A extração plasmidial foi obtida por lise alcalina, segundo metodologia descrita por BIRNBOIM e DOLY (1979), QIA prep Spin QIAGEN e QIAGEN *filter plasmid purification Midi for low copy plasmids*.

#### *Conjugação bacteriana*

As amostras doadoras e receptoras foram semeadas separadamente em 10 mL de caldo nutriente e incubadas com agitação a 37 °C até a concentração

bacteriana desejada (D.O. 600 nm 0,4 a 0,6). Os inóculos foram centrifugados em velocidade máxima por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ressuspenso em 100 µL de caldo nutriente. As amostras doadoras e receptoras foram misturadas, semeadas em ágar nutriente e incubadas a 37 °C por 16 a 18 horas. Todo crescimento bacteriano do ágar nutriente foi ressuspenso em água destilada estéril. Um volume de 100 µL de cada uma das diluições seriadas da suspensão da conjugação ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) foi semeado em placas seletivas para detectar transconjugantes. Como controles foram semeadas separadamente as amostras doadora e receptora em placas com antibióticos apropriados as quais foram incubadas a 37 °C por 16 a 18 horas.

#### *Desenvolvimento de células competentes*

Colônia isolada da amostra receptora foi semeada em 10 mL de caldo LB seguido de incubação com agitação à 37 °C por 16 a 18 horas. Foi inoculado 1 mL da suspensão bacteriana em 100 mL de caldo LB e incubado com agitação à 37 °C até a concentração bacteriana desejada (D.O. 600 nm 0,4 a 0,6). Todo material foi centrifugado a 4 °C a 2800 g por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. Foi adicionado 40-50 mL de HEPES minimum (Sigma) resfriado em banho de gelo para lavagem e centrifugado a 4 °C a 2800 g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado. Esse procedimento foi repetido por 2 vezes. O sedimento foi ressuspenso com 40-50 mL de glicerol a 10% para lavagem e centrifugado a 4 °C a 2800 g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ressuspenso com 200 µL de glicerol a 10%, aliquoteado e congelado imediatamente à -80 °C em volumes de 50 µL.

### *Transformação bacteriana através da eletroporação*

Em cubeta (50 X 2 mm) foram adicionados 2 µL da suspensão plasmidial da amostra doadora com 50 µL da amostra receptora competente. A suspensão foi eletroporada à 400 Ohms, 2,5 V e 25 Amps seguido da adição imediata de 1 mL de caldo SOC (Sambrook e Russel, 3a. Ed. Vol. 3, pág. A2.3) e incubada à 37 °C por 1 hora. Após esse tempo foi semeado 100µL da suspensão em meio de cultura seletivo apropriado e em meio de cultura sem antibiótico e incubado à 37 °C por 16 a 18 horas. Foi efetuada contagem do número de transformantes das placas. Quatro colônias de transformantes foram semeadas em ágar contendo antibióticos apropriados para futuras análises.

### *Ensaio competição bacteriana*

A avaliação do impacto *fitness cost* de elementos de resistência a antimicrobianos e virulência sobre amostras hospedeiras foi feita através do ensaio de competição bacteriana conforme orientações modificadas (ENNE *et al.*, 2004).

Os experimentos de competição foram realizados em triplicata com 6 gerações, por 6 dias consecutivos e estimado a média e desvio padrão da porcentagem do *fitness cost* por geração. A porcentagem do impacto *fitness cost* por geração de cada amostra foi estimada através de gráficos mono-log para determinação dos parâmetros, tempo (dias) *versus* LOG (UFC Resistentes/UFC Sensíveis) como descrito por LENSKI (1994) e REYNOLDS (2000).

## Resultados e Discussão

A partir de ensaios de conjugação e eletroporação entre as amostras de *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) Ec120/00 e BY-1 e entre as amostras de *E. coli* 34 e 36 associadas a infecções intestinal e extraintestinal respectivamente, *versus* cepas de *E. coli* receptoras competentes HS, K12JM109, 345-2rifC e HSrif<sup>R</sup> foram obtidos o transconjugante HS Ec120/00 e os transformantes HS BY-1amp e HSrif<sup>R</sup> 36. Nenhum transconjugante ou transformante foi obtido a partir da amostra de *E. coli* 34 e nenhum transconjugante ou transformante foi obtido a partir das 4 amostras de *E. coli* *versus* cepas receptoras de *E. coli* K12JM109 e 345-2rifC. Para verificar a transferência de plasmídeos carreadores de genes de resistência e/ou virulência das amostras de *E. coli* doadoras para as *E. coli* receptoras foram realizados extração plasmidial, disco difusão em ágar e PCR para identificar genes de resistência, virulência e para identificação dos grupos de incompatibilidade plasmidial (Inc).

O transconjugante HS Ec120/00 apresentou mesmos perfis genotípico e fenotípico de virulência e resistência e carregava o mesmo plasmídeo pertencente ao grupo Inc P da amostra doadora de STEC Ec120/00. No entanto, o transformante HS BY-1amp apresentou o mesmo perfil de virulência, mas diferente perfil de resistência e apresentou resistência somente à ampicilina. O transformante HS BY-1amp carregava somente o plasmídeo pertencente a um dos grupos Inc da amostra doadora de STEC BY-1, Fib. O transconjugante HSrif<sup>R</sup> 36 adquiriu as mesmas características fenotípicas e genotípicas da resistência, exceto a resistência a estreptomicina e mesmos plasmídeos pertencentes aos grupos Inc FrepB, Fib e I1 (Tabela 2, Figuras 1A,

1B e 1C). De acordo com dados da literatura nosso estudo também identificou amostra de *E. coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido, pertencente ao grupo CTX-1 (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>), carreadora de plasmídeos pertencentes aos grupos Inc Fib e I1, os quais estão disseminados em diversos continentes (HOPKINS *et al.*, 2006; GONULLU *et al.*, 2008).

A seguir foram realizados ensaios de competição bacteriana entre o transconjugante HS Ec120/00 *versus* cepa de *E. coli* HS, transformante HS BY-1 *versus* *E. coli* HS e transformante HSrif<sup>R</sup> 36 *versus* *E. coli* HSrif<sup>R</sup>. A porcentagem do impacto *fitness cost* por geração de cada amostra foi estimada através de gráficos mono-log para determinação dos parâmetros, tempo (dias) *versus* LOG (UFC Resistentes/UFC Sensíveis). Os plasmídeos das duas amostras de STEC Ec120/00 e BY-1, as quais codificavam tanto genes de resistência como genes de virulência, tiveram um custo biológico por geração pequeno de  $-4,6 \pm 1,9\%$  e neutro de  $-0,1 \pm 1,3\%$ , quando inseridos à cepa de *E. coli* HS, respectivamente. O plasmídeo da amostra de *E. coli* 36 que codificava somente genes de resistência também teve efeito neutro de  $-1,8 \pm 1,0\%$  por geração sobre a cepa de *E. coli* HSrif<sup>R</sup> (Tabela 2).

A determinação do custo biológico bacteriano na aquisição e expressão de genes de resistência e/ou genes de virulência é um parâmetro chave na determinação do surgimento e disseminação de resistência a antimicrobianos e/ou virulência das bactérias (LINARES-RODRÍGUEZ e MARTÍNEZ-MENÉNDEZ, 2005). A resistência a antimicrobianos é mais frequentemente acompanhada de um custo biológico, observada como uma diminuição no *fitness*, ou seja, uma redução na taxa de crescimento ou uma redução na

virulência bacteriana (ANDERSSON e LEVIN, 1999; GIRAUD *et al.*, 2003; ANDERSSON, 2006).

Os primeiros resultados obtidos nos experimentos de competição bacteriana entre amostras de STEC, *E. coli* intestinal e extraintestinal *versus* cepas de *E. coli* laboratoriais revelaram que houve um custo biológico pequeno a neutro às cepas de *E. coli* laboratoriais. Ou seja, a aquisição de genes de resistência e/ou virulência interferiu muito pouco na capacidade das cepas de *E. coli* se multiplicarem e conseqüentemente se disseminarem.

Um achado interessante foi a dificuldade encontrada em realizar os ensaios de transformação e conjugação bacteriana precedentes aos ensaios de competição bacteriana entre as amostras doadoras de *E. coli* e as três cepas receptoras. Ora, pela multiresistência apresentada pelas amostras de *E. coli*, ora por incompatibilidade plasmidial apresentada entre as amostras doadoras e receptoras. As cepas de *E. coli* HS e *E. coli* K12 JM109 eram resistentes ao ácido nalidíxico como as amostras de *E. coli* intestinal e extraintestinal, impossibilitando a realização dos ensaios de conjugação. Por sua vez, as amostras de *E. coli* BY-1, 34 e 36 apresentavam os mesmos genes no controle de replicação plasmidial das cepas de *E. coli* K12 JM109 e *E. coli* 345-2rifC tornando-as incompatíveis para a obtenção de sucesso nos ensaios de eletroporação (Tabela 2).

Dessa forma, experimentos adicionais serão necessários para a determinação do custo biológico exercido sobre diferentes amostras de *E. coli* laboratoriais na aquisição de genes de resistência e/ou virulência das amostras de *E. coli*.

Tabela 2. Características fenotípicas e genotípicas das amostras de *E. coli* na determinação do *fitness cost*

Amostras de <i>E. coli</i>	Genes de Virulência <sup>a</sup>	Disco difusão <sup>b</sup>	Genes de resistência <sup>c</sup>	Grupo de incompatibilidade plasmidial <sup>d</sup> (Inc)	% impacto <i>fitness cost</i> (vs. <i>E. coli</i> receptora)
STEC Ec120/00 doadora	<i>spate</i>	E Sul T	<i>sul1 tetA aadA</i>	P	
HS Ec120/00 transconjugante	<i>spate</i>	E Sul T Nal	<i>sul1 tetA aadA</i>	P	-4,6 ± 1,9%
STEC BY-1 doadora	<i>ehxA spate toxB</i>	A C K S Sul T Tri	<i>tem sul1 sul2 tetA strA</i>	FrepB Fib	
HS BY-1amp transformante	<i>ehxA spate toxB</i>	A	<i>Tem</i>	Fib	-0,1 ± 1,3%
<i>E. coli</i> intestinal 34 doadora	Ausente	A Ctx Cip C E G K Nal Sul T	<i>tem ctx-gr9 sul1 sul2 tetA strA</i>	FrepB Fib	
<i>E. coli</i> extraintestinal 36 doadora	Ausente	A Ctx Cfz E K Nal T Sul Tri	<i>oxa1 ctx-gr1 sul1 tetB</i>	FrepB Fib I1	
HSrif <sup>R</sup> 36 transconjugante	ND	A Ctx Cfz K Nal T Sul Tri Rif	<i>oxa1 ctx-gr1 sul1 tetB</i>	FrepB Fib I1	-1,8 ± 1,0%
<i>E. coli</i> HS receptora	ND	Nal	ND	Fia	
<i>E. coli</i> JM109 receptora	ND	Nal	ND	FrepB Fia Fib Fic	
<i>E. coli</i> 345-2rifC receptora	ND	Rif	ND	FrepB Fia Fib	
<i>E. coli</i> HSrif <sup>R</sup> receptora	ND	Nal Rif	ND	ND	

<sup>a</sup>, *ehxA*, gene que codifica enterohemolisina; *ToxB*, proteína identificada a partir do pO157 da amostra Sakai; *Spate*, família de proteínas autotransportadoras; ND, não determinado; <sup>b</sup>, A, ampicilina; E, estreptomicina; C, cloranfenicol; Sul, sulfonamida; Tri, trimetoprim; T, tetraciclina; Ctx, cefotaxima; Cip, ciprofloxacina; G, gentamicina; K, kanamicina; Nal, ácido nalidíxico; Cfz, ceftazidima; Rif, rifampicina; <sup>c</sup>, *sul*, sulfonamidas; *tet*, tetraciclina; *oxa*, ampicilina; *aadA/str*, estreptomicina; *tem/ctx*, beta-lactâmicos; <sup>d</sup>, Inc (CARATTOLI *et al.*, 2005).

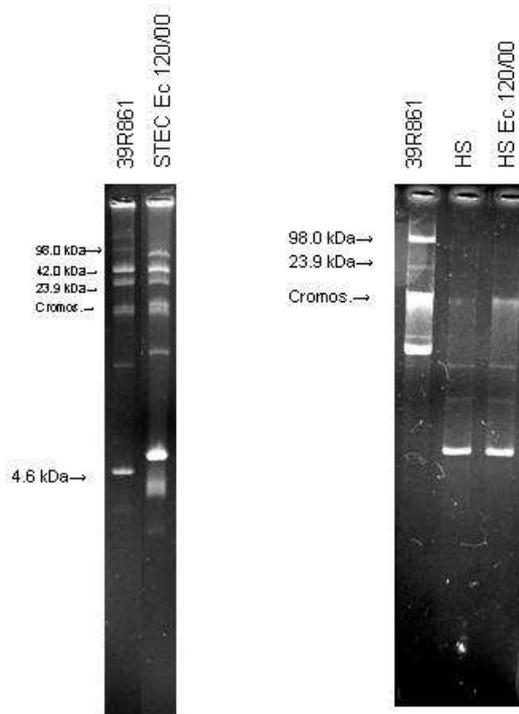


Figura 1A. Extração plasmidial das amostras de STEC Ec120/00, *E. coli* HS e transconjugante HS Ec120/00. Amostra de *E. coli* 39R861 carreadora de plasmídeos de conhecida massa molecular.

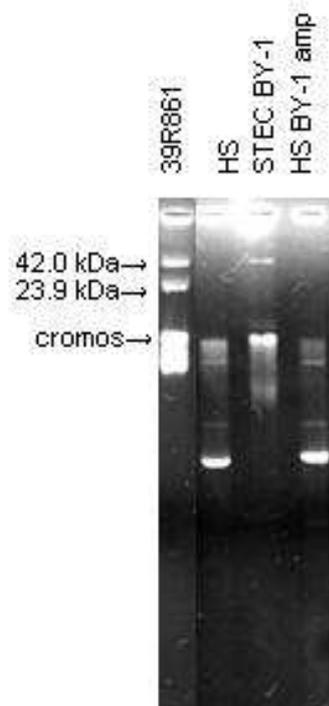


Figura 1B. Extração plasmidial das amostras de STEC BY-1, *E. coli* HS e transformante HS BY-1amp. Amostra de *E. coli* 39R861 carreadora de plasmídeos de conhecida massa molecular.

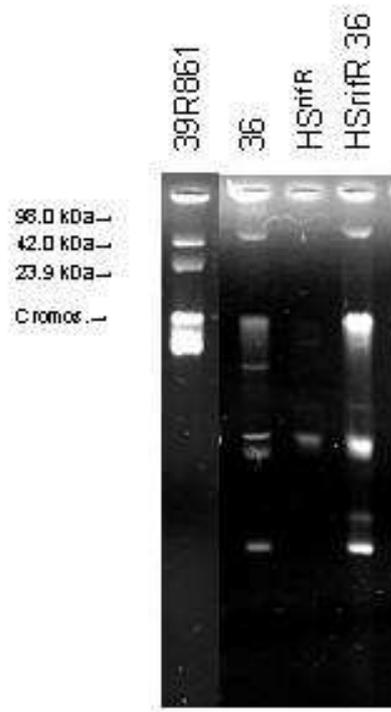


Figura 1C. Extração plasmidial das amostras de *E. coli* 36, *E. coli* HSrif<sup>R</sup> e transconjugante HSrif<sup>R</sup> 36. Amostra de *E. coli* 39R861 carreadora de plasmídeos de conhecida massa molecular.

**Acknowledgment**

Agradecemos à aluna de doutorado Fernanda Matsiko Inoue dos laboratórios LEMC/ALERTA pelo envio das amostras de *E. coli* ao laboratório do Departamento de Medicina Celular e Molecular da Universidade de Bristol, Inglaterra. Ao secretário da Pós-graduação Marcelo Vasconcellos pelo auxílio na participação do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior – PDEE/CAPES. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

**References**

Alonso, A.; Sánchez, P.; Martínez, J.L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol*, v. 3, p. 1-9, 2001.

Andersson, D.I.; Levin, B.R. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*, v. 2, p. 489–493, 1999.

Andersson, D.I. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr Opin Microbiol*, v. 6, p. 452-456, 2003.

Andersson, D.I. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr Opin Microbiol*, v. 9, p. 461–465, 2006.

Bauer, A. W.; Kirby, M. M.; Sherris, J. L., Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, v. 45, p. 493-496, 1966.

Birnboim, H.C., and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, v. 7, p. 1513-1523, 1979.

Blorkman, J.; Andersson, D. I. The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug Resist Update*, v. 3, p. 237-245, 2000.

Carattoli, A.; Bertinia, A.; Villaa, L.; Falbob, V.; Hopkinsc, K. L.; Threlfallc, E. J. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*, v. 63, p. 219-228, 2005.

Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L., Maas, W. K. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev*, v. 52, p. 375- 395, 1988.

Enne, V. I.; Livermore, D. M.; Stephens, P.; Hall, L. M. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet*, v. 357, p. 1325-1328, 2001.

Enne, V. I.; Delson, A.A.; Roe, J. M. *et al.* Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother*, v. 53, p. 203-207, 2004.

Enne, V. I.; Delsol, A. A.; Davis, G. R.; Hayward, S. L.; Roe, J. M.; Bennett, P. M. Assessment of the fitness impacts on *Escherichia coli* of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. *J Antimicrob Chemother*, v. 56, p. 544-551, 2005.

Giraud, E.; Cloeckert, A.; Baucheron, S. *et al.* Fitness cost of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Med Microbiol*, v. 52, p. 697-703, 2003.

Gonullu, N.; Aktas, Z.; Kayacan, C. B.; Salcioglu, M.; Carattoli, A.; Yong, D. E.; Walsh, T. R. Dissemination of CTX-M-15  $\beta$ -lactamase genes carried on Inc FI and FII Plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a University Hospital in Istanbul, Turkey. *J Clin Microbiol*, v. 46 (3), p. 1110-1112, 2008.

Gordon, D.M.; Riley, M.A. A theoretical and experimental analysis of bacterial growth in the bladder. *Mol Microbiol*, v. 6, p. 555-562, 1992.

Hopkins, K. L.; Liebana, E.; Villa, L.; Batchelor, M.; Threlfall, E. J.; Carattoli, A. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY  $\beta$ -Lactamases circulating

among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 50 (9), p. 3203-3206, 2006.

Lenski, R. E.; Simpson, S. C.; Nguyen, T. T.; Genetic analysis of a plasmid-encoded, host genotype-specific enhancement of bacterial fitness. *J Bacteriol*, v. 176, p. 3140-3147, 1994.

Levine, M. M., Bergquist, E. J.; Nalin, D. R.; Waterman, D. H.; Hornick, R. B.; Young, C. R.; Sotman, S. *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet*, v. 1, p. 1119-1122, 1978.

Linares-Rodríguez, J. F.; Martínez-Menéndez, J. L. Antimicrobial resistance and bacterial virulence. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 23, p. 86-93, 2005.

Martínez, J. L.; Baquero, F. Genetic linkage of antibiotic resistance and bacterial virulence. *APUA Newsletters*, v. 6, p. 1-3, 1988.

Martínez-Martínez, L., Pascual, A.; Jacoby, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, v. 351, p. 797-799, 1998.

Martínez, J. L.; Baquero, F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*, v. 15, p. 647-679, 2002.

Reis, M. H. L.; Affonso, M. H. T.; Trabulsi, L. R.; Mazaitis, A. J.; Maas, R.; Maas. W. K. Transfer of a CFA/I-ST plasmid promoted by a conjugative plasmid in a strain of *Escherichia coli* of serotype O128ac:H12. *Infect Immun*, v. 29 (1), p. 140-143, 1980.

Reynolds, M. G. Compensatory evolution in rifampicin-resistant *Escherichia coli*. *Genetics*, v. 156, p. 1471-1481, 2000.

Yanisch-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, v. 33, p. 103-119, 1985.

## **4. RESULTADOS COMPLEMENTARES**

#### 4. RESULTADOS COMPLEMENTARES

Para podemos definir se as amostras de *E. coli* estudadas no ARTIGO 1 poderiam ser chamadas de *E. coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC) utilizamos o critério adotado por JOHNSON e cols (2003). A maioria das amostras apesar de ter sido isolada de sítios extra-intestinais não apresentou o *status* de ExPEC. Porém, como nosso trabalho envolvia a análise da diversidade genética de dois distintos patotipos, *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC), muito bem caracterizadas quanto ao seu potencial de virulência, e *E. coli* isoladas de sítios extra-intestinais, foram pesquisados marcadores adicionais de virulência frequentemente encontrados nesses dois grupos de *E. coli*.

##### 4. 1. Presença de sequências genéticas relacionadas a toxinas, prováveis adesinas e proteases

Marcadores de virulência que possam estar presentes nos dois patotipos estudados como toxinas, prováveis adesinas e proteases foram pesquisados através de ensaios de PCR (Tabela 1).

A presença de genes de virulência característicos em amostras de STEC, como toxina Shiga (*stx*), gene que codifica intimina (*eae*) e enterohemolisina (*ehxA*) foram pesquisados entre as amostras de *E. coli* associadas a infecções extra-intestinais, mas não foram detectados. Porém, a presença de genes tipicamente encontrados em amostras de ExPEC, não foram pesquisados entre as amostras de STEC. A análise da distribuição do

genótipo de virulência é mostrada nas tabelas 2 e 3, sendo que a maioria dos genes de virulência pesquisados entre as amostras de STEC já havia sido identificado em estudo anterior (CERGOLE-NOVELLA *et al.*, 2007).

Foi analisado também a presença de genes de virulência que codificam proteínas autotransportadoras como SPATE e membros da família das SPATE. Entre as 44 amostras estudadas 54,5% apresentaram SPATE, mas nenhuma das amostras apresentou membros da família das SPATE, como serino-protease codificada por plasmídeo (EspP) e serino-protease de origem cromossomal (EspI). As 18 amostras de STEC que apresentaram SPATE foram isoladas tanto das fezes diarréicas humanas e bovinas como das fezes de bovinos saudáveis pertencentes a diversos sorotipos. Entre as amostras de *E. coli* extra-intestinais, SPATE foi encontrado em 6 amostras, sendo 5 isoladas de pacientes com diagnóstico clínico de infecção do trato urinário (ITU) e em um paciente com choque séptico. Vat, autotransportador vacuolizante membro da família das SPATE, foi encontrado em 3 amostras de *E. coli* extra-intestinais isoladas de paciente com quadro clínico de ITU, sendo 2 delas pertencentes ao grupo filogenético B2 e uma ao grupo D (Tabelas 2 e 3).

As 12 amostras de *E. coli* estudadas no ARTIGO 1 apresentaram fímbria tipo 1 (*fimH*) e três delas apresentaram Iha, proteína que confere aderência similar a IrgA de *Vibrio cholerae*. Foi demonstrado também neste estudo, que podemos encontrar múltiplas adesinas em uma única amostra de *E. coli* comunitária e que diferentes marcadores de virulência podem ser encontrados em associação (amostra 47, Tabela 3).

Tabela 1. Sequências iniciadoras e condições utilizadas para os ensaios de PCR

Marcadores de virulência <sup>a</sup>	Sequências iniciadoras	Condições			Tamanho do fragmento (pb)	Controles +	Referências
		desnaturação	anelamento	extensão			
<i>stx</i> <sub>1</sub>	5'- GAA GAG TCC GTG GGA TTA CG- 3' 5'- AGC GAT GCA GCT ATT AAT AA- 3'	94 °C, 30 s	55 °C, 30 s	72 °C, 30 s	130	K12C600J	Pollard, <i>et al.</i> , 1990
<i>stx</i> <sub>2</sub>	5'- TTA ACC ACA CCC ACG GCA GT- 3' 5'- GCT CTG GAT GCA TCT CTG GT- 3'	94 °C, 30 s	55 °C, 30 s	72 °C, 30 s	346	K12C600W	Pollard, <i>et al.</i> , 1990
<i>fimH</i>	5' TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG 3' 5' GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA 3'	94 °C, 30 s	63 °C, 30 s	68 °C, 60 s	508	J96	Johnson e Stell, 2000
<i>cnf</i>	5' CTG GAC TCG AGG TGG TGG 3' 5' CTC CTG TCA ACC ACA GCC 3'	94 °C, 60 s	55 °C, 60 s	72 °C, 60 s	533	J96	Blanco <i>et al.</i> , 1996
SPATE	5'YAA YYT NAA YAA RMG NAT GGG 3' 5' RTT RTA YYT MCC RAA NGC NGA 3'	94 °C, 15 s	55 °C, 30 s	72 °C, 45 s	793	Ec 472/01	Parham <i>et al.</i> , 2005
<i>vat</i>	5' GAA CAC AGT TCA TCT GAT CTC C 3' 5' GAA TAT ATC AAA TTG GTC CCC C 3'	94 °C, 15 s	55 °C, 30 s	72 °C, 45 s	419	J96	Parham <i>et al.</i> , 2005
<i>espP</i>	5' AAA CAG CAG GCA CTT GAA CG 3' 5' GGA GTC GTC AGT CAG TAG AT 3'	94 °C, 30 s	52 °C, 60 s	72 °C, 50 s	1830	EDL932	Beutin <i>et al.</i> , 2005
<i>espl</i>	5' ATG GAC AGA GTG GAC ACA 3' 5' GCC ACC TTT ATT CTC ACC A 3'	94 °C, 30 s	52 °C, 60 s	72 °C, 50 s	560	EH250	Schmidt <i>et al.</i> , 2001

<sup>a</sup>, *stx*<sub>1</sub> e 2, toxina Shiga tipo 1 e 2; *fimH*, fímbria tipo 1; *cnf*, fator necrotizante citotóxico; SPATE, família de proteínas autotransportadoras; *vat*, autotransportador vacuolizante; *espP* e *espl*, serino proteases membros da família das SPATE.

Tabela 2. Marcadores de virulência presentes nas amostras de STEC

Origem (no de amostras) <sup>a</sup>	Sorotipo <sup>b</sup>	Toxina Shiga	Perfil de virulência <sup>c</sup>	Grupo Filogenético
HD	O26:H11	1	<i>eae, efa1, ehxA, iha, lpfA<sub>O113</sub>, toxB, SPATE</i>	B1
HD	O26:H11	1	<i>eae, efa1, ehxA, iha, lpfA<sub>O113</sub></i>	B1
BD	O55:H19	1	<i>iha, lpfA<sub>O113</sub>, saa, SPATE</i>	B1
HD	O111:H8	1	<i>eae, efa1, iha, lpfA<sub>O113</sub>, SPATE</i>	B1
HD (4)	O111:H8	1	<i>eae, efa1, iha, lpfA<sub>O113</sub></i>	B1*
HD	O111:H8	1	<i>eae, efa1, ehxA, lpfA<sub>O113</sub>, SPATE</i>	B1
HD	O111:H8	1	<i>eae, efa1, ehxA, iha, lpfA<sub>O113</sub>, SPATE</i>	B1
BS	O111:H8	1 + 2	<i>eae, efa1, ehxA, iha</i>	B1
BD (2)	O111:H8	1	<i>eae, efa1, iha, lpfA<sub>O113</sub>, SPATE</i>	B1
BS (3)	O111:H8	1	<i>eae, efa1, iha, lpfA<sub>O113</sub>, SPATE</i>	B1
BD	O111:H8	1	<i>eae, efa1, iha, lpfA<sub>O113</sub></i>	B1
HD (2)	O111:H8	1	<i>eae, efa1, iha, lpfA<sub>O113</sub>, SPATE</i>	B1
HD	O111:H11	1	<i>eae, iha, lpfA<sub>O113</sub></i>	B1
HD (6)	O111:HNM	1	<i>eae, efa1, iha, lpfA<sub>O113</sub></i>	B1
BD (2)	O118:H16	1	<i>eae, efa1, iha, lpfA<sub>O113</sub>, toxB, SPATE</i>	B1
HD	O118:H16	1	<i>eae, efa1, ehxA, iha, lpfA<sub>O113</sub>, toxB, SPATE</i>	B1
HD (2)	ONT:H2	1	<i>eae, efa1, ehxA, SPATE</i>	B1
BS	ONT:H49	1 + 2	<i>ehly, lpfA<sub>O113</sub>, saa, SPATE</i>	B1

<sup>a</sup>, HD, Humano com diarreia; BS, Fezes de bovino saudável; BD, Bovino com diarreia; <sup>b</sup>, NM, não móvel; NT, não tipável; <sup>c</sup>, *eae*, gene que codifica intimina; *ehxA*, gene que codifica enterohemolisina; *toxB*, proteína identificada a partir do plasmídeo O157 (pO157) da amostra Sakai; SPATE, gene que codifica proteína autotransportadora; *efa1*, fator de aderência de EHEC; *iha*, gene que confere aderência similar a IrgA de *Vibrio cholerae*, *lpfA<sub>O113</sub>*, fímbria polar longa; *saa*, adesina autoaglutinante; \*, Uma das amostras era pertencente ao grupo filogenético A.

Tabela 3. Marcadores de virulência presentes nas amostras de *E. coli* isoladas de infecção intestinais e extra-intestinais

Diagnóstico clínico <sup>a</sup>	Infecção hospitalar	<i>E. coli</i>	Sorotipo <sup>b</sup>	Toxina Shiga	<i>eae</i> <sup>c</sup>	Perfil de virulência <sup>d</sup>	Grupo Filogenético
GECA	Não	34/35	O102:H6	-	-	<i>fimH</i>	D
Pneumonia	Sim	36	ONT:HNM	-	-	<i>fimH</i>	A
Choque séptico	Sim	38	ONT:HNM	-	-	<i>fimH, iut, SPATE</i>	A
Sepse	Não	39	ONT:H27	-	-	<i>fimH</i>	A
ITU	Não	40	O4:H31	-	-	<i>fimH, iut, kpsMTII, SPATE, vat</i>	B2
ITU	Não	41	O102:H30	-	-	<i>fimH, kpsMTII</i>	D
ITU	Não	42	O1:HNM	-	-	<i>fimH, iha, iut, papC, SPATE</i>	B2
Colangite	Não	43	ONT:HNM	-	-	<i>fimH, kpsMTII</i>	A
ITU	Sim	44	ONT:H4	-	-	<i>fimH, iha, iut, SPATE</i>	B2
ITU	Sim	45	ONT:H31	-	-	<i>fimH, iut, kpsMTII, SPATE, vat</i>	D
ITU	Não	47	O6:H1	-	-	<i>fimH, cnf, hlyA, iha, iut, kpsMTII, papC, SPATE, vat</i>	B2

<sup>a</sup>, GECA, gastroenterocolite aguda; ITU, infecção do trato urinário; <sup>b</sup>, NM, não móvel; NT, não tipável; <sup>c</sup>, *eae*, gene que codifica intimina; <sup>d</sup>, *fimH*, fímbria tipo 1; *papC*, fímbria P associada a pielonefrite; *sfaS*, adesina fimbrial, *afa/dra*, adesinas da família das adesinas Afa/Dr; *iutA*, receptor da ferri-aerobactina; *kpsMTII*, síntese da cápsula tipo II; SPATE, família de proteínas autotransportadoras, *vat*, autotransportador vacuolizante; *iha*, proteína que confere aderência similar a IrgA de *Vibrio cholerae*; *cnf*, fator necrotizante citotóxico; *hlyA*, alfa-hemolisina.

#### **4. 2. Identificação de mesmo integron nos diferentes patotipos de *E. coli* estudados**

Nos trabalhos apresentados relatamos a presença de integrons inseridos em plasmídeos em 15 das 44 (34,1%) amostras estudadas. Foi interessante observar que a análise por PCR-RFLP das 15 amostras carreadoras de *int1* mostrou que 4 amostras de STEC (Ec120/00, 3691-5, 1919/81 e 502/80) pertencentes ao sorogrupo O111 e a *E. coli* extra-intestinal 47, todas isoladas de humanos, carreavam integrons com tamanho uniforme de aproximadamente 1400 pares de base (Figura 3). Estas amostras continham um único cassete gênico, *aadA1* conferindo resistência a estreptomicina (MIC  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ ) na região variável do integron (*int1F* - *aadA1* - *qacE $\Delta$ 1R*) o qual foi determinado por sequenciamento de DNA. Das 5 amostras que apresentaram idêntico integron, três delas, 1 amostra de *E. coli* extra-intestinal e 2 amostras de STEC apresentaram o integron inserido em bandas sugestivo de plasmídeos de alta massa molecular (ARTIGO 1 - Fig. 1B; ARTIGO 2 - Fig. 2B).

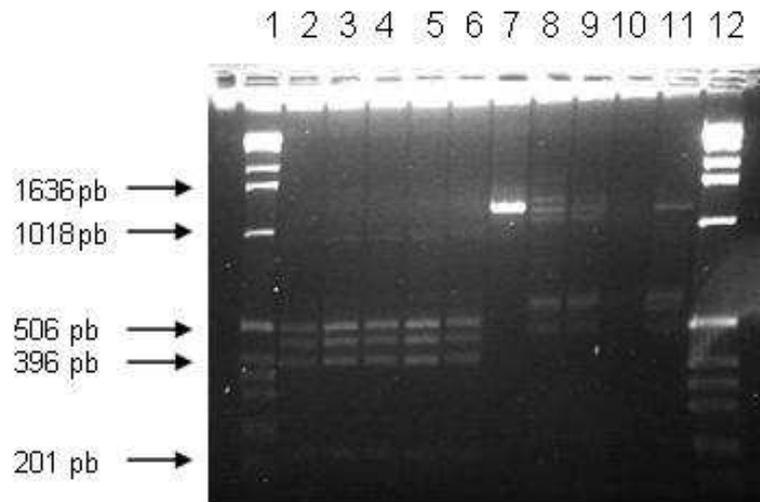


Figura 3. Representativo da análise PCR-RFLP das amostras de STEC e *E. coli* carreadoras de *int1*. Linhas 1 e 12, Marcador de massa molecular de 1 kb (Gibco); linhas 2 a 11, amostras de STEC Ec120/00, 3691-5, 1919/81 e 502/80 e amostras de *E. coli* associadas a infecções intestinal e extra-intestinal 47, 39, 34, 35, 36 e 44.

## **5. DISCUSSÃO**

---

---

## 5. DISCUSSÃO

Em nosso estudo reportamos as características moleculares da resistência a antimicrobianos e identificação de elementos genéticos móveis responsáveis pela transmissão de genes de resistência em amostras de *Escherichia coli* associadas a infecções intestinais e extraintestinais. Porém, como nosso trabalho envolvia a análise da diversidade genética de dois distintos patótipos, foram pesquisados marcadores de virulência frequentemente encontrados nesses dois grupos de *E. coli*.

De um modo geral, as proteínas produzidas pelas bactérias Gram-negativas são direcionadas para a superfície celular ou para o meio extracelular através de pelo menos 5 principais sistemas de secreção. As SPATE são proteases citotóxicas autosecretadas pelo sistema autotransportador da via de secreção tipo V tanto por *Shigella* ssp., *E. coli* uropatogênicas (UPEC) e por todas *E. coli* diarreioogênicas (HENDERSON *et al.*, 2004) induzindo a formação da inflamação e dano em mucosas (BOISEN *et al.*, 2009). No presente trabalho, SPATE foi encontrada tanto nas *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) como entre as amostras de *E. coli* associadas a infecções extraintestinais.

A maioria das STEC estudadas neste trabalho carregava o gene que codifica a adesina intimina (*eae*) e pertencia ao sorogrupo O111, porém haviam na nossa coleção apenas 2 amostras pertencentes ao sorogrupo O26 e nenhuma das amostras pertenciam ao sorogrupo O157 (Item 4. 1 - Tabela 2). Talvez isto possa explicar a ausência de um dos membros da família das SPATE, a serino-protease EspP. EspP, está amplamente disseminada entre as

---

---

amostras de STEC pertencentes ao sorogrupo O157 e também tem sido identificada entre as amostras pertencentes ao sorogrupo O26. EspP é codificada pelo plasmídeo O157, sendo capaz de clivar pepsina A e o fator V da coagulação humana. A degradação do fator V poderia contribuir com o sangramento da mucosa intestinal em pacientes com colite hemorrágica (BRUNDER *et al.*, 1997). VENTURINI e cols (2009) relataram a presença de EspP em amostra EHEC O26:HNM isolada de paciente com colite hemorrágica e SLANEC e cols (2009) analisando 75 STEC isoladas de alimento e água encontraram EspP em 28% delas sendo a maioria *eae* negativa.

A presença da sequência genética que codifica EspI, outro membro da família das SPATE, foi também analisada em nosso estudo, mas não foi detectada entre as amostras de STEC e demais amostras de *E. coli* estudadas (Item 4. 1 - Tabelas 2 e 3). A maioria das amostras de STEC estudadas é *eae* positiva e foram isoladas tanto de animais saudáveis como de pacientes que desenvolveram doença leve. MUNDY e cols (2004) e CREUZBURG e cols (2007) detectaram EspI em amostras de EPEC e EHEC, *eae* positivas pertencentes a diversos sorotipos e com maior frequência em pacientes com doença mais severa.

Vat é uma toxina com atividade vacuolizante descrita em *E. coli* patogênica aviária (APEC) (PARREIRA *et al.*, 2003), mas já foi descrita em UPEC e em *E. coli* associadas à meningite do recém nascido (MNEC). No presente trabalho, Vat foi detectado em 3 amostras de *E. coli* isoladas de bacteremia de pacientes com infecção do trato urinário (ITU) pertencentes aos grupos filogenéticos B2 e D. A presença de Vat tem sido identificada em amostras invasivas de *E. coli* isoladas de pacientes com cistite ou infecção

---

---

intestinal (HENDERSON *et al.*, 2004). JOHNSON e cols (2008a) reportaram Vat em amostras de ExPEC pertencentes ao grupo filogenético B2 isoladas das fezes e do sangue. RESTIERI e cols (2007) encontraram Vat em amostras de *E. coli* pertencentes à coleção ECOR, isoladas de ITU e em APEC predominantemente pertencentes ao grupo filogenético B2, embora também tenha sido encontrado em amostras A e D. PARHAM e cols (2005) relataram a presença de Vat em ExPEC isoladas de cistite, pielonefrite, prostatite e septicemia pertencentes aos grupos filogenéticos B2 e D.

A grande maioria das *E. coli* intestinal e extraintestinal expressa adesinas (fímbria do tipo 1, fímbria P, fímbria S e adesinas Afa/Dr) que são importantes durante o estágio inicial da colonização e formação de biofilme (ONG *et al.*, 2008). A aderência de *E. coli* ao uroepitélio é um fator que pode proteger as bactérias e impedir a retirada bacteriana pela micção aumentando a sua capacidade de multiplicar e invadir o tecido renal, promover a resistência à desidratação e oxidação e maior tolerância a detergentes e antibióticos. Amostras de *E. coli* com expressão de FimH tem sido associadas com cistite e pielonefrite (JOHNSON *et al.*, 2005a). Nos ambulatórios do Hospital das Clínicas da Universidade de Campinas foram coletadas 100 amostras de *E. coli* isoladas de pacientes apresentando quadro clínico de cistite e foi observado que todas as amostras eram positivas para FimH (TIBA *et al.*, 2009). No presente trabalho foi observado uma diversidade de sorotipos nas amostras de *E. coli* extraintestinais isoladas tanto de infecção comunitária como hospitalar em diferentes quadros clínicos e todas estas amostras apresentaram FimH.

Importante foi também analisar e identificar que uma das 12 amostras de *E. coli* estudadas causou infecção intestinal (amostra 34) e alcançou a corrente

---

---

sanguínea (amostra 35) de paciente admitido no hospital em choque séptico. Estas amostras apresentaram iguais perfis de resistência e virulência, e apresentaram 93,3% de similaridade através da análise por PFGE (ARTIGO 1). Este fato pode ser explicado, por exemplo, devido a ocorrência de mutação pontual, inserção ou deleção de DNA durante a multiplicação bacteriana (TENOVER *et al.*, 1995). Para entendermos melhor como esta bactéria comunitária pertencente ao grupo filogenético D e sorotipo O102:H6, que não apresentou *status* de ExPEC, e que foi isolada de paciente saudável com episódio isolado de diarreia e sem dano tecidual pode alcançar outro sítio anatômico experimentos adicionais serão realizados. Como dado complementar, a análise por PCR-RFLP apresentou que as amostras de *E. coli* 34 e 35 carregavam integrons com tamanho uniforme de aproximadamente 4200 pares de base (Item 4. 2 - Figura 3).

A presença de múltiplas adesinas e associação de diferentes marcadores de virulência foram encontrados em uma das amostras de *E. coli* estudadas no ARTIGO 1. A amostra de *E. coli* 47 isolada de sítio extraintestinal, definida como típica ExPEC, apresentou o maior potencial de virulência. Esta amostra foi isolada de uma mulher diabética de 67 anos de idade com o quadro clínico de ITU comunitária, pertencente ao grupo filogenético B2 e ao sorogrupo O6, frequentemente encontrado em amostras isoladas de pielonefrite (MOBLEY *et al.*, 1990). A associação de alguns marcadores de virulência foi encontrada, como alfa hemolisina (HlyA) - fímbria P (PapC) - fator citotóxico necrosante (Cnf), que é explicado por estarem presentes na mesma ilha de patogenicidade (PAI) (BINGEN-BIDOIS *et al.*, 2002; JOHNSON e STELL, 2000). HlyA (Item 8. 1) e Cnf são duas toxinas com

comprovada citotoxicidade aos tecidos. HlyA e Cnf facilitam a sobrevivência e contribuem para a toxicidade das UPEC durante a resposta inflamatória modulando a função dos leucócitos polimorfonucleares (SMITH *et al.*, 2008). A associação encontrada entre FimH e PapC em nosso estudo também era esperada uma vez que, amostras agrupadas nos grupos filogenéticos B2 e D, são conhecidas por possuírem maior número de fatores de virulência e estão associadas a infecções extraintestinais (TIBA *et al.*, 2009). Similar aos dados encontrados na amostra ExPEC 47, JOHNSON e cols (2005b) também relataram a presença da adesina homóloga a IrgA do *Vibrio cholerae* (Iha) em amostras de UPEC pertencentes ao sorotipo O6:H1 e ao grupo filogenético B2. Iha codifica uma proteína de membrana externa caracterizada em *E. coli* O157:H7, a qual confere aderência à amostras laboratoriais não aderentes (TARR *et al.*, 2000). Adicionalmente, SANTOS e cols (2009) analisaram a virulência de amostras de ExPEC, isoladas de bacteremia, em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. Ao contrário do parâmetro idade, o parâmetro sexo parece influenciar na seleção de amostras capazes de promover infecção. É possível que a diferença de anatomia da região peri-anal de homens e mulheres seja responsável pela alta incidência de infecções urinárias nas mulheres (XIE *et al.*, 2006). Assim, o desenvolvimento de infecção pode ser devido à presença de amostras contendo determinados marcadores de virulência e pertencentes aos grupos considerados mais virulentos, B2 e D. Ou então, indivíduos com comprometimento imunológico acentuado em função de sua doença de base propiciam a ocorrência de infecção por amostras de baixa virulência, ou comensais, dos grupos A e B1 (JOHNSON e RUSSO, 2002). No presente trabalho foram estudadas 2 amostras de *E. coli* que causaram

---

---

infecções comunitárias (*E. coli* 39 e 43) pertencentes aos grupos filogenéticos A, isoladas de pacientes com neoplasia de mama e de cólon, respectivamente. Adicionalmente, a amostra de *E. coli* 39 foi isolada do único paciente que foi a óbito dos 11 pacientes estudados. Esta amostra de *E. coli* apresentou características de amostra bacteriana comensal, resistente a 3 classes de antimicrobianos (estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina) que desenvolveu infecção comunitária com diagnóstico clínico de sepse em paciente que apresentava como doença de base neoplasia de mama e neutropenia febril (Item 4. 1- Tabela 3).

A presença do cassette gênico *aadA1* inseridos em integrons classe 1 observado nos dois patótipos de *E. coli* estudados foi também observado em outros estudos (MARTINEZ-FREIJO *et al.*, 1998 e 1999) e está amplamente disseminado entre amostras de ExPEC isoladas de humanos e animais (MAYNARD *et al.*, 2004). Adicionalmente, VINUÉ e cols (2008) relataram que indivíduos na comunidade podem ser reservatórios de integrons contidos em isolados de *E. coli*.

Diferente das amostras *E. coli* isoladas de sítios extraintestinais, terapia antimicrobiana geralmente não é recomendada no tratamento de infecções por STEC em humanos por poder aumentar a liberação da toxina livre durante a lise celular e induzir a expressão da mesma (YOH e HONDA, 1997; IGARASHI *et al.*, 1999). A utilização de agentes antimotilidade, narcóticos e drogas antiinflamatórias não esteróides também devem ser evitados. Por essas razões, a absorção ou neutralização da toxina seria uma boa opção na fase aguda da infecção por STEC (RAMAMURTHY, 2008). A seleção indireta de amostras STEC resistentes a antimicrobianos, assim como as *E. coli*

---

---

extraintestinais podem contribuir para a emergência de amostras resistentes e facilitar a disseminação de elementos móveis de resistência para outras bactérias.

Os achados relatados mostram a real capacidade de disseminação dos elementos genéticos em estudo e são bastante preocupantes, uma vez que esses eventos poderiam alcançar maiores proporções de disseminação, incluindo disseminação entre espécies. Adicionalmente, genes de resistência e virulência no mesmo elemento genético permitem a co-seleção de ambos determinantes em situação não infectiva e infectiva. Isto causaria um forte impacto clínico, pois, limitaria as opções terapêuticas para os casos de infecção nosocomial causadas por membros das *Enterobacteriaceae*.

Na tentativa de determinar o custo biológico “*fitness cost*” imposto sobre *E. coli* de linhagem laboratorial na aquisição de genes de resistência e virulência de amostras de *E. coli* escolhemos 2 STEC que apresentaram vários marcadores de virulência e 2 *E. coli* de origem intestinal e extraintestinal que apresentaram multiresistência a antimicrobianos. Os primeiros resultados apresentados mostraram um custo biológico pequeno a neutro às *E. coli* laboratoriais (ARTIGO 3). Porém, experimentos adicionais serão realizados para que possamos trabalhar com amostras receptoras que não pertençam ao mesmo grupo de incompatibilidade plasmidial e que não possuam mesmo marcador de resistência das amostras doadoras de plasmídeos.

Apesar da resistência a antimicrobianos ser mais frequentemente acompanhada de redução na taxa de crescimento e conseqüentemente redução na virulência bacteriana (ANDERSSON e LEVIN, 1999; GIRAUD *et al.*, 2003; ANDERSSON, 2006), seria interessante estudar amostras bacterianas

potencialmente virulentas e multiresistentes a antimicrobianos para determinar o custo biológico sobre amostras de *E. coli* laboratoriais após aquisição de plasmídeos das “*super bugs*” ou super bactérias.

## **6. CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES

- Foi detectado, pela primeira vez, integron classe 1 e *bla*<sub>TEM</sub> em amostras de STEC isoladas no Brasil assim como, amostras de *E. coli* associadas a infecções intestinais e extraintestinais resistentes a cefalosporinas de terceira geração carreadoras de ESBL do tipo CTX-M-14 e CTX-M-15.
- Este estudo leva a um melhor entendimento dos mecanismos de resistência em amostras de STEC e ExPEC, incluindo a detecção de genes que codificam resistência, a presença de integrons e outros elementos móveis responsáveis pela sua transmissão.
- A presença de multiresistência, tanto em amostras de STEC como em amostras de *E. coli* isoladas de sítios extraintestinais é preocupante, pois particularmente com relação às ExPEC poderia levar ao desenvolvimento de resistência a outros antimicrobianos, como recentemente descrito, aos carbapenens.
- Dentre os marcadores de virulência analisados, as amostras de *E. coli* associadas a infecções intestinais e extraintestinais resistentes a vários grupos de antimicrobianos apresentaram reduzido perfil de virulência.
- A aquisição de genes de resistência e/ou virulência das amostras de *E. coli* selecionadas interferiu muito pouco na capacidade das cepas de *E. coli* laboratoriais se multiplicarem e conseqüentemente se disseminarem.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarestrup, F. M.; Wegener, H. C. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes Infect. Rev.* 1999, 1, 639-644.

Ackman, D.; Marks, S.; Mack, P.; Caldwell, M.; Root, T.; Birkhead, G. Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epidemiol. Infect.* 1997, 119 (1), 1-8.

Afzal-Shah, M.; Woodford, N.; Livermore, D. M. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45 (2), 583-588.

Ahmed, A. M.; Kawamoto, H.; Inouye, K.; Hashiwata, Y.; Sakaki, M.; Seno, M.; Shimamoto, T. Genomic analysis of a multidrug-resistant strain of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 causing a family outbreak in Japan. *J. Med. Microbiol.* 2005, 54, 867-872.

Alonso, A.; Sánchez, P.; Martínez, J. L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol. Rev.* 2001, 3, 1-9.

Ambler, R. P. The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1980, 289, 321-331.

Andersson, D. I.; Levin, B. R. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol. Rev.* 1999, 2, 489-493.

Andersson, D. I. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003, 6, 452-456.

Andersson, D. I. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr. Opin. Microbiol. Rev.* 2006, 9, 461-465.

Antão, E. M.; Wieler, L. H.; Ewers, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens.* 2009, 1, 22.

Arakawa, Y.; Murakami, M.; Suzuki, K.; Ito, H.; Wacharotayankun, R.; Ohsuka, S.; Kato, N.; Ohta, M. A novel integron-like element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39 (7), 1612-1615.

Barthélémy, M.; Peduzzi, J.; Labia, R. Distinction between the primary structures of TEM-1 and TEM-2 beta-lactamases. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 1985, 136A, 311-321.

Bass, L.; Liebert, C. A.; Lee, M. D.; Summers, A. O.; White, D. G.; Thayer, S. G.; Maurer, J. J. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 29 (12), 2925-2929.

Bennett, P. M. Integron and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999, 43, 1-4.

Beutin, L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Med. Microbiol. Immunol.* 1991, 180, 167-182.

Beutin, L.; Kaulfuss, S.; Herold, S.; Oswald, E.; Schmidt, H. Genetic Analysis of Enteropathogenic and Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O103 strains by molecular typing of virulence and housekeeping genes and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43 (4), 1552-1563.

Bielaszewska, M.; Fell, M.; Greune, L.; Prager, R.; Fruth, A.; Tschäpe, H.; Schmidt, M. A.; Karch, H. Characterization of cytolethal distending toxin genes

and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect. Immun.* 2004, 72, 1812-1816.

Bingen-Bidois, M.; Clermont, O.; Bonacorsi, S.; Terki, M.; Brahim, N.; Loukil, C.; Barraud, D.; Bingen, E. Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect. Immun.* 2002, 70(6), 3216-3226.

Bischoff, K. M.; White, D. G.; Hume, M. E.; Poole, T. L.; Nisbet, D. J. The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005, 243 (1), 285-291.

Björkman, J.; Andersson, D. I. The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug Resist. Updat.* 2000, 3 (4), 237-245.

Blanco, M.; Blanco, I. E.; Blanco, J.; Alonso, M. P.; Balsalobre, C.; Mouriño, M.; Madrid, C.; Juárez, A. Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strain producing cytotoxin necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). *J. Microbiol. Methods.* 1996, 26, 95-101.

Boisen, N.; Ruiz-Perez, F.; Scheutz, F.; Krogfelt, K. A.; Nataro, J. P. High prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009, 80, 294-301.

Bonnet, R.; De Champs, C.; Sirot, D.; Chanal, C.; Labia, R.; Sirot, J. Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43, 2671-2677.

Bonnet, R.; Sampaio, J. L. M.; Labia, R.; De Champs, C.; Sirot, D.; Chanal, C.; Sirot, J. A. Novel CTX-M  $\beta$ -lactamase (CTX-M-8) in Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44, 1936-1942.

Bonnet, R.; Dutour, C.; Sampaio, J. L. M.; Chanal, C.; Sirot, D.; Labia, R.; De Champs, C.; Sirot, J. Novel Cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-2403Gly. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45 (8), 2269-2275.

Bonnet, R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 1-14.

Bou, G.; Oliver, A.; Martínez-Beltrán, J. OXA-24, a novel class D  $\beta$ -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44 (6), 1556-1561.

Bouma, J. E.; Lenski, R. E. Evolution of a bacteria/plasmid association. *Nature.* 1988, 335 (6188), 351-352.

Bradford, P. A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001, 14, 933-951.

Brown, H. J.; Stokes, H. W.; Hall, R. M. The integron In0, In2 e In5 are defective transposon derivatives. *J. Bacteriol.* 1996, 178, 4429-4437.

Brunder, W.; Schmidt, H.; Karch, H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol. Microbiol.* 1997, 24, 767-778.

Bryskier, A.; Chantot, J. F. Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. *Drugs.* 1995, 49 (2), 16-28.

Bush, K.; Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39, 1211-1233.

Bush, K. New beta-lactamase in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 32, 1085-1089.

Bush, K. The impact of beta-lactamase on the development of novel antimicrobial agents. *Curr. Opin. Investig. Drugs. Rev.* 2002, 3, 1284-1290.

Cartelle, M.; Del Mar, T. M.; Molina, F.; Moure, R.; Villanueva, R.; Bou, G. High-level resistance to ceftazidima conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 2308-2313.

Castanheira, M.; Pereira, A. S.; Nicoletti, A. G.; Pignatari, A. C.; Barth, A.L.; Gales, A. C. First report of plasmid-mediated qnrA1 in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, 51 (4), 1527-1529.

Cergole-Novella, M. C.; Nishimura, L. S.; Santos, L. F.; Irino, K.; Vaz, T. M. I.; Bergamini, A. M. M.; Guth, B. E. C. Distribution of virulence profiles related to newtoxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007, 274 (2), 329-334.

Chang, C. Y.; Chang, L. L.; Chang, Y. H.; Lee, T. M.; Chang, S. F. Characterization of drug resistance gene cassettes associated with class 1 integrons in clinical isolated of *Escherichia coli* from Taiwan, ROC. *J. Med. Microbiol.* 2000, 49, 1097- 1102.

Chiew, Y. F.; Yeo, S. F.; Hall, L. M. C.; Livermore, D. M. Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting its use? The case of streptomycin versus Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998, 41, 247-251.

Collis, C. M.; Hall, R. M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39 (1), 155-162.

Creuzburg, K.; Schmidt, H. Molecular characterization and distribution of genes encoding members of the type III effector NleA family among pathogenic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45, 2498-2507.

Dahlberg, C.; Lin, C. Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12. *Genetics.* 2003, 165, 1641-1649.

Danel, F.; Hall, L. M. C.; Duke, B.; Gur, D.; Livermore, D. M. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10  $\beta$ -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43 (6), 1362-1366.

Domagala, J. M.; Hanna, L. D.; Heifetz, C. L.; Hutt, M. P.; Mich, T. F.; Sanchez, J. P.; Solomon, M. New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. *J. Med. Chem.* 1986, 29 (3), 394-404.

Doughty, S.; Sloan, J.; Bennet-Wood, V.; Robertson, M.; Robins-Browne, R. M.; Hartland, E. identification of a novel fimbrial gene related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2002, 70, 6761-6769.

Dubois, V.; Arpin, C.; Quentin, C.; Texier-Maugein, J.; Poirel, L.; Nordmann, P. Decreased susceptibility to cefepime in a clinical strain of *Escherichia coli* related to plasmid and integron-encoded OXA-30  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47 (7), 2380-2381.

Enne, V. I.; Livermore, D. M.; Stephens, P.; Hall, L. M. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. 2001, *Lancet*, 357, 1325-1328.

Enne, V. I.; Delson, A. A.; Roe, J. M. *et al.* Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004, 53, 203-207.

Enne, V. I.; Delsol, A. A.; Davis, G. R.; Hayward, S. L.; Roe J. M.; Bennett, P. M. Assessment of the fitness impacts on *Escherichia coli* of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. J. Antimicrob. Chemother. 2005, 56, 544-551.

Fluit, A. C.; Schmitz, F. J. Class 1 integron, genes cassettes, mobility, and epidemiology. Eur. J. Clin. Microbiol. 1999, 18, 761-770.

Fluit, A. C.; Schmitz, F. J. Resistance integrons and superintegrons. Eur. J. Clin. Microbiol. Rev. 2004, 10, 272-288.

Giraud, E.; Cloeckert, A.; Baucheron, S. *et al.* Fitness cost of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Med. Microbiol. 2003, 52, 697-703.

Gniadkowski, M. Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. Clin. Microbiol. Infect. Rev. 2008, 14 (1), 11-32.

Gordon, D. M.; Riley, M. A. A theoretical and experimental analysis of bacterial growth in the bladder. Mol. Microbiol. 1992, 6, 555-562.

Grape, M.; Farra, A.; Kronvall, G.; Sundström, L. Integrons and gene cassettes in clinical isolated of co-trimexazole-resistant Gram-negative bacteria. Clin. Microbiol. Infect. 2005, 11, 185-192.

Guerra, B.; Junker, E.; Schroeter, A.; Helmuth, R.; Guth, B. E. C.; Beutin, L. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* O111 isolated. J. Antimicrob. Chemother. 2006, 57, 1210-1214.

Guillemot, D.; Carbon, C.; Balkau, B.; Geslin, P.; Lecoœur, H.; Vauzelle-Kervroëdan, F.; Bouvenot, G.; Eschwège, E. Low dosage and long treatment duration of beta-lactam: risk factors for carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. JAMA. 1998, 279 (5), 365-370.

Hall, R. M.; Brookes, D. E.; Stokes, H. W. Site-specific insertion of genes into integrons: roles of the 59-base element and determination of the recombination crossover point. *Mol. Microbiol.* 1991, 5, 1941-1959.

Hall, R. M. E; Stokes, H. W. Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genet. Rev.* 1993, 90, 115-132.

Hall, R. M. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotics resistance genes in Gram-negative bacteria. *Ciba Foundation Symposium.* 1997, 207, 192-205.

Heikkilä, E.; Skurnik, M.; Sundström, L.; Huovinen, P. A novel dihydrofolate reductase cassette inserted in an integron borne on a Tn21-like element. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993, 37 (6), 1297-1304.

Henderson, I. R.; Navarro-Garcia, F.; Desvaux, M.; Fernandez, R. C.; Ala'Aldeen, D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004, 68, 692-744.

Hernandez, J. R.; Martínez-Martínez, L.; Cantón, R.; Coque, T. M.; Pascual, A.; Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49 (5), 2122-2125.

Hochhut, B.; Lotfi, Y.; Mazel, D.; Faruque, S. M.; Woodgate, R.; Waldor, M. K. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 2991-3000.

Hooper, D. C. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis. Rev.* 2000, 31 (2), 24-28.

Hooper, D. C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg. Infect. Dis. Rev.* 2001, 7 (2), 337-341.

Huletsky, A.; Knox, J. R.; Levesque, R. C. Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamase probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 3690-3697.

Humeniuk, C.; Guillaume, A.; Valerie, G.; Patrick, G.; Roger, L.; Alain, P.  $\beta$ -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, 46 (9), 3045-3049.

Igarashi, T.; Inatomi J.; Wake A.; Takamizawa M.; Katayama H. E Iwata T. Failure of pre-diarrheal antibiotics to prevent hemolytic uremic syndrome in serologically proven *Escherichia coli* O157:H7 gastrointestinal infection. *J. Pediatr.* 1999, 135, 768-769.

Ishii, Y.; Kimura, S.; Alba, J.; Shiroto, K.; Otsuka, M.; hashizume, N.; Tamura, K; Yamaguchi, K. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Shiga toxin gene (*stx*<sub>1</sub>)-positive *Escherichia coli* O26:H11: a new concern. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 1072-1075.

Johnson, J. R.; Moseley, S.; Roberts, P.; Stamm, W. E. Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. *Infect. Immun.* 1988, 56, 405-412.

Johnson, J. R.; Stell, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.* 2000, 181, 261-272.

Johnson, J. R.; Russo, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". *J. Lab. Clin. Med. Rev.* 2002, 139(3), 155-162.

Johnson, J. R.; Kuskowski, M. A.; Owens, K.; Gajewski, A.; Winokur, P. L. Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extend-spectrum cephalosporins and cephamycins

among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. J. Infect. Dis. 2003, 188, 759-768.

Johnson, J. R.; Kuskowski, M.A.; Gajewski, A. *et al.* - Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. J. Infect. Dis. 2005a, 191, 46-50.

Johnson, J. R., Jelacic, S.; Schoening, L. M.; Clabots, C.; Shaikh, N.; Mobley, H. L. T.; Tarr, P. I. The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. Infect. Immun. 2005b, 73, 965–971.

Johnson, J. R.; Johnston, B.; Kuskowski, M. A.; Nougayrede, J. P.; Oswald, E. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* *pks* genomic island. J. Clin. Microbiol. 2008a, 46, 3906-3911.

Johnson, T. J.; Wannemuehler, Y.; Johnson, S. J.; Stell, A. L.; Doetkott, C.; Johnson, J. R.; Kim, K. S.; Spanjaard, L.; Nolan, L. K. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 2008b, 74 (22), 7043-7050.

Kang, H. Y.; Jeong, Y. S.; Oh, J.Y.; Tae, S. H.; Choi, C. H.; Moon, D. C.; Lee, W. K.; Lee, Y. C.; Seol, S. Y.; Cho, D. T.; Lee, J. C. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. J. Antimicrob. Chemother. 2005, 55, 639-644.

Kaper, J. B.; J. B.; Nataro, J. P.; Harry L. T.; Mobley, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2004, 2, 123-140.

Khan, A.; Das, S. C.; Ramamurthy, T.; Sikdar, A.; Khanam, J.; Yamasaki, S.; Takeda, Y.; Nair, G. B. Antibiotic resistance, virulence gene, and molecular

profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources in Calcutta, India. J. Clin. Microbiol. 2002, 40, 2009-2015.

Kon, M.; Kurazono, T.; Ohshima, M.; Yamaguchi, M.; Morita, K.; Watanabe, N.; Kanamori, M.; Matsushita, S. Cefotaxime-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 isolated from a patient with diarrhea. Kansenshogaku Zasshi. 2005, 79 (3), 161-168.

Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C.; Jr. W. C. W. *Enterobacteriaceae*. In: Diagnóstico microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 5 ed. Editora Médica e Científica Ltda - MDSI, Rio de Janeiro, RJ. 2001, 177-261.

Leshner, G. Y.; Froelich, E. J.; Gruett, M. D., Bailey, J. H., Brundage, R. P. 1,8-naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. J. Med. Pharm. Chem. 1962, 91, 1063-1065.

Lévesque, C.; Piché, L.; Larose, C.; Roy, P. H. PCR Mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob. Agents Chemother. 1995, 39 (1), 185-191.

Levy, S. B. Antibiotic Resistance: Consequences of Inaction. Clin. Infect. Dis. 2001, 33 (3), 124-129.

Linares-Rodríguez, J. F.; Martínez-Menéndez, J. L. Antimicrobial resistance and bacterial virulence. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2005, 23, 86-93.

Livermore, D. M. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. Scand. J. Infect. Dis. 1991, 78, 7-16.

Livermore, D. M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. 1995, 8, 557-584.

Livermore, D. M. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. Clin. Microbiol. Infect. 2008, 14 (1), 3-10.

Marchandin, H.; Carriere, C.; Sirot, D.; Pierre, H. J.; Darbas, H. TEM-24 produced by four different species of Enterobacteriaceae, including *Providencia rettgeri*, in a single patient. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43, 2069-2073.

Martinez-Freijo, P.; Fluit, A. C.; Schmitz, F. J.; Grek, V. S.; Verhoef, J.; Jones, M. E. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998, 42, 689-696.

Martinez-Freijo, P., Fluit, A. C.; Schmitz, F. J.; Verhoef, J.; Jones, M.E.;. Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43, 686-689.

Martínez, J. L.; Baquero, F. Genetic linkage of antibiotic resistance and bacterial virulence. *APUA Newsletters.* 1988, 6, 1-3.

Martínez, J. L.; Baquero, F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, 15, 647-679.

Martinez-Martinez, L.; Pascual, A.; Jacoby, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* 1998, 351, 797-799.

Mazel, D.; Dychinco, B.; Webb, V. A.; Davies, J. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science.* 1998, 280, 605-608.

Maynard, C.; Bekal, S.; Sanschagrín, F.; Levesque, R. C.; Brousseau, R.; Masson, L.; Larivière, S.; Harel, J. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 5444-5452.

Medeiros, A. A. Evolution and dissemination of beta-lactamase accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis. Rev.* 1997, 24 (1), S19-S45.

Meng, J.; Doyle, M. P. Microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* Foods. In: Kaper, J.B. e O'Brien, A. D. (Ed), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D. C. 1998, 92-108.

Minarini, L. A. R.; Camargo, I. L. B. C.; Pitondo-Silva, A.; Darini, A. L. C. Multilocus sequence typing of uropathogenic ESBL producing *Escherichia coli* isolated in a Brazilian community. *Curr. Microbiol.* 2007, 55, 524-529.

Mobley, H. L.; Green, D. M.; Trifillis, A. L.; Johnson, D. E.; Chippendale, G. R.; Lockett, C. V.; Jones, B. D.; Warren, J. W. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect. Immun.* 1990, 58, 1281-1289.

Morabito, S.; Tozzoli, R.; Caprioli, A.; Karch, H.; Carattoli, A. Detection and characterization of class 1 integrons in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microb. Drug. Resist.* 2002, 8 (2), 85-91.

Morosini, M. I.; Canton, R.; Martinez-Beltran, J.; Negri, M. C.; Perez-Diaz, J. C.; Baquero, F.; Blazquez, J. New extended-spectrum TEM-type beta-lactamase from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated in a nosocomial outbreak. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39, 458-461.

Moulin-Schouleur, M.; Schouleur, C.; Tailliez, P.; Kao, M. R.; Bre´e, A.; Germon, P.; Oswald, E.; Mainil, J.; Blanco, M.; Blanco, J. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44 (10), 3484–3492.

Munday, C. J.; Xiong, J.; Li, C.; Shen, D.; Hawkey, P. M. Dissemination of CTX-M type beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolates in the People's Republic of China. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2004, 23(2), 175-180.

Mundy, R.; Jenkins, C.; Yu, J.; Smith, H.; Frankel, G. Distribution of *espI* among clinical enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J. Med. Microbiol.* 2004, 53, 1145-1149.

Naas, T.; Sougakoff, W.; Casetta, A.; Nordmann, P. Molecular characterization of OXA-20, a novel class d  $\beta$ -lactamase, and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42 (8), 2074-2083.

Nagachinta S.; Chen, J. Transfer of class 1 integron-mediated antibiotic resistance genes from shiga toxin-producing *Escherichia coli* to a susceptible *E. coli* K-12 strain in storm water and bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74 (16), 5063-5067.

Nagachinta, S.; Chen, J. Integron-mediated antibiotic resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Food Prot.* 2009, 72, 21-27.

Nataro, J. P.; Kaper, J. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11, 142-201.

Nešvera, J.; Hochmannová, J.; Pátek, M. An integron of class 1 is present of the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998, 169, 391-395.

Nicholls, I.; Travis, H. G.; Robins-Browne, R. M. Identification of a novel genetic locus that is required for vitro adhesion of a clinical isolated of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 2000, 35 (2), 275-288.

Nordmann, P.; Poirel, L.; Kubina, M., Casetta, A.; Naas, T. Biochemical-Genetic Characterization and distribution of OXA-22, a chromosomal and inducible

Class D  $\beta$ -lactamase from *Ralstonia (Pseudomonas) pickettii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44 (8), 2201–2204.

Ong, C. L.; Ulett, G. C.; Mabbett, A. N.; Beatson, A. S.; Webb, R. I.; Monaghan, W.; Nimmo, G. R.; Looke, D. F.; McEwan, A. G.; Schembri, M. A. Identification of type 3 fimbriae in Uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2008, 190, 1054-1063.

Palzkill, T.; Thomson, K. S.; Sanders, C. C.; Moland, E. S.; Huang, W.; Milligan, T. W. New variant of TEM-10 beta-lactamase gene produced by a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39, 1199-1200.

Parham, N. J.; Pollard, S. J.; Desvaux, M.; Scott-Tucker, A.; Liu, C.; Fivian, A.; Henderson, I. R. Distribution of the serine protease autotransporters of the *Enterobacteriaceae* among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 4076-4082.

Parreira, V. R.; Gyles, C. L. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infect. Immun.* 2003, 71, 5087-5096.

Partridge, S. R.; Recchia, G. D.; Scaramuzzi, C.; Collis, C. M.; Stokes, H. W.; Hall, R. M. Definition of the *attI* 1 site of class 1 integrons. *Microbiol.* 2000, 146 (11), 2855-2864.

Partridge, S. R.; Brown, H. J.; Hall, R. M. Characterization and movement of the class 1 integron know as Tn2521 and Tn1405. *Antimicrob. Agents Chemother. Rev.* 2002, 46, 1288-1294.

Paterson, D. L.; Bonomo, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, 18, 657-686.

Paton, J. C.; Paton, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. Clin. Microbiol. Rev. 1998, 11, 450-470.

Paton, A. W.; Srimanote, P.; Woodrow, M. C.; Paton, J. C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infect. Immun. 2001, 69, 6999-7009.

Paulsen, I. T.; Littlejohn, T. G.; Rådström, P.; Sundström, L.; Sköld, O.; Swedberg, G.; Skurray, R. A. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. Antimicrob. Agents Chemother. 1993, 37 (4), 761-768.

Perez, F.; Endimiani, A.; Hujer, K. M.; Bonomo, R. A. The continuing challenge of ESBLs. Curr. Opin. Pharmacol. Rev. 2007, 7, 459-469.

Perilli, M.; Segatore, B.; De Massis, M. R.; Bianchi, C.; Zollo, A.; Rossoloni, G. M.; Amicosante, G. TEM-72, a new extended-spectrum beta-lactamase detected in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* in Italy. Antimicrob. Agents Chemother. 2000, 44, 2537-2539.

Philippon, L. N.; Naas, T.; Bouthors, A. T.; Barakett, V.; Nordmann, P. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 1997, 41 (10) 2188-2195.

Poirel, L.; Gniadkowski, M.; Nordmann, P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. J. Antimicrob. Chemother. 2002, 50 (6), 1031-1034.

Pollard, D. R.; Johnson, W. M.; Lior, H.; Tyler, S. D.; Rozee, K. R. Differentiation of Shiga toxin and vero cytotoxin type 1 genes by polymerase chain reaction. J. Infect. Dis. 1990, 162, 1195-1198.

Pournaras, S.; Ikonomidis, A.; Kristo, L.; Tsakris, A.; Maniatis, A. N. CTX-M enzymes are the most common extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Escherichia coli* in a tertiary Greek hospital. J. Antimicrob. Chemother. 2004, 54, 574-575.

Ramamurthy, T. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): the bug in our backyard. Indian J. Med. Res. 2008, 128, 233-236.

Restieri, C.; Garriss, G.; Locas, M. C.; Dozois, C. M. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73, 1553-1562.

Reynolds, M. G. Compensatory evolution in rifampin resistant *Escherichia coli*. Genetics. 2000, 156, 1471-1481.

Richmond, M. H.; Sykes, R. B. The beta-lactamases of Gram-negative bacteria and their possible physiological role. Adv. Microb. Physiol. 1973, 9, 31-88.

Russo, T. A.; Johnson, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. J. Infect. Dis, 2000, 181, 1753-1754.

Rossolini, G. M.; D'Andrea, M. M.; Mugnaioli, C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. Clin. Microbial. Infect. Rev. 2008, 14 (1), 33-41.

Sáenz, Y.; Briñas, L.; Dominguez, E.; Ruiz, J.; Zarazaga, M.; Vila, J.; Torres, C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. Antimicrob Agents Chemother. 2004, 48 (10), 3996-4001.

Sallen, B.; Rajoharison, A.; Desvarenne, S.; Mabilat, C. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolated of *Enterobacteriaceae*. *Microb. Drug Resist.* 1995, 1, 195-202.

Sanchez, S.; Stevenson, M. A. M.; Hudson, C. R.; Maier, M.; Buffington, T.; Dam, Q.; Maurer, J. J. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40 (10), 3586-3595.

Sandvang, D. Novel streptomycin and spectinomycin resistance gene as a gene cassette within a class 1 integron isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999, 43 (12), 3036-3038.

Santos, A. C. M.; Zidko, A. C. M.; Pignatari, A. C. C.; Gales, A. C.; Silva, R. M. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. *O Mundo da Saúde, São Paulo.* 2009, 33 (4), 392-400.

Schmidt, H.; Zhang, W. L.; Hemmrich, U.; Jelacic, S.; Brunder, W.; Tarr, P. I.; Dobrindt, U.; Hacker, J.; Karch, H. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at selC in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2001, 69 (11), 6863-6873.

Schrag, S. J.; Perrot, V.; Levin, B. R. Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1997, 264, 1287-1291.

Singh, R.; Schroeder, C. M.; Meng, J.; White, D. G.; McDermott, P. F.; Wagner, D. D.; Yang, H.; Simjee, S.; DebRoy, C.; Walker, R. D.; Zhao, S. Identification of antimicrobial resistance and class 1 integrons in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* recovered from humans and food animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, 56, 216-219.

Siu, L. K.; Lo, J. Y. C.; Yuen, K. Y.; Chau, P. Y.; Ng, M. H.; Ho, P. L.  $\beta$ -Lactamases in *Shigella flexneri* Isolates from Hong Kong and Shanghai and a novel OXA-1-like  $\beta$ -lactamase, OXA-30 Antimicrob. Agents Chemother. 2000, 44 (8), 2034-2038.

Slanec, T.; Fruth, A.; Creuzburg, K.; Schmidt, H. Molecular analysis of virulence profiles and Shiga toxin genes in food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 2009, 75, 6187-6197.

Smith, Y. C.; Rasmussen, S. B.; Grande, K. K.; Conran, R. M.; O'Brien, A. D. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. Infect. Immun. 2008, 76 (7) 2978-2990.

Sougakoff, W.; Goussard, S.; Gerbaud, G.; Courvalin, P. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by mutations in TEM-type penicillinase genes. Rev. Infect. Dis. 1988, 10, 879-884.

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

Sunde, M. Prevalence and characterization of class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. J. Antimicrob. Chemother. 2005, 56, 1019-1024.

Sundström, L.; Rådström, P.; Swedberg, G.; Sköld, O. Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim - and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of *dhfrV* and *sulI* and a recombination active locus of Tn21. Mol. Gen. Genet. 1988, 213 (2-3), 191-201.

Sundström, L.; Sköld, O. The *dhfrI* trimethoprim resistance gene of Tn7 can be found at specific sites in other genetic surroundings. Antimicrob. Agents Chemother. 1990, 34 (4), 642-650.

Tarr, P. I.; Bilge, S. S.; James, C.; Vary, J. C.; Jelacic, S.; Habeeb, R. L.; Ward, T. R.; Baylor, T. E.; Besser, M. R. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect. Immun.* 2000, 68, 1400-1407.

Tenover, F. C.; Arbeit, R. D.; Goering, R. V.; Mickelsen, P. A.; Murray, B. E.; Persing, D. H.; Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2233-2239.

Tessier, F.; Aspin, C.; Allery, A.; Quentin, C. Molecular characterization of a TEM-21 beta-lactamase in a clinical isolate of *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 2125-2127.

Tiba, M. R.; Nogueira, G. P.; Leite, D. S. Study on virulence factors associated with biofilm formation and phylogenetic groupings in *Escherichia coli* strains isolated from patients with cystitis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2009, 42, 58-62.

Tran, J. H.; Jacoby, G. A. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002, 99 (8), 5638-5642.

Turner, P. J. Extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Infect. Dis.* 2005, 41 (4), S273-S275.

Tzouveleki, L. S.; Bonomo, R. A. SHV-type beta-lactamase. *Curr. Pharm. Des.* 1999, 5, 847-864.

Varma, J. K.; Greene, K. D.; Reller, M. E.; DeLong, S. M.; Trottier, J.; Nowicki, S. F.; DiOrio, M.; Koch, E. M.; Bannerman, T. L.; York, S. T.; Lambert-Fair, M. A.; Wells, J. G.; Mead, P. S. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *JAMA.* 2003, 290 (20), 2709-2712.

Venturini, C.; Beatson, S. A.; Djordjevic, S. P.; Walker, M. J. Multiple antibiotic resistance gene recruitment onto the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* virulence plasmid. *FASEB J.* 2009, [Epub ahead of print].

Vinué, L.; Sáenz, Y.; Somalo, S.; Escudero, E.; Moreno, M. A.; Ruiz-Larrea, F.; Torres, C. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008, 62 (5), 934-937.

Xie J, Foxman B, Zhang L, Marrs CF. Molecular epidemiologic identification of *Escherichia coli* genes that are potentially involved in movement of the organism from the intestinal tract to vagina and bladder. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44(7), 2434-2441.

Warren, R. E.; Ensor, V. M.; O'Neill, P.; Butler, V.; Taylor, J.; Nye, K.; Harvey, M.; Livermore, D. M.; Woodford, N.; Hawkey, P. M. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008, 61, 504-508.

White, P. A.; Mciver, C. J.; Deng, Y. M.; Rawlinson, W. D. Characterization of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfra17*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000, 182, 265-269.

White, D. G.; Zhao, S.; McDermott, P. F.; Ayres, S.; Gaines, S.; Friedman, S.; Wagner, D. D.; Meng, J.; Needle, D.; Davis, M.; DebRoy, C. Characterization of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* O111 isolates of animal and human origin. *Microb. Drug Resist.* 2002, 8 (2), 139-146.

Wichelhaus, T. A.; Boddington, B.; Besier, S. *et al.* Biological cost of rifampicin resistance from the perspective of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, 46, 3381-3385.

Winokur, P. L.; Canton, R.; Casellas, J. M.; Legakis, N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 32 (2), S94-103.

Yan, J. J.; Hsueh, P. R.; Lu, J. J.; Chang, F. Y.; Shyr, J. M.; Wan, J. H.; Liu, Y. C.; Chuang, Y. C.; Yang, Y. C.; Tsao, S. M.; Wu, H. H.; Wang, L. S.; Lin, T. P.; Wu, H. M.; Chen, H. M.; Wu, J. J. Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases and plasmid-mediated ampC enzymes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from seven medical centers in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50 (5), 1861-1864.

Yoh, M. e Honda, T. The stimulating effect of fosfomicin, an antibiotic in common use in Japan, on the production/release of verotoxin-1 from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 *in vitro*. *Epidemiol. Infect.* 1997, 119, 101-103.

Zhao, S.; White, D. G.; Beilei, G.; Ayres, S.; Friedman, S.; English, L.; Wagner, D.; Stuart, G.; Meng, J. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 1558-1564.

Zinner, S. H. Changing epidemiology of infections in patients with neutropenia and cancer: emphasis on Gram-positive and resistant bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 1999, 29 (3), 490-494.

## **8. APÊNDICE**

## 8. APÊNDICE

### 8. 1. Produção de $\alpha$ -hemolisina (Hly<sub>a</sub>)

Para a pesquisa de atividade hemolítica, 5  $\mu$ L de um crescimento de 18 horas das amostras bacterianas em caldo triptona de soja (TSB) foram inoculados em placas de meio de base para ágar sangue (Difco), acrescido de NaCl<sub>2</sub> a 10 mM e 5% de sangue desfibrinado de carneiro lavado três vezes em PBS. As placas foram incubadas a 37 °C e observadas após 3 e 18 horas para detecção da produção de  $\alpha$ -hemolisina, respectivamente (BEUTIN *et al.*, 1991). Nos testes foram incluídos os seguintes controles: *E. coli* K12 DH5 $\alpha$  (não-hemolítica) e *E. coli* U4-41 ( $\alpha$ -hemolisina).

## **9. ANEXOS**

## **9. 1. Ofício do orientador brasileiro pós-estágio doutorado-sanduíche**

São Paulo, 25 de setembro de 2009

**Maria Luiza de Santana Lombas**  
**Coordenadora de Acompanhamento de Bolsas no Exterior**

Prezada Coordenadora:

Maria Cecília Cergole Novella, aluna de doutorado do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica – LEMC da Disciplina de Infectologia, Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, sob a minha orientação, realizou estágio no período de Maio a Setembro de 2009 no *Bristol Centre for Antimicrobial Research and Evaluation (BCARE), Department of Cellular & Molecular Medicine, School of Medical Sciences, University of Bristol, University Walk Bristol*, Inglaterra sob a orientação da Dra. Vicky Enne.

O estágio foi realizado para o desenvolvimento do experimento de *fitness cost* imposto sobre cepas de *E. coli* laboratoriais e sobre amostras de *E. coli* comensais isoladas de animal e humano conforme descrito abaixo.

- a. PCR para confirmar a presença de genes de resistência carregados por plasmídeos.
- b. PCR inc/rep para agrupamento plasmidial de acordo com os genes de replicação e incompatibilidade.

- c. Transferência dos plasmídeos das amostras de STEC e ExPEC inseridos na *E. coli* K12 DH5 $\alpha$  para *E. coli* K12 JM109, para *E. coli* 345-2RifC comensal isolada de animal e para *E. coli* HS comensal isolada de humano.
- d. Determinação do *fitness cost* sobre duas diferentes amostras hospedeiras.

A aluna cumpriu essa etapa do seu projeto de doutorado que terá continuidade no nosso laboratório LEMC/ALERTA. Trata-se de metodologia ainda não utilizada em nosso meio e que poderá trazer contribuição significativa na nossa linha de pesquisa em resistência bacteriana a antimicrobianos.

Agradeço o apoio da CAPES para a viabilização do estágio no exterior da aluna e permaneço à disposição para o envio de outras informações que julgarem relevantes.



**Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari**  
**Diretor do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica**  
**Disciplina de Infectologia**  
**EPM - UNIFESP**

## **9. 2. Ofício do orientador estrangeiro pós-estágio doutorado-sanduíche**

**Dr. V I Enne**

Research Fellow in Microbiology  
Dept of Cellular and Molecular Medicine  
School of Medical Sciences  
University Walk  
Bristol BS8 1TD  
United Kingdom  
T +44 (0)117 331 2036  
F +44 (0)117 928 7896  
v.i.enne@bristol.ac.uk

Monday 2<sup>nd</sup> November 2009

To whom it may concern

Maria Cecília Cergole Novella spent some time working in my laboratory at the Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, United Kingdom, for a research project to form part of her doctoral studies, between May 2009 and September 2009. Ms. Cergole Novella was working on a project investigating the fitness cost and other properties of antimicrobial resistance and virulence plasmids from ExPEC and STEC strains of *Escherichia coli* entitled “Determinação do custo biológico “fitness cost” na aquisição de genes de resistência e virulência em *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *Escherichia coli* patogênicas extraintestinal (ExPEC) isoladas no Estado de São Paulo”.

Cecilia completed a considerable amount work while on placement in my laboratory. The studies were hampered by some technical difficulties relating to the nature of *E. coli* strains she was working with, nevertheless, she produced a considerable amount of results of a high quality. She further characterised four plasmids from STEC and ExPEC strains of *E. coli* in terms of their genetic and phenotypic antibiotic resistance properties, virulence gene content, fitness cost, plasmid size and incompatibility group. While in my laboratory, Cecilia learnt a number of laboratory techniques which she was previously unfamiliar with, such as plasmid transformation, plasmid extraction, restriction enzyme analysis, antibiotic resistance profile analysis, Inc grouping of plasmids, molecular typing by RAPD PCR and competition assays

to determine biological fitness. She was able to show that one of the STEC plasmids, which encoded both antibiotic resistance and virulence genes had a small fitness cost, whilst the second STEC plasmid, which encoded virulence genes associated with antibiotic resistance had a neutral effect on host fitness. One of the ExPEC plasmids, which encoded an ESBL CTX-M beta-lactamase also had a neutral effect on host strain fitness. Thus, her studies demonstrate that one would expect such plasmids to easily spread throughout the *E. coli* population and that they are hence a potential threat to human health as they promote enhanced virulence and/or antibiotic resistance. The studies Cecilia performed will undoubtedly qualify for a large part of her PhD thesis and, with some further experimental work, will also be suitable for publication in a high quality journal.

I found Cecilia very pleasant to work with and she was a competent and industrious laboratory worker. Her placement in my laboratory will have been of benefit to her both in terms of learning laboratory techniques and research skills as well as obtaining data that will be useful to her degree and future career. Similarly, I hope to benefit from the new research and collaboration opportunities that Cecilia's project has generated.

Yours Sincerely,

Dr. V. I. Enne

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)