MIRIAM RODRIGUEZ FERNANDES

A INFLUÊNCIA DA ANTIBIOTICOTERAPIA NA MICROBIOTA FECAL DE CRIANÇAS EM IDADE ESCOLAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

MIRIAM RODRIGUEZ FERNANDES

A INFLUÊNCIA DA ANTIBIOTICOTERAPIA NA MICROBIOTA FECAL DE CRIANÇAS EM IDADE ESCOLAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos
Co-orientador: Profa. Dra. Viviane Nakano

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Fernandes, Miriam Rodriguez.
A influência da antibioticoterapia na microbiota fecal de crianças em idade escolar / Miriam Rodriguez Fernandes. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Mario Julio Avila- Campos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Bactérias de interesse médico humano e veterinário:fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos.

Versão do título para o inglês: The influence of antibiotic therapy in fecal microbiota of schollarchildren.

1. Microbiota intestinal 2. Crianças 3. Antimicrobianos 4. *Escherichia coli* 5. *Escherichia coli* diarreiogênica 6. Resistência bacteriana I. Avila-Campos, Prof. Dr. Mario Julio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB030/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Miriam Rodriguez Fernandes.

Título da Dissertação: A influência da antibioticoterapia na microbiota fecal de crianças em idade escolar.

Orientador(a): Prof. Dr Mario Julio Avila- Campos.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO EM PESQUISA

Decl. CEPSH. 027/2013.

D E C L A R A Ç Ã O

Em adendo ao ***PARECER 1058/CEP, datado de 09.08.12,*** *informo que o título do Projeto foi alterado para "A influência da antibióticoterapia na microbiota intestinal endógena: uma análise comparativa de alguns microrganismos isolados de crianças em idade escolar,* não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 21 de junho de 2013.

Prof. Dr. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPSH- ICB /USP

À minha mãezinha *(in memoriam),* onde quer que você esteja, eu sei que estará sempre me guiando

À minha amada abuelita Preciosa, eu tive a sorte em poder ter duas mães!

Ao meu pai Dante, que sempre me apoiou e acreditou em mim

A minha irmã Fernanda que me deu o melhor presente de todos, minha sobrinha Giovana.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos pela oportunidade dada desde a minha graduação, pela orientação e conhecimentos compartilhados que foram imprescindíveis para minha formação.

À minha orientadora Profa. Dra. Viviane Nakano, por me orientar e me preparar para novos desafios. Agradeço por toda dedicação e ensinamentos durante todos esses anos e também pela amizade, carinho e confiança.

Ao Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da USP, ao Prof. Dr. Ary Cardoso Lopes e funcionários; às escolas E.E. Clorinda Dante, Creche Maria de Nazaré, Colégio Trentus e seus diretores educacionais, professores e funcionários que colaboraram com as coletas.

Ás crianças participantes e aos seus respectivos responsáveis, por aprovarem a participação delas neste estudo.

À Profa. Dra. Roxane Maria Fontes de Piazza, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, do Departamento de Microbiologia da UFMG, Dr. Sydney Finegold do Veterans Affairs LA Medical Center da Universidade da Califórnia, Profa. Dra. Ruchi Mathur do Departamento de Medicina, Cedars-Sinai Medical Center, Califórnia, pelo fornecimento das cepas bacterianas utilizadas para a quantificação dos microrganismos.

Ao Prof. Dr. Nilton Lincopan, do Departamento de Microbiologia ICB-USP, Profa. Dra. Ana Cristina Gales, do Departamento de Infectologia da UNIFESP, Profa. Dra. Doroti Garcia de Oliveira, do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo fornecimento das cepas-controles dos genes de resistência.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, do Departamento de Farmacologia da UNICAMP e a Sra. Rosana Duarte Prico do ICB-USP, por suas contribuições nas análises estatísticas.

À grande amiga e colaboradora deste trabalho Aline Ignacio, por todos os desafios, novas descobertas e bons momentos em que passamos juntas.

Aos companheiros de laboratório: Viviane Arenas, sua energia é contagiante, obrigada por todo apoio e os inúmeros abraços; ao grande amigo Luis Llanco, por

todas as boas conversas e enriquecimento intelectual; Sheila Belini mesmo distante, obrigada pela amizade e por todos os conselhos. E as novas integrantes: Naiane Samira Cardoso, Claudia Freire, Gabriela Freire, pela amizade e ótima convivência.

À técnica Márcia Harumi Fukugaiti, por sua amizade e auxílio técnico em todos os momentos em que precisei.

À minha querida amiga Juliana M. Pinhata Watanabe por todo companheirismo, apoio, alegria e incentivo na pesquisa.

Às minhas amigas e parceiras de vida: Aline M. Amaral, Brunna Oliveira, Flavia L. Pluskat e Larissa B. Torres, obrigada pela amizade sincera e pelos bons momentos de descontração que vocês sempre me proporcionaram.

À minha banca de qualificação: Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior e Prof. Dr. Nilton Lincopan, pelas sugestões que foram importantes para finalização deste trabalho, em especial para Profa. Dra. Rosemeire Cobo Zanella, por sua atenção e disponibilidade em sempre ajudar.

À todos os professores do Departamento de Microbiologia ICB-USP e de outros departamentos da Universidade de São Paulo pelos ensinamentos transmitidos que contribuíram muito para minha formação acadêmica.

Às secretárias do Departamento de Microbiologia Gisele da Graça Santana e Naíde Rodrigues, Ana Isabel Ferraz.

Aos funcionários da biblioteca, em especial Sras. Renata Maria dos Santos e Tereza Cristina Soutto Mayor por toda atenção dedicada a correção desta dissertação.

À Capes, pelo apoio financeiro concedido a este trabalho.

Finalmente, a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

A alegria que se tem em pensar e aprender

faz-nos pensar e aprender ainda mais.

(Aristóteles)

RESUMO

FERNANDES, M. R**. A influência da antibioticoterapia na microbiota fecal de crianças em idade escolar.** 2015. 111 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2015.

A microbiota intestinal é um ecossistema de alta complexidade e o conhecimento sobre suas interações com o hospedeiro ainda é bastante limitado. De todas as influências exógenas que possam alterar a microbiota intestinal, os agentes antimicrobianos são capazes de causar as mais rápidas e drásticas mudanças. O impacto da exposição aos antimicrobianos na microbiota intestinal causa diminuição no número de determinados gêneros e espécies, dependendo do antimicrobiano utilizado, da dose e do tempo de exposição. A espécie *Escherichia coli* é a bactéria facultativa mais predominante na microbiota intestinal; quando são submetidas ao efeito dos antimicrobianos podem tornar-se resistentes, sendo consideradas reservatório de genes, capazes de adquirir e de transferir genes as outras bactérias da microbiota residente. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar de forma comparativa alguns microrganismos que compõem a microbiota fecal de crianças com e sem antibioticoterapia em idade escolar; bem como avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos e os genes de resistência envolvidos. Foram coletadas amostras fecais não diarreicas de 30 crianças sem antibiótico (controle) e 31 de crianças com antibioticoterapia, com idade de 3 a 12 anos. Na análise quantitativa foi observada redução no número de cópias por g/fezes de: *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Methanobrevibacter smithii* e do filo *Firmicutes* nas amostras das crianças que utilizaram antibióticos em relação ao grupo controle, exceto para *Lactobacillus* spp. e *Parabacteroides distasonis* que apresentaram uma quantificação maior no grupo antibiótico quando comparados com grupo controle. *E. coli* foi isolada em 26 (86,7%) crianças controles e em 23 (74,2%) crianças tratadas com antibióticos. As DEC identificadas no grupo controle foram: EAECa (50%), EAECt (7,14%), EPECa (21,4%), ETEC-LT (14,3%), STEC-*stx1* (7,14%) e STEC-*stx2* (7,14%)*;* e no grupo tratado com antibióticos: EPECa (66,6%) e EAECa (33,3%). A resistência foi verificada para diversas drogas no grupo controle exceto para ciproflixacina, meropenem e tigeciclina; entretanto o grupo com antibioticoterapia apresentou elevada resistência para todas as drogas avaliadas, caracterizando os isolados desse estudo como MDR. Todos os isolados do grupo controle e antibióticos albergaram diversos genes de resistência, entretanto o gene bla_{KPC} foi o único não detectado nos isolados do grupo controle. A análise da diversidade genética por AP-PCR mostrou boa discriminação entre os isolados e elevada diversidade genética. No grupo controle foram verificados 14 grupos genéticos com 85% de similaridade e no grupo com antibioticoterapia foram 24 agrupamentos com 86% de similaridade. Desta forma, nossos dados demonstram que a antibioticoteria causa alterações qualitativas e quantitativas na microbiota intestinal levando à diminuição da diversidade e a supressão de microrganismos; além disso, a elevada resistência as diversas classes de antimicrobianos das cepas de *E. coli,* bem como a presença de diversos genes de resistência ressalta a importância de cepas comensais serem MDR e albergarem esses genes.

Palavras chave: Microbiota intestinal. Crianças. Antimicrobianos. *Escherichia coli. Escherichia coli* diarreiogênica. Resistência bacteriana. PCR quantitativo.

ABSTRACT

FERNANDES, M. R**. The influence of antibiotic therapy in fecal microbiota of schoolchildren.** 2015. 111 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2015.

The intestinal microbiota is a complexity ecosystem and the understanding of this system and their interactions with the host is still limited. Of all the exogenous influences that may alter the intestinal microbiota, antimicrobial agents are able to cause the more rapid and dramatic changes. The impact of exposure to antimicrobial agents on intestinal microbiota causes a decrease in the number of certain genera and species, depending on the antimicrobial agent used, dose and duration of exposure. The specie *Escherichia. coli* is facultative bacterium more predominant in intestinal microbiota, when it is subject to the effect of antimicrobial may become resistant, being considered reservoir of genes, capable of acquiring and transferring genes other bacteria of resident microbiota. Thus, the aim of this study was to analyze comparatively some microorganisms that composing the fecal microbiota of children with and without antibiotic therapy in school age; and evaluate the antimicrobial susceptibility and resistance genes involved. Stool samples (not diarrhea) were collected of 30 children without antibiotic (control) and 31 children with antibiotic therapy, aged 3 to 12 years. In quantitative analysis was observed decrease in the number of copies per g/feces: *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli, Methanobrevibacter smithii* and the phylum *Firmicutes* in samples of children with antibiotic therapy in relation to control group, except *Lactobacillu*s spp. and *Parabacteroides distasonis* that showed a higher quantification in the antibiotics group when compared with control group. *E. coli* was isolated in 26 (86.7 %) children controls and in 23 (74.2 %) children treated with antibiotics. Diarrheagenic *E. coli* identified in control group were: aEAEC (50%),tEAEC (7.14%), aEPEC (21.4%), ETEC-LT (14.3%), STEC-*stx1* (7.14%) and STEC-*stx2* (7.14%); and in antibiotics group: aEPEC (66.6%) and aEAEC (33.3%). The resistance was verified for several drugs in the control group except for ciprofloxacin, meropenem and tigecycline; however the group with antibiotic therapy showed high resistance to all drugs evaluated, characterizing isolates of this study as MDR. All isolates from control group and antibiotics harbored several resistance genes, however bla_{KPC} gene was the only one not detected in isolates from the control group. The analysis of genetic diversity by AP-PCR showed good discrimination between the isolates and high genetic diversity. In the control group were observed 14 clusters with 85% similarity and the antibiotics group were 24 clusters with 86% similarity. Thus, our data demonstrate that the antibiotic therapy cause qualitative or quantitative changes in intestinal microbiota leading to a decrease in the diversity and the elimination of microorganisms; in addition, the high resistance the various classes of antimicrobial of the strains of *E. coli*, as well as the presence of several genes of resistance highlights the importance of commensal strains are MDR and harboring these genes.

***Keywords*:** Intestinal microbiota. Children. Antimicrobials. *Escherichia coli.* Diarrheagenic *Escherichia coli*. Bacterial resistance.Quantitative PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação do impacto da administração de antibióticos na comunidade bacteriana..... 23

Figura 2 - Sítios de colonização de *E. coli* patogênica..... 27

Figura 3 - Esquema dos seis patotipos de *E. coli* diarreiogênicas..... 28

Figura 4 - Mecanismos de ação dos antimicrobianos..... 32

Figura 5 - Mecanismos de ação e resistência dos antimicrobianos..... 34

Figura 6 - Curva padrão de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285..... 43

Figura 7 - Curva padrão de *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482..... 43

Figura 8 - Curva padrão de *Parabacteroides distasonis* ATCC 8503..... 44

Figura 9 - Curva padrão de *Parabacteroides merdae* ATCC 43184..... 44

Figura 10 - Curva padrão de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 1696..... 44

Figura 11 - Curva padrão de *Clostridium difficile* VPI 10468..... 44

Figura 12 - Curva padrão de *Clostridium perfringens* ATCC 13124..... 45

Figura 13 - Curva padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922..... 45

Figura 14 - Curva padrão de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356..... 45

Figura 15 - Curva padrão de *Methanobrevibacter smithii* ATCC 35061..... 45

Figura 16 - Curva padrão de *Bacteroidetes*..... 46

Figura 17 - Curva padrão de *Firmicutes*..... 46

Figura 18 - Dispersão dos microrganismos com significância estatística..... 53

Figura 19 - Quantidade de antibióticos utilizados e a quantificação de *P. distasonis* e *Bifidobacterium* spp..... 56

Figura 20 - Detecção do gene 16S rRNA para identificação de *E. coli*..... 58

Figura 21 - Frequência das crianças portadoras de DEC entre os grupos controle e antibiótico..... 58

Figura 22 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para os genes *eae* e *stx2*..... 59

Figura 23 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para os genes *aggR, elt, stx1*..... 59
Figura 24 - Leitura de placa de microdiluição com resazurina..... 61
Figura 25 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para os genes de aminoglicosídeos..... 64
Figura 26 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para os genes de β-lactâmicos..... 65
Figura 27 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para os genes de cloranfenicol..... 66
Figura 28 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para os genes de nitrofurantoína..... 66
Figura 29 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para os genes de quinolonas..... 67
Figura 30 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para os genes de tetracilcinas..... 67
Figura 31 - Dendrograma dos 49 isolados de *E. coli* das crianças controle..... 74
Figura 32 - Dendrograma dos 47 isolados de *E. coli* das crianças com antibióticos..... 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na detecção e quantificação por qPCR 42

Tabela 2 - Sequências de oligonucleotídeos para identificação de *E. coli* comensais e diarreiogênicas..... 47

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados para detecção dos genes de resistência..... 50

Tabela 4 - Determinação quantitativa dos microrganismos nas amostras fecais das crianças do grupo controle e antibiótico..... 52

Tabela 5 - Correlação de Spearman (rS) e nível de significância (valor de *p*) entre os microrganismos do grupo controle..... 54

Tabela 6 - Correlação de Spearman (rS) e nível de significância (valor de *p*) entre os microrganismos do grupo com antibiótico..... 55

Tabela 7 - Padrão de microrganismos detectados por qPCR nas amostras dos grupos controle e antibióticos..... 57

Tabela 8 - Porcentagem dos isolados de DEC entre as crianças do grupo controle e antibióticos..... 60

Tabela 9 - Valores de CIM e porcentagem de resistência de *E.coli* isolados de criança controle e antibióticos..... 62

Tabela 10 - Padrões de resistência das 11 drogas testadas em relação aos 96 isolados..... 63

Tabela 11 - Detecção dos genes de resistência entre os isolados dos grupos controle e antibióticos..... 68

Tabela 12 - Associação dos genes de resistência frente ao perfil de susceptibilidade dos grupos controle e antibióticos..... 70

Tabela 13 - Características fenotípicas e genotípicas dos 49 isolados de *E. coli* do grupo controle..... 73

Tabela 14 - Características fenotípicas e genotípicas dos 49 isolados de *E. coli* do grupo com antibióticos 76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC- Acetilação

AAF- Fímbrias de aderência agregativa

ABC- *ATP- binding cassete*

A/E- les*ão attaching and effacing*

AIEC- *Escherichia coli* aderente e invasora

ALL- Adesão localizada-*like*

ANT- Adenilação

ATCC - *American type culture collection*

ATP – Trifosfato de adenosine

APH- Fosforilação

AP-PCR- *Arbitrary Primer*- PCR

BFP- *Bundle forming pilus*

BLAST - *Basic local alignment search tool for nucleotide*

CIM- Concentração inibitória minima

CLSI- *Clinical and laboratory standards institute*

CTX-M- Cefotaximase

DAEC- *Escherichia coli* que adere difusamente

DEC- *Diarrheagenic Escherichia coli*

DHF- Ácido didrofólico

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EAEC- *Escherichia coli* enteroagregativa

EAECa- *Escherichia coli* enteroagregativa atípica

EAECt- *Escherichia coli* enteroagregativa típica

EAF- EPEC *adherence factor*

EHEC- *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC- *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC- *Escherichia coli* enteropatogênica

EPECa- *Escherichia coli* enteropatogênica atípica

EPECt- *Escherichia coli* enteropatogênica típica

ESBL- β-lactamase de espectro estendido

ETEC- *Escherichia coli* enterotoxigênica

ExPEC- *Escherichia coli* extra intestinal

GALT- *Gut-associated lymphoid tissue*

KPC- *Klebsiella pneumonia* produtora de carbapenemase

LB- Lúria-Bertani

LT- Toxina termo lábil

MDR- *Multidrug resistance*

MFS- *Major facilator superfamily*

MATE- *Multidrug and toxic extrusion*

MLST- *Multilocus sequence typing*

MNEC- *Escherichia coli* causadora de meningite neonatal

NDM- *New Dehli metallo β-lactamase*

OXA- Oxacilinases

pAA-Plasmídeo de adesão agregativa

PABA- Ácido paraminobenzóico

PBP- *Protein binding penicillin*

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PDR- *Pandrug resistance*

PFGE- *Pulsed field gel electrophoresis*

qPCR- *Quantitative PCR*

RAPD- *Random amplified polymorphic DNA*

RNAr- Ácido ribonucleico ribossômico

RNAm- Ácido ribonucleico mensageiro

RND- *Resistance nodulation cell division*

SCFAs- *Short-chain fatty acids*

SHU- Síndrome hemolítica urêmica

SHV- *Sulphydryl variable*

SM- Coeficiente de *Simple matching*

SMR- *Small multidrug resitance*

ST- Toxina termo estável

STEC- *Escherichia coli produtora de toxina de Shiga*

Stx- Toxina de Shiga

STEAEC- *Escherichia coli* enteroagregativa produtora de toxina de Shiga

TEM- Temoneira

THF- Ácido tetrahidrofólico

UPEC- *Escherichia coli* uropatogênica

XDR- *Extensively drug-resistant*

LISTA DE SÍMBOLOS

ºC- Graus Celsius

$MgCl_2$- Cloreto de magnésio

mL- Mililitro

mM-Milimolar

ng- Nanograma

p- *p-value*

Pb- Pares de base

pH- Potencial hidrogeniônico

rS- Correlação de Spearman

V- Volts

µg- Micrograma

µL- Microlitro

µM- Micromolar

µg/mL - Micrograma por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 19
1.1 Microbiota intestinal residente..... 19
1.2 *Escherichia coli*..... 26
1.2.1 Escherichia coli diarreiogênicas..... 27
1.3 Antimicrobianos..... 30
1.3.1 Mecanismos de ação..... 31
1.3.2 Mecanismos de resistência..... 33
1.4 Resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli*..... 36
2 OBJETIVOS..... 40
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 41
3.1 Amostras..... 41
3.2 Análise quantitativa das amostras fecais 41
3.2.1 Extração do DNA total das fezes..... 41
3.2.2 Quantificação por PCR em Tempo Real (qPCR)..... 41
3.3 Isolamento e identificação de *E. coli* comensais e diarreiogênicas..... 46
3.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos..... 48
3.5 Detecção dos genes de resistência aos antimicrobianos..... 49
3.6 Tipagem Molecular por AP-PCR..... 51
3.7 Análise estatística..... 51
4 RESULTADOS..... 53
4.1 Análise quantitativa por qPCR das amostras fecais..... 53
4.2 Isolamento e identificação de *E. coli* comensal e diarreiogênicas..... 58
4.3 Determinação da susceptibilidade e padrão dos genes de resistência aos antimicrobianos..... 62
4.4 Diversidade genética..... 72
5 DISCUSSÃO..... 81
6 CONCLUSÒES..... 92
REFERÊNCIAS..... 93
APÊNDICES..... 103
APÊNDICE A Características gerais das amostras analisadas dos grupos controle e antibióticos..... 105

APÊNDICE B Padrão de microrganismos encontrados nas crianças dos grupos controle e antibióticos..... 107
ANEXO..... 108

1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal é um ecossistema de alta complexidade e o entendimento deste sistema e suas interações com o hospedeiro ainda é bastante limitado. Sabe-se que a microbiota tem importante papel na saúde, é constituída por diversos microrganismos que vivem simbioticamente no trato intestinal dos seres humanos e animais, e desepenha diferentes funções como: modulação imunológica, barreira protetora aos microrganismos patogênicos e contribuição nos processos metabólicos e nutricionais (BENGMARK, 1998; PENDERS, 2006).

Os microrganismos que compõem a microbiota intestinal humana são referidos coletivamente como microbiota indígena, residente ou autôctone, e vivem aderidos as mucosas do trato intestinal, sendo predominante as bactérias anaeróbias e os principais gêneros encontrados são: *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Fusobacterium* spp. e cocos gram positivos. Há também os microrganismos referidos como microbiota transitória ou exógena, no qual são bactérias provenientes do ambiente e não apresentam a capacidade ou não encontram condições apropriadas para se estabelecer, como no caso das *Escherichia coli* diarreiogênicas (DEC), que podem ser encontradas em pacientes assintomáticos (ALVAREZ et al., 2010; BARBOSA et al., 2010).

A microbiota fecal é o reflexo da composição da microbiota intestinal, pórem sabe-se que a microbiota fecal representa apenas os microrganimos do lúmen da região reto-sigmóide, diferindo da região íleo-cecal, das superfícies das mucosas das criptas e vilosidades, havendo assim diferença nas populações de microrganismos na região superior e inferior do intestino (HILL; DRASAR, 1975). O número de microrganismos encontrados no intestino adulto pode variar em até 800 espécies diferentes pertencentes a diversos gêneros, entretanto uma porção significativa não pode ser cultivada pelas técnicas existentes (HOLZAPFEL et al., 1998, SHEN et al., 2013).

1.1 Microbiota intestinal residente

A colonização do trato intestinal é determinada por diversos fatores internos e externos do hospedeiro. Os fatores internos são: fisiologia e anatomia do trato intestinal, sais biliares, peristaltismo, pH e imunomodulação. Desta forma, a

competição entre microrganismos por receptores de mucosa e as interações entre microrganismo-hospedeiro modulam sua composição, tornando a microbiota intestinal única para cada indivíduo (STEWART et al., 2005; TOIVANEN et al., 2001).

Estudos sugerem que a seleção inicial de bactérias no trato intestinal pode ser influenciada de forma genética (MENG et al., 2014). Há hipóteses de que os padrões dos sítios de adesão bacteriana sejam influenciados pela genética do indivíduo. Alguns estudos já demonstraram uma semelhança maior entre o padrão da microbiota de gêmeos idênticos em comparação a irmãos não gêmeos (STEWART et al., 2005; ZOETENDL et al., 2001).

Entre os fatores externos estão: composição da microbiota materna, tipo de parto, aleitamento, condições de higiene e uso de antimicrobianos. Em crianças nascidas de parto normal, a colonização da microbiota é iniciada por bactérias originadas do trato vaginal materno, já nas crianças nascidas de parto cesárea a colonização inicial é caracterizada pela presença de bactérias facultativas e esporuladas que podem ser adquiridas do ambiente hospitalar e dos profissionais de saúde. Poucas horas após o nascimento esses microrganismos podem ser detectados nas fezes do recém nascido (ALVAREZ et al., 2010; BACKHED, 2005; BEZIRTZOGLOU, 1997; FANARO et al., 2003).

Durante muitos anos, acreditou-se que o útero materno era um ambiente estéril e que a microbiota intestinal era estabelecida no momento do nascimento, sendo as primeiras bactérias a colonizarem o intestino as facultativas e anaeróbias estritas. Nos últimos anos, essa teoria está sendo questionada e observada de forma mais cautelosa através do “dogma do útero materno” que propõem que esse ambiente não é ausente de microrganismos (FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013; MOLES et al., 2013).

Alguns estudos mostraram a presença de algumas espécies como: *Enterococcus faecium, Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes, Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium* spp., no sangue do cordão umbilical e anexos placentários (DiGIULIO et al., 2005; JIMENÉZ et al., 2005; SATOKARI et al., 2009). Foram observados também no mecônio, primeira evacuação do recém nascido, a presença de bactérias como *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli, Enterococcus* spp. e *Leuconostoc* spp. sendo antes considerado estéril em uma

gestação sem infecções (GONSALBES et al., 2013; JIMENÉZ et al., 2005; MOLES et al., 2013).

Funkhouser e Bordenstein, (2013) sugerem que as bactérias atravessam a placenta via corrente sanguínea após a translocação intestinal enquanto o epitélio intestinal previne a penetração de microrganismos; células dendríticas presentes no tecido linfóide associado ao intestino (*Gut-associated lymphoid tissue* - GALT) e Placas de Peyer, conseguem emitir seus prolongamentos através das células epiteliais, capturar e transportar as células bacterianas para os linfonodos, atingindo assim a corrente sanguínea. Entretanto essa teoria ainda é recente, e gera diversas dúvidas como as bactérias intestinais chegam a vida intrauterina.

Após o nascimento o intestino apresenta um potencial de óxido-redução positivo, sendo a colonização iniciada por bactérias aeróbias e facultativas, onde as espécies mais encontradas são: *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli, Proteus mirabilis, Enterobacter cloacae* e *Serratia* spp. Com o consumo de oxigênio, ocorre o predomínio de bactérias anaeróbias como: *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Veillonella* spp. e *Fusobacterium* spp. (BEZIRTZOGLOU, 1997; YON et al., 2015).

O leite materno materno contém nutrientes necessários ao desenvolvimento do recém nascido como: proteínas, cálcio, fosfato, oligossacarídeos e também fatores protetores como imunoglobulina (IgA), fator determinante na composição inicial da microbiota intestinal de lactentes (BEZIRTZOGLOU, 1997; CIVARDI et al., 2014; MONIRA et al., 2011).

Em crianças alimentadas com leite materno devido a presença de oligossacarídeos (conhecidos como fator “bifidogênico”) a microbiota é predominada por *Bifidobacterium* spp*.,* que produzem grandes quantidades de acetato e de lactato, limitando o crescimento de microrganismos como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* (MONIRA et al., 2011; WOLOWCZUK et al., 2008). Observa-se também uma taxa mais elevada na colonização por *Staphylococcus* spp. em crianças alimentadas por leite materno devido o contato prolongado com a pele da mãe durante a amamentação, já a colonização por cocos anaeróbios dos gêneros *Peptostreptococcus* e *Peptococcus* ocorem geralmente após a introdução de alimentos sólidos (ARRIETA et al., 2014; BEZIRTZOGLOU, 1997).

Em recém nascidos alimentados com leite de fórmula observa-se maior predomínio de *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. e *Enterococcus* spp. em relação aos alimentados com leite materno (ADLERBERTH; WOLD, 2008). Cada vez mais os leites de fórmula vêem sendo modificados para se assemelharem ao leite materno, havendo adição de prebióticos. Observa-se a presença de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. nesta microbiota, entretanto esses lactentes são mais susceptíveis as infecções gastrointestinais, por não receber anticorpos protetores maternos e pela má higienização das mamadeiras (HASCOET et al., 2011; SAAVEDRA; DATTILO, 2012).

O grau de contaminação ambiental parece ser um outro fator diferencial no processo de colonização intestinal sendo descritas diferenças nítidas entre crianças nascidas em países desenvolvidos e subdesenvolvidos. Observa-se que crianças nascidas em países subdesenvolvidos são mais colonizadas por membros da família *Enterobacteriaceae* e *Enterococcus* spp. (ADLERBERTH; WOLD, 2008) provavelmente associados as condições socioeconômicas da população, além de fatores nutricionais e de higiene.

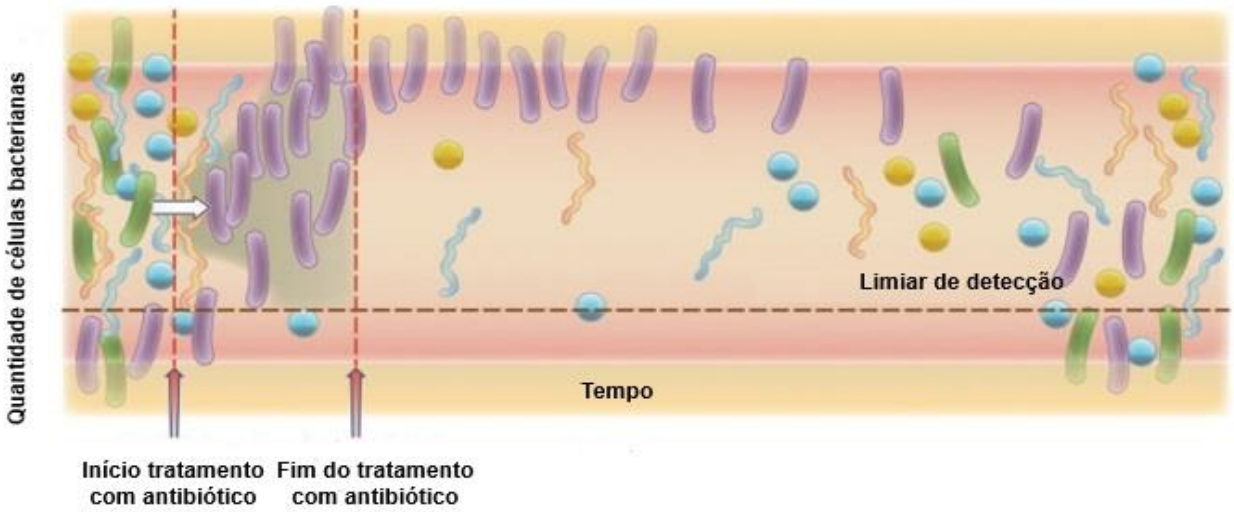
De todas as influências exógenas que possam alterar a microbiota intestinal, os agentes antimicrobianos são capazes de causar as mais rápidas e drásticas mudanças na microbiota residente. Por causa da perturbação que muitas drogas antibacterianas provocam no ecossistema intestinal, a resistência à colonização pode ser diminuída ou perdida. O principal efeito observado inclui a supressão de bactérias anaeróbias, com exceção do *Clostridium* spp. que permanece em níveis detectáveis e a seleção de bactérias resistentes (Figura 1) (JERNBERG et al., 2010).

Estudos sobre os impactos da exposição aos antimicrobianos na microbiota intestinal relatam que existe diminuição, algumas vezes mais acentuadas, de determinados gêneros e espécies e que isso depende do antimicrobiano utilizado, da dose e do tempo de exposição (JERNBERG et al., 2010). Entre os microrganismos que mais sofrem esse tipo de alteração estão as enterobactérias, enterococos e bactérias anaeróbias (NORD; EDLUND, 1991; RAFII et al., 2008).

Há relatos em que a *E. coli* pode ser substituída por *Klebsiella* spp. quando antibióticos são administrados (KLEESSEN et al., 2000; NICOLI, 1995; NICOLI; VIEIRA, 2004). Mais recentemente, o surgimento da diarreia associada ao uso de antibióticos e a colite causada pelo *Clostridium difficile*, aumentou a consciência geral de que era possível a doença surgir devido às alterações ocorridas na microbiota

residente. A influência do uso de antimicrobiano na microbiota intestinal é transitória, mas pode persistir por algum período após o término do uso (RILEY, 2010).

Figura 1 - Representação do impacto da administração de antibióticos na comunidade bacteriana.



Fonte adaptado de Jernberg et al., (2010).

Outros fatores que influenciam a composição da microbiota podem ser: diarreias, enterocolites, doença inflamatória, diabetes e a prematuridade do parto. Sabe-se que crianças prematuras tem retardo no processo de colonização da microbiota intestinal, associado aos fatores externos (uso de antimicrobianos) e internos (imaturidade celular) (BUFFIE; PAMER, 2013; PENDERS, 2006).

A microbiota intestinal tem efeito estimulante no desenvolvimento do sistema imunológico; está envolvida em aspectos de resistência nos estágios iniciais das infecções por patógenos. No trato intestinal existe um estado constante de modulação, pois ao mesmo tempo que o sistema imunológico está pronto para agir contra bactérias patogênicas ele é capaz de manter-se tolerante em relação a microbiota (WINKLER et al., 2007).

Além da ativação imunológica a microbiota desempenha papeis importantes na resistência à colonização de bactérias patogênicas, devido a produção de

substâncias antagonistas, competição por nutrientes e por sítios de adesão (TANNOCK,2001; WINKLER et al., 2007).

A função da microbiota intestinal também pode estar relacionada com a nutrição e metabolismo do hospedeiro, evidenciada, por exemplo, por interferir no pH do intestino e na motilidade intestinal, favorecendo absorção de íons e água, e na produção de vitamina K (LIN et al., 2005). A microbiota também é responsável pela fermentação de uma série de substratos como os carboidratos não digeríveis da dieta, que chegam ao lúmen intestinal e são transformados em ácidos graxos de cadeia curta (*Short-chain fatty acids* - SCFAs) por bactérias sacarolíticas (MAGALHAES et al., 2007).

Apesar de todos esses benefícios, a microbiota intestinal pode estar envolvida em processos patológicos como: alergias, obesidade, câncer de cólon e doença inflamatória intestinal, provavelmente devido a alteração desta população (ARRIETA et al., 2014; BERVOETS et al., 2013; COX; BLASSER, 2013; KOVATCHEVA-DATCHARY, 2009).

No primeiro ano de vida de uma criança, a microbiota ainda é considerada instável. Entretanto, vários fatores (alimentação, hábitos de higiene, utilização de antimicrobianos e o próprio sistema imunológico) atuam em conjunto modulando o processo de instalação da microbiota intestinal, de forma que um pode influenciar ou alterar o efeito do outro. Sabe-se que a microbiota intestinal torna-se estável a partir dos 2 anos de idade, após esse período a microbiota assemelha-se a dos adultos (PALMER et al, 2007).

Dentre os diversos microrganismos que compõem a microbiota intestinal os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* correspondem a mais de 90% do total de bactérias (SHEN et al., 2013). Alguns gêneros encontrados também merecem destaque como: *Bifidobacterium* spp. conhecidos pelos seus efeitos benéficos para saúde humana, sendo denominadas bactérias probióticas, assim como *Lactobacillus* spp., ambos encontrados na microbiota de crianças amamentadas por leite materno e de fórmula (MONIRA et al., 2011; RUSSEL et al., 2011).

Outros microrganismos de importância na microbiota intestinal são aqueles pertencentes aos gêneros *Bacteroides/Parabacteroides* sendo as espécies mais encontradas: *B. vulgatus, P. distasonis, B. fragilis*, *B. ovatus, P. merdae* e *B. thetaiotaomicron*. São considerados patógenos oportunistas, particularmente a

espécie *B. fragilis,* por apresentar uma variedade de fatores de virulência e principalmente pela sua resistência aos diversos antimicrobianos (WEXLER, 2007).

As espécies do gênero *Clostridium* são pertencentes à microbiota residente do intestino de humanos e animais. Em crianças, espécies pertencentes ao Cluster I e ao Cluster XI são as mais predominantemente encontradas, das quais se destacam: *C. perfringens* e *C. difficile,* por estarem envolvidos em diversas infecções como: enterites e gangrena gasosas; e colite pseudomembranosa associada à antibioticoterapia (ADLERBERTH; WOLD, 2009; COLLINS et al., 1994;).

Bactérias metanogênicas do domínio *Archaea*, são anaeróbias estritas e fazem parte da microbiota residente do intestino humano, sendo *Methanobrevibacter smithii* a espécie mais encontrada. A colonização intestinal com metanogênicas é iniciada nas primeiras semanas após o nascimento. Seu número varia de 10^{10} microrganismos por grama de peso seco, sendo que um terço da população carrega 10^{8}-10^{10} microrganismos por gramas de fezes. As *Archaea* possuem uma variedade de características estruturais e metabólicas únicas que não são encontradas em *Bacteria*, incluindo a falta de sítios alvos para os antibióticos comuns (DERMOUMI; ANSORG, 2001; DRIDI et al., 2011).

Escherichia coli constitui um grupo heterogêneo de bactérias tipicamente não patogênicas que fazem parte da microbiota intestinal. Após o processo de colonização estes microrganismos convivem com seu hospedeiro na maioria das vezes pelo resto da vida, sendo a principal bactéria facultativa presente no intestino (KAPER et al., 2004). Entretanto quando o hospedeiro encontra-se imunodeprimido ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas, até mesmo cepas de *E. coli* não patogênicas podem causar infecção (NATARO; KAPER, 1998).

Existem diferenças na distribuição das bactérias em cada compartimento intestinal como: no lúmen intestinal, na camada de muco que recobre o epitélio intestinal e outras aderidas aos enterócitos. Há poucos estudos avaliando a composição da microbiota da mucosa intestinal devido a dificuldade de se obter espécimes que representariam a composição desse sítio, e a escassez de estudos longitudinais para melhor compreensão desse sistema (ADLERBERTH; WOLD, 2008).

1.2 *Escherichia coli*

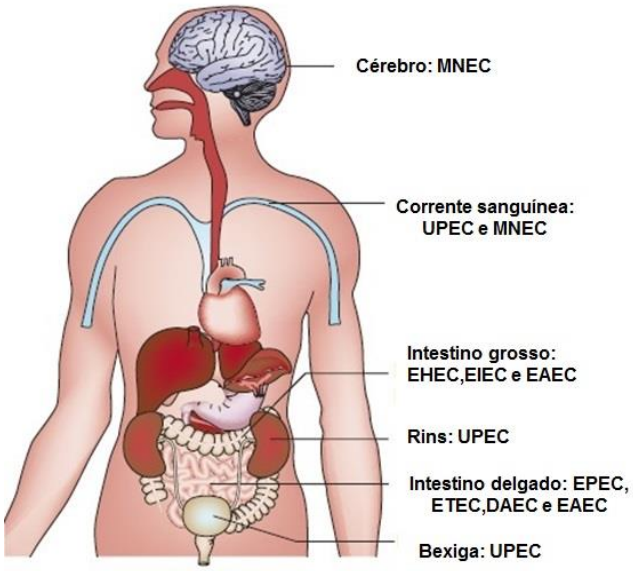
O gênero *Escherichia* pertence à família *Enterobacteriaceae*, são caracterizadas por serem gram negativas, bacilos não formadores de esporos, facultativas, oxidase negativa, imóveis ou móveis por flagelos peritríquios (KAPER et al., 2004; WEINTRAUB, 2007). Há seis espécies descritas de *Escherichia: E. coli, E. blattae, E. fergussonii, E. vulneris, E. albetii, E. hermannii,* sendo a *E. coli* a espécie mais comumente estudada (HUYS et al., 2003).

Foi identificada pela primeira vez em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich e desde então verifica-se que pode ser encontrada em diferentes ecossistemas. É a principal bactéria facultativa presente na microbiota intestinal de animais e humanos, por ser um microrganismo bem diversificado em seus aspectos fisiológicos, ecológicos e patogênicos (HUYS et al., 2003; TORRES et al., 2010).

Costumam ser classificadas em vários patotipos e sorotipos, identificadas por antissoros específicos preparados contra antígenos: O (somáticos), K (capsular) e H (flagelar). A combinação entre eles possibilita a discriminação de *E. coli* em mais de 50.000 sorotipos, contudo poucos são considerados patogênicos (KAPER et al., 2004; NATARO; KAPER, 1998;).

Nas primeiras horas de vida da criança, *E. coli* pode ser encontrada colonizando o hospedeiro; entretanto algumas cepas no processo de adaptação do ecossistema intestinal, adquiriram fatores de virulência, que proporcionaram algumas combinações genéticas bem sucedidas, conferindo a capacidade de causar doenças. A maioria das *E. coli* não são patogênicas, porém algumas estão envolvidas em processos infecciosos como: diarreias, infecções do trato urinário, septicemias, meningites. Podendo então ser classificadas como: comensais, patogênicas intestinais (*E. coli* diarreiogênica – DEC) e patogênicas extra intestinais (*E. coli* extra intestinal – ExPEC) (CROXEN; FINLAY, 2010) (Figura 2).

Figura 2 - Sítios de colonização de *E. coli* patogênica.



Fonte: adaptado de Croxen e Finlay, 2010.

As ExPEC estão associadas as diversas infecções como: do trato urinário sendo chamadas de UPEC (*E. coli* uropatogênica), sepses (associadas as infecções urinárias) e as meningites (MNEC – *E. coli* causadora de meningite neonatal) (CROXEN; FINLAY, 2010).

As infecções urinárias são muito frequentes na comunidade e em ambientes hospitalares, sendo que 70-90% são ocasionadas por UPEC. Essas bactérias agem como patógenos oportunistas causando diversas manifestações clínicas como: bacteriuria, cistite e pielonefrite e podem estar presentes em 20% dos indivíduos saudáveis (BRUMBAUGH; MOBLEY, 2012; JOHNSON et al., 2005). As MNEC apresentam uma alta taxa de morbidade e mortalidade em neonatos; enquanto que 10% dos casos ocorre em crianças entre 1 e 3 meses de idade (BONACORSI; BINGEN, 2005).

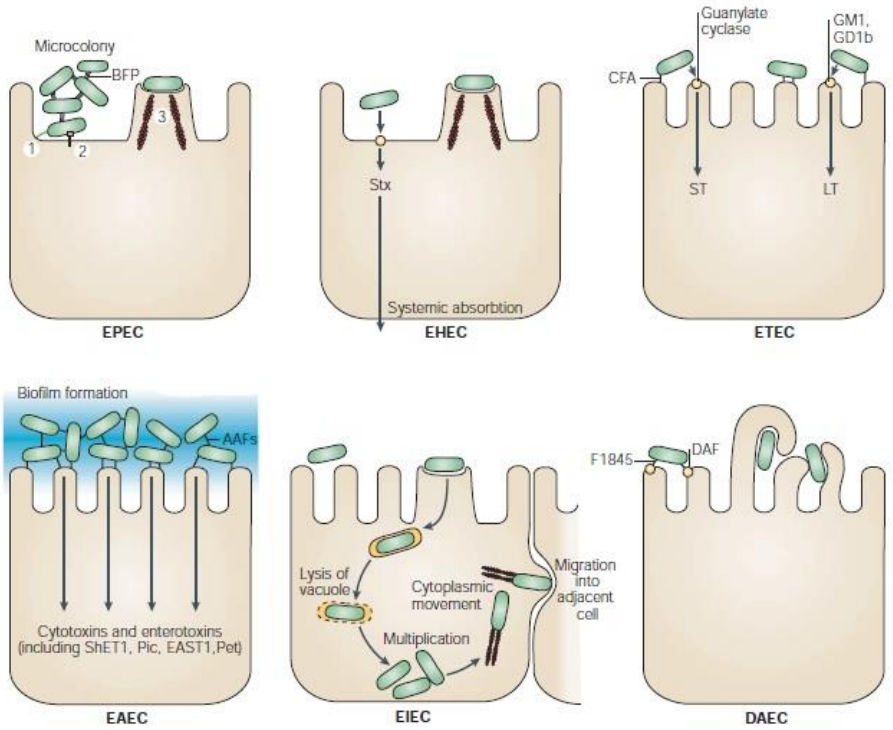
1.2.1 Escherichia coli diarreiogênicas (DEC)

A diarreia infecciosa é um grande problema de saúde pública mundial, sendo responsável por milhares de mortes todos os anos em crianças menores de 5 anos de idade, principalmente em países em desenvolvimento. Dentre os principais agentes estão: *E. coli* diarreiogênicas, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni* (NAVENEETHAN; GIANNELA, 2008).

A identificação DEC não pode ser baseada apenas em critérios de cultivo e testes bioquímicos, uma vez que são indistinguíveis de *E. coli* comensal. Além disso a sorotipagem nem sempre está correlacionada com a patogenicidade, sendo a melhor a forma de identificação através de testes de adesão em células eucarióticas e a análise molecular de seus fatores de virulência (BUERIS et al., 2007).

As amostras de DEC são divididas em seis patotipos, de acordo com seus fatores de virulência e pelos mecanismos que ocasionam a doença intestinal sendo: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC*), E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* que adere difusamente as células epiteliais (DAEC). Sabe-se que alguns desses patotipos incluem algumas variações, como no caso das *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) que são uma subcategoria de STEC e as EAEC e EPEC que foram subdivididas em típicas e atípicas (CROXEN; FINLAY; 2010; KAPER et al., 2004). Os diferentes patotipos de DEC causam sintomas intestinais muito particulares e são intimamente relacionados com suas estratégias de virulência (Figura 3).

Figura 3 - Representação dos seis patotipos de *E. coli* diarreiogênicas.



1: adesão inicial; 2:proteínas de translocação (sistema de secreção tipo III); 3: formação do pedestal.
Fonte: Kaper et al., (2004).

Recentemente dois outros patotipos surgiram: *E. coli* aderente e invasora (AIEC) associada a doença de Crohn e *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina de Shiga (STEAEC), que foi responsável pelo surto ocorrido na Alemanha em 2011 que se espalhou por diversos países da Europa, além da América do Norte tendo um grande impacto sobre o comércio internacional de alimentos (CLEMENTS et al., 2012).

As *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) são uma das causas mais comuns de diarreias em crianças de até um ano de idade nos países em desenvolvimento. Uma de suas principais características na patogênese é a formação de uma lesão histopatológica no epitélio intestinal denominada lesão A/E (*attaching and effacing)*, que resulta da adesão íntima da bactéria ao enterócito e promove a desestruturação das microviolosidades do epitélio, levando à polimerização da actina e o rearranjo das proteínas do citoesqueleto, resultando na formação de estruturas semelhantes a um pedestal na membrana apical do enterócito sobre a qual a bactéria permanece aderida (NATARO; KAPER, 1998; NUNES et al., 2012; VIDAL et al., 2007).

Atualmente as EPEC são divididas em duas subcategorias: EPEC típica (EPECt) e EPEC atípica (EPECa), sendo que ambas possuem o gene *eae* (*E. coli attaching and effacing),* porém apenas as EPECt produzem um pilus tipo IV conhecido como BFP (*Bundle forming pilus*) expresso por genes plasmidiais de alto peso molecular conhecido como EAF (EPEC *adherence factor*) (VIDAL et al., 2007). A BFP é importante por promover a ligação inicial à célula hospedeira e a interação entre as bactérias, levando a formação de microcolônias aderidas. Nas EPECa como o BFP não é expresso, não há formação de agregados nas lesões A/E, mostrando agrupamentos mais frouxos das células bacterianas, ocasionando o padrão de adesão localizada - like (LAL) (ARENAS-HERNÁNDEZ, 2012; GOMES et al., KAPER et al., 2004).

As *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) são caracterizadas pela produção de uma ou ambas enterotoxinas denominadas termolábil (LT) e termoestável (ST). No hospedeiro colonizam e aderem superficialmente aos enterócitos, e pela ação das toxinas causam diarreia aquosa por interferirem em mecanismos regulatórios da guanilase e adenilase ciclase, resultando em desequilibro hídrico e salino; acometendo crianças e adultos (FLECKENSTEIN et al, 2010; ISERI et al., 2011; KAPER et al., 2004).

O mecanismo de patogenicidade das *E. coli* enteroagregativas (EAEC) consiste na colonização bacteriana formando um padrão de adesão agregativo com aumento na produção de muco, causando diarreia aguda e persistente. Este fenótipo possui fímbrias de aderência agregativa do tipo I-IV (AAFI-IV), os genes responsáveis pela expressão dessas fímbrias estão presentes no plasmídeo pAA (plasmídeo de adesão agregativa) (KAPER et al., 2004; MORIN et al., 2013; NATARO, 1998; WEINTRAUB, 2007). De modo semelhante como ocorreu com as EPEC, Sarantuya et al., (2004) propuseram a classificação de EAEC nos grupos típicas e atípicas. A classificação baseia-se na presença ou não do gene *aggR (activator aggregative adherence regulator),* que codifica uma proteína reguladora dos genes fimbriais de EAEC e que está localizada em plasmídeo.

O patotipo de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) é geneticamente relacionado à *Shigella* spp.*,* que invadem a mucosa intestinal e causam diarreia aquosa e colite inflamatória (NATARO; KAPER, 1998; SETHABUTR et al., 1993). Já as *E. coli* produtoras de Toxina Shiga (STEC) produzem citotoxinas semelhantes a “Toxina de Shiga” (*stx*1 e *stx*2) que ocasionam lesões celulares por afetarem a síntese proteica. Dentro desse patotipo existe uma subcategoria denominada *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que além da produção de citotoxinas, apresentam a capacidade de ocasionar a lesão A/E, sendo responsáveis por severos quadros de diarreia hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (SHU) (BERGAN et al., 2012; BERTIN et al., 2001).

O patotipo DAEC apresenta um padrão de aderência difusa em ensaio de adesão em células epiteliais. Ainda existem diversas controversias sobre o papel da DAEC em diarreias, uma vez que alguns estudos relatam que esse patotipo pode ser encontrado de forma semelhante em crianças com e sem diarreia. No Brasil, estudos em crianças com diarreia, a presença de DAEC foi associada em menores de 2 anos de idade (SCALETSKY et al., 2002), entretanto Lozer et al., (2013) reportou a correlação deste patotipo em crianças menores de 2 anos até 10 anos com casos de diarreia, bem como nas crianças sem diarreia.

1.3 Antimicrobianos

A descoberta dos antimicrobianos revolucionou a medicina, salvando inúmeras pessoas e têm sido prescritos para o tratamento de diversas infecções (DAVIES; DAVIES, 2010). Nos últimos anos, são produzidas toneladas de

antimicrobianos para diversas finalidades, desde tratamento terapêutico e/ou profilático na medicina humana e animal, bem como para agropecuária. Entretanto, devido às más condutas como: o uso indiscriminado e o descarte indevido surgiram diversos ecossistemas com bactérias resistentes (DAVIES; DAVIES, 2010; ROCHA et al., 2011).

Os antimicrobianos são substâncias naturais (antibióticos) ou sintéticas (quimioterápicos) que agem sobre os microrganismos inibindo seu crescimento ou causando a sua destruição (SÁEZ-LLORENS, 2000). Podem ser classificados como: bactericidas (associado à morte bacteriana) ou bacteriostáticos (inibe o metabolismo bacteriano).

1.3.1 Mecanismos de ação

Os antimicrobianos possuem diversos mecanismos de ação, agindo em diferentes sítios alvos como:

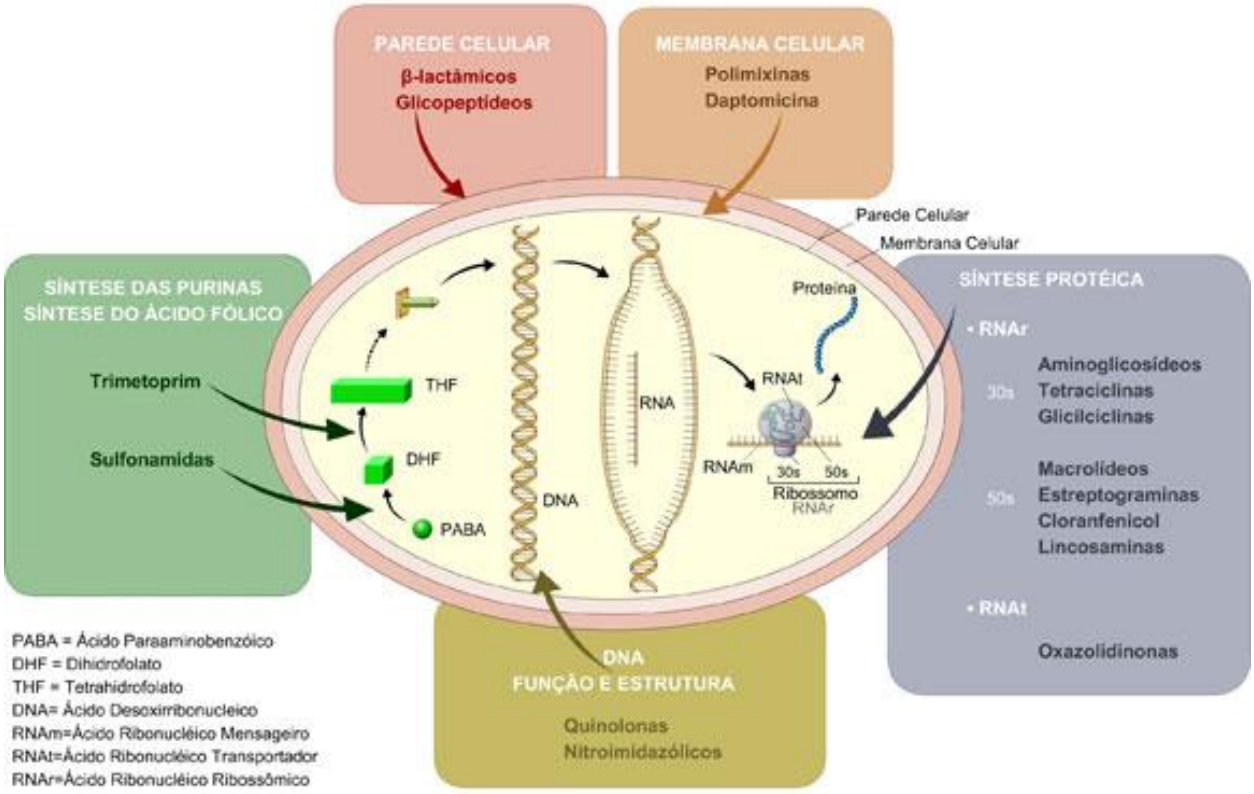
a) inibição da síntese da parede celular,
b) inibição da síntese de proteínas,
c) inibição da síntese de ácido fólico,
d) alteração na síntese de ácidos nucleicos e
e) alteração da permeabilidade da membrana celular (Figura 4) (ANVISA, 2007).

Os β-lactâmicos, glicopeptídeos, fosfomicina, bacitracina e cicloserina atuam na síntese da parede celular inibindo as ligações cruzadas da cadeia de peptideoglicano (transpeptidases – PBP: *protein binding penicillin*) causando a lise bacteriana. O grupo dos β-lactâmicos incluem as: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapênemicos, cefamicinas; e o grupo dos glicopeptídeos é composto por: vancomicina e a teicoplamina (CETINKAYA et al., 2000; LIVERMORE, 1995; POETA, 2006).

Os ribossomos bacterianos são estruturalmente diferentes dos eucariotos. As bactérias apresentam duas subunidades 30S e 50S, enquanto que os eucariotos constituem as subunidades 40S e 60S. Os antimicrobianos que atuam na síntese proteica ligam-se as subunidades ribossomais, interferindo com os estágios da síntese proteica (iniciação, elongação, translocação e terminação). As tetraciclinas, glicilciclinas, nitrofurano e os aminoglicosídeos ligam-se as subunidades 30S;

cloranfenicol, macrolídeos, lincosamidas, oxazolidinonas atuam nas subunidades 50S (SEFTON, 2002; WALSH, 2003).

Figura 4 - Mecanismos de ação dos antimicrobianos.



Fonte: ANVISA, 2007.

O ácido fólico desempenha um papel essencial em etapas da síntese das purinas e pirimidinas. As bactérias necessitam de ácido fólico mas não apresentam um sistema de obtenção deste ácido, sendo necessário sintetizar. As sulfonamidas e trimetoprim possuem suas estruturas moleculares semelhante ao substrato de duas enzimas: PABA (ácido paraminobenzóico) e DHF (ácido didrofólico), que produzem a forma ativa do ácido fólico THF (ácido tetrahidrofólico). A utilização combinada de sulfametoxazol e trimetoprima causam um duplo bloqueio no metabolismo do ácido fólico (HUOVINEN, 2001; SÁENZ, 2004).

Os antimicrobianos que interferem na síntese dos ácidos nucléicos são: a) quinolonas e nitroimidazol - atuando sobre DNA-girase (topoisomerases); b) rifamicinas - ligam-se à RNA polimerase DNA dependente, impedindo a síntese de RNAm (ALDRED at al., 2015; SEFTON, 2002; WALSH, 2003).

As polimixinas e lipopeptídeos ligam-se as membranas de bactérias gram negativas, desorganizando a estrutura, causando a alteração da permeabilidade e saída de constituintes intracelulares através da membrana (SEFTON, 2002).

O uso descontrolado e a prescrição indiscriminada dos antimicrobianos contribuíram com disseminação da resistência bacteriana em microrganismos nosocomiais e comunitários. Entretanto, a descoberta e introdução de novos antimicrobianos diminuíram drasticamente nos últimos anos, e apesar da conscientização dos profissionais da saúde e da população, o uso indiscriminado ainda persiste (BASSETI et al., 2013; IDSA, 2011; SPELLBERG et al., 2008).

1.3.2 Mecanismos de Resistência

A resistência bacteriana pode ser definida como o conjunto de mecanismos as adaptações contra os efeitos nocivos ou letais aos quais as bactérias são expostas (LIVERMORE, 1995). Atualmente, a disseminação da resistência aos antimicrobianos estende-se além da clínica e é considerada um problema mundial de saúde pública, que varia dependendo da localidade e do país (WRIGHT, 2014).

Desde a introdução dos primeiros antimicrobianos, as bactérias desenvolveram vários mecanismos de resistência. Essa resistência pode ser intrínseca ou adquirida (GUARDABASSI, 2006). A resistência intrínseca é natural e evolutivamente conservada nos microrganismos; entretanto a resistência adquirida é resultado de mutações e transferência horizontal de genes (VAN HOEK et al., 2011).

A disseminação de bactérias resistentes é resultado da combinação de múltiplos fatores tais como: mutações nos genes de resistência que aumentam seu espectro de atividade, troca de informações genéticas nas quais genes de resistência são transferidos para novos microrganismos, pressão seletiva exercida pelas condições do meio as quais favorecem a proliferação de clones com resistência aos diversos antimicrobianos (ALANIS, 2005; BUSH et al., 1995).

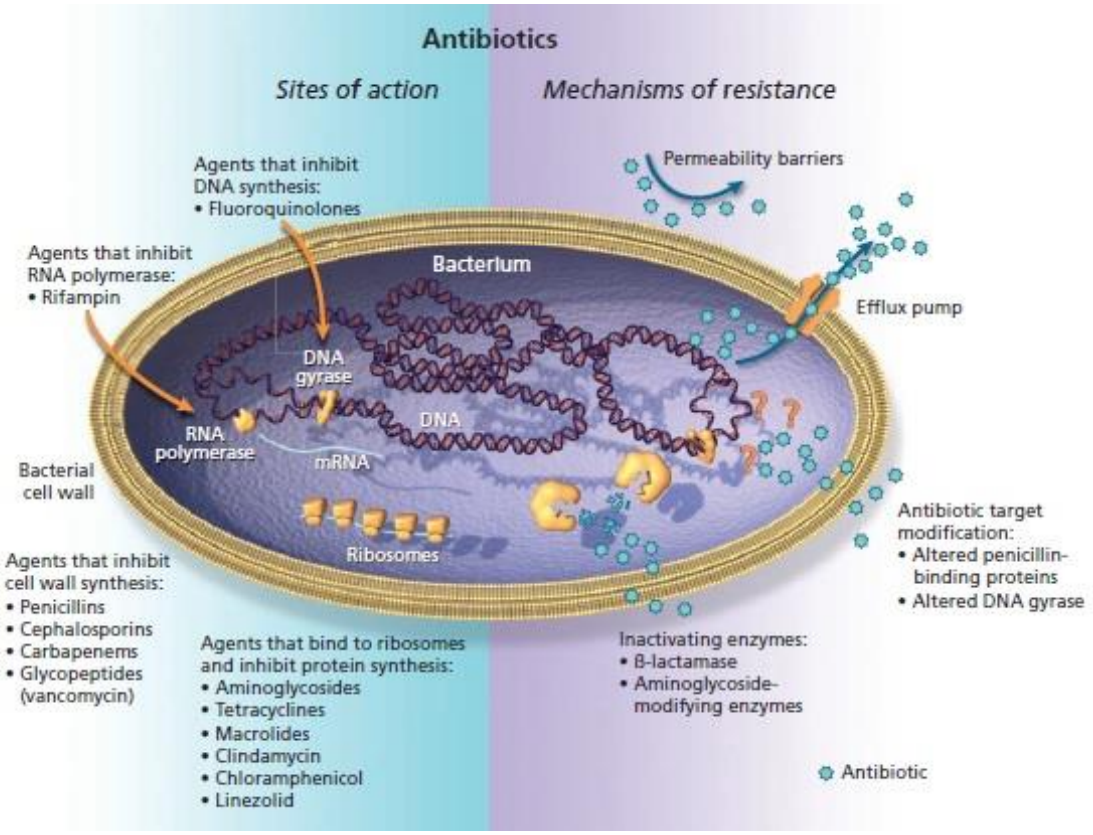
Elementos genéticos podem conter vários genes de resistência de diferentes classes de antibióticos, conferindo as bactérias um fenótipo de multirresistência (MDR). A localização dos genes de resistência nestes elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons e integrons) torna possível a transferência da resistência entre as bactérias (SÁENZ, 2004).

Existem algumas definições para a resistência às múltiplas drogas como: MDR (*Multidrug resistant*), XDR *(Extensively drug-resistant*) e PDR (*Pandrug resistant*). As bactérias MDR se caracterizam por apresentarem resistência a três ou mais classes diferentes de antimicrobianos. As bactérias classificadas como XDR são definidas como resistentes a várias classes de antimicrobianos, sendo essa nomenclatura bastante utilizada para isolados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes aos agentes de primeira escolha. E PDR são considerados os isolados resistentes a todas as classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2011).

Os principais mecanismos de resistência podem ser observados na Figura 5 e são descritos como:

a) alteração da permeabilidade da membrana,
b) modificação ou proteção do sítio alvo,
c) modificação ou inibição enzimática e
d) bombas de efluxo.

Figura 5 - Mecanismos de ação e resistência aos antimicrobianos.



Fonte: Mulvey et al., 2009.

Bactérias gram negativas são menos permeáveis a muitas drogas, devido a sua membrana externa. Antimicrobianos hidrofílicos atravessam a membrana externa por difusão através de porinas ancoradas na membrana. A alteração da permeabilidade da membrana, ocorre por perda ou alteração dos canais de porinas; este mecanismo resulta normalmente em mutações espontâneas exercida pela pressão seletiva dos antimicrobianos (BLAIR et al., 2014; SEFTON, 2002).

A modificação ou proteção do sítio alvo pode ser devido a dois processos: mutação do sítio onde o antimicrobiano se liga, provocando diminuição na afinidade e a produção de uma proteína que se liga ao local específico onde a droga atuaria (BLAIR et al., 2014).

Algumas bactérias produzem enzimas que podem modificar e inativar os antimicrobianos impedindo sua atividade. As enzimas mais conhecidas são as β-lactamases que catalisam a hidrólise do anel β-lactâmico, inativando o antimicrobiano impedindo sua ação contra as proteínas responsáveis pela síntese da parede celular (BUSH; JACOBY, 2010).

As β-lactamases de espectro estendido (ESBL) são capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira e quarta geração e o aztreonam, sendo inativadas por inibidores específicos como: clavulanato, sulbactam e tazobactam. Essas enzimas foram derivadas de mutações nos genes bla_{TEM} e bla_{SHV} que resultaram da substituição de aminoácidos, alterando o substrato específico delas (BUSH; JACOBY, 2010; SILVA; LINCOPAN, 2012).

Outro mecanismo enzimático de resistência são as acetiltranferases, enzimas envolvidas com a resistência ao cloranfenicol (codificadas pelos genes *cat*) que acetilam a molécula de antibiótico impedindo a ligação com os ribossomos bacterianos (SÁENZ, 2004). Em aminoglicosídeos, a resistência pode ser através de absorção reduzida da droga ou modificação enzimática por acetilação (AAC), adenilação (ANT) ou fosforilação (APH) (FOUHY et al., 2014).

As bombas de efluxo são mecanismo de expulsão de substâncias nocivas aos microrganismos, incluindo os antimicrobianos. Esses sistemas normalmente não são substrato dependentes e estão relacionados com a multirresistência. A resistência relacionada com o sistema de efluxo é codificada por genes e proteínas presentes em plasmídeos ou no cromossomo, e são frequentemente associados com mecanismo de resistência intrínseco, permitindo a sobrevivência da bactéria a ambientes hostis (PIDDOCK, 2006a; WEBBER; PIDDOCK, 2003).

Os sistemas de efluxo bacteriano são classificados em famílias de proteínas transportadoras com base na homologia de sequências de aminoácidos, sendo dividida em cinco famílias: ATP- *binding cassette* (ABC), *Major Facilator Superfamily (*MFS), *Resistence Nodulation Cell Division* (RND), *Small Multidrug Resistence* (SMR) e *Multidrug and Toxic Extrusion* (MATE). Esses sistemas utilizam à força próton motiva como fonte de energia, exceto a família ABC que utiliza a hidrólise do ATP para exportar os substratos (MOREIRA et al, 2004; WEBBER; PIDDOCK, 2003).

As bactérias gram negativas apresentam um arsenal de mecanismos de resistência aos antimicrobianos comumente utilizados na prática médica e vem tornando-se um obstáculo na conduta terapêutica contra infecções em pacientes hospitalizados. Em *E. coli* existe uma variedade de mecanismos de resistência descritos, sendo que são utilizados antimicrobianos de várias classes para diversas infecções. Dentre os principais mecanismos descritos para *E. coli* pode-se observar: produção de β-lactamases, metilação do RNA ribossomal, bombas de efluxo, modificação enzimática do antimicrobiano e mutações das DNA girases (BLAIR et al., 2014).

1.4 Resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli*

Dentre os membros da família *Enterobacteriaceae*, a espécie *E. coli* tem sido prevalente em infecções nosocomiais ao redor do mundo. Sua resistência é verificada e sabe-se que bactérias comensais são reservatórios de diversos genes de resistência (SEPP et al., 2009).

A resistência aos β-lactâmicos em *E. coli* é mediada principalmente por enzimas β-lactamases e uma grande variedade delas foram descritas e caracterizadas (DOMINGUEZ et al., 2002; LIVERMORE, 1995). As β-lactamases AmpC (β-lactamase de classe C) podem ser codificadas por cromossomos ou plasmídeos, são capazes de conferir resistência para a maioria das penicilinas e para as cefalosporinas de terceira geração (JACOBY, 2009). No Brasil, a presença de AmpC plasmidial, tem sido reportada e em isolados de *E. coli*, o gene bla_{CMY-2} foi correlacionado (PAVEZ et al., 2008; PEIRANO et al., 2006).

Desde as primeiras detecções das ESBL, estas enzimas têm mostrado grande capacidade de disseminação tanto em ambientes hospitalares quanto na

comunidade, além de ser considerado um dos principais mecanismos de resistência em *E. coli* (BUSH; FISHER, 2011).

Em *E. coli* 90% da resistência associada a ampicilina está relacionada a produção de TEM-1 (Temoniera). Atualmente as enzimas CTX-M (Cefotaximases) têm sido as mais detectadas e no Brasil as mais prevalentes são: CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9 (QUEIROZ et al., 2012; SILVA; LINCOPAN, 2012). Cepas de *E. coli* produtora da enzima CTX-M-15, vêm emergindo desde 2003, como um importante patógeno da comunidade e em infecções adquiridas em hospital no mundo todo (PEIRANO; PITOUT, 2010).

Mundialmente as principais ESBL associadas com resistência *E. coli* são as TEM, CTX-M, SHV *(Sulphydryl variable)* e OXA (Oxacilinases) (SILVA; LINCOPAN, 2012). Infelizmente no Brasil, não existem programas de vigilância de abrangência nacional referentes à resistência bacteriana e a seus mecanismos, tornando-se difícil estimar a prevalência de cepas produtoras de ESBL.

O desenvolvimento da resistência aos carbapenêmicos em *E. coli* merece atenção, por ser muitas vezes a última terapia eficaz disponível para o tratamento de infecções graves. Entre as carbapenemases distribuídas mundialmente em *E. coli* estão: NDM (*New Dehli metalo-β-lactamase*) e OXA-48 (PEIRANO et al., 2014).

Klebsiela pneumoniae produtora de carbapenemase (KPC) foi primeiramente identificada em *K. pneumoniae,* sendo rapidamente disseminada e o gene bla_{KPC} é encontrado em outros gêneros da família *Enterobacteriaeceae*, inclusive em *E. coli* (PEIRANO; PITOUT, 2010). Existe grande preocupação com a aquisição do gene bla_{KPC} por *E. coli*, por ela pertencer a microbiota residente e servir como veículo de propagação em ambientes comunitários e hospitalares. Os dados epidemiológicos para *E. coli* produtora de bla_{KPC} ainda permanecem relativamente escassos (OHARA et al., 2014).

Um grande problema para terapêutica humana e animal é a resistência a classe das quinolonas. O principal mecanismo de resistência em quinolonas de *E. coli* inclui alterações do alvo molecular de ação associadas as mutações dos genes *gyrA* e *parC* (DOMINGUEZ et al., 2002; WIEDEMANN; HEISING, 1994;).

No Brasil a resistência para quinolonas associada a plasmídeos, tem aumentado nos isolados de ambientes hospitalares e da comunidade. Essa resistência tem sido relacionada frequentemente à presença dos genes *qnrA, qnrB,*

qnrS (FERRARI et al, 2011; VASCONCELOS et al., 2010), sendo os mais prevalentes *qnrB* e *qnrS*.

A resistência para aminoglicosídeos em *E. coli* é principalmente devido à expressão de enzimas de modificação e diferentes determinantes genéticos foram identificados, tais como: *aac (6´) -I*, *aph (3') -I, aac (3) - I,* a*ac (3) -II, aac (3) -III, aac (3) -IV,* e *ant* (2''). Os genes *aac* e *ant* são os mais detectados em isolados de *E. coli* tanto da comunidade como de ambientes hospitalares (DOMINGUEZ et al., 2002; SHAW et al, 1993).

Diferentes genes de *tet* têm sido identificados em isolados de *E. coli* resistente à tetraciclina como: *tetA, tetB, tetC, tetD, tetE* e *tetI.* Embora essa classe de antimicrobianos não seja comumente utilizada para tratamento de infecções causadas por *E. coli,* os genes *tetA, tetB* e *tetD* são os mais detectados e estão associados ao mecanismo de bombas de efluxo (DOMINGUEZ et al., 2002;. ROBERTS, 1996).

A nitrofurantoina age por sofrer redução de nitrorredutases bacterianas para gerar derivados tóxicos que ligam aos ribossomos, fazendo com que a transcrição e tradução sejam prejudicadas. A resistência em *E. coli* envolve mutações de perda de função em dois genes que codificam nitrorredutases *nfsA* e *nfsB* (XAVIER et al., 2014) e os dados sobre sua prevalência são escassos.

Em *E. coli* já foram descritas vários sistemas de bombas de efluxo, entretanto as bombas da família RND são as mais caracterizadas. São compostas de três partes: uma proteína transportadora ancorada na membrana interna responsável pelo efluxo, uma proteína acessória localizada no espaço periplasmático conhecida também como proteína de fusão e uma proteína localizada na membrana externa (NIKAIDO; TAKATSUKA, 2009 ; PIDDOCK, 2006b).

As bombas AcrAB-TolC, em *E. coli*, é uma das mais estudadas e é homóloga ao sistema MexAB-OprM em *Pseudomonas aeruginosa.* O perfil de substrato da bomba AcrAB-TolC inclui: corantes catiônicos, como acriflavina, cristal violeta, brometo de etídeo e rodamina; antimicrobianos como as penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclinas, novobiocina, rifampicina, ácido fusídico, ácido nalidíxico; detergentes como Triton, SDS e sais biliares, por isso esse sistema está envolvido com a multirresistência (NIKAIDO; TAKATSUKA, 2009).

A tigeciclina, apesar de ser uma droga não prescrita com frequência para infecções acometidas por *E. coli,* foi desenvolvida para superar os principais mecanismos de resistência a tetraciclina: presença dos genes *tet* e as bombas de efluxo*.* Embora a tigeciclina possa induzir a expressão das bombas, a evasão do efluxo é provavelmente conferida pelo grupo 9-t-butilglicilamido, que impede a tigeciclina de ser reconhecido como um substrato de bomba de efluxo, isto é, a bomba não reconhece mais o substrato pela modificação da estrutura molecular da droga (*Bypassing*) (LINKEVICIUS et al., 2013; PAGES et al., 2005).

Até o momento, poucos estudos epidemiológicos têm avaliado a prevalência da resistência de *E. coli* em pacientes assintomáticos (AMAYA et al., 2011; BAILEY et al., 2010, MOSQUITO et al., 2012). A maioria dos estudos que avaliam a prevalência foram realizadas em populações sintomáticas, em isolados obtidos a partir de pacientes com infecções do trato urinário infecção ou bacteremias (ERB et al., 2007).

Os dados epidemiológicos brasileiros mostram que a frequência de isolados resistentes podem variar significativamente de região para região ou mesmo de hospital para hospital dentro de uma mesma região geográfica, sendo que o Brasil vem apresentando altos índices de resistência em relação aos países da América do Norte, Europa e Ásia (GALES et al., 2003; LINCOPAN et al., 2006; SADER et al., 2005).

Assim, este estudo ressalta a magnitude do problema da resistência aos antimicrobianos e da urgente necessidade de vigilância e controle desse fenômeno. A utilização de métodos baratos e sensíveis para monitorar a resistência aos antimicrobianos em bactérias comensais podem tornar ferramentas valiosas.

O uso indevido e indiscriminado de antimicrobianos altera a microbiota intestinal residente levando à diminuição da diversidade e a supressão de microrganismos, tornando um reservatório de resistência, albergando genes silenciosos, desencadeando mutações e a super expressão de bombas de efluxo, além da transferência horizontal de elementos genéticos intra e inter espécies.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar de forma comparativa alguns microrganismos que compõem a microbiota fecal de crianças com e sem antibioticoterapia em idade escolar; bem como avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos e os genes de resistência envolvidos.

2.2 Específicos

1. Avaliar por PCR quantitativo a presença de: *Bacteroides fragilis, Bacteroides vulgatus, Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides merdae*, *Bifidobacterium* spp., *Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Escherichia coli, Lactobacillus* spp., *Methanobrevibacter smithii* e dos filos *Bacteroidetes e Firmicutes;*
2. Isolamento e identificação de *Escherichia coli* das amostras fecais*;*
3. Verificar a presença de *Escherichia coli* diarreiogênicas (DEC): *E. coli* enteropatogênica (EPEC) típicas e atípicas, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) típicas e atípicas e *E. coli* produtora de Shiga toxina (STEC);
4. Avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *E. coli*;
5. Verificar a presença de genes de resistência para diversas classes de drogas nos isolados de *E. coli*;
6. Avaliar a diversidade genética dos isolados de *E. coli* comensal e diarreiogênicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram coletadas 61 amostras fecais de crianças em idade escolar entre 3 a 12 anos, sem diarreia, sem distinção de sexo e raça (Apêndice 1), sendo divididas em dois grupos:

Grupo Controle: 30 crianças sem uso de antimicrobianos;

Grupo Antibióticos: 31 crianças em tratamento com antimicrobianos (aminoglicosídeos, β-lactâmicos, glicopeptídeos, lincosamidas, macrolídeos, oxazolidinonas, quinolonas e sulfonamidas).

Como critérios de exclusão para o grupo controle não foram coletadas amostras de crianças que estavam sob antibioticoterapia ou que estiveram em tratamento nos últimos três meses.

As amostras foram coletadas no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas (Faculdade de Medicina - USP) e em escolas públicas (E.E. Clorinda Dante, Creche Maria de Nazaré) e privada (Colégio Trentus) da região metropolitana de São Paulo, entre Janeiro de 2012 até Julho de 2013. Os familiares responsáveis pelas respectivas crianças assinaram o Termo de Esclarecimento e Participação Livre, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (Proc. N° 1058/CEP).

3.2 Análise quantitativa das amostras fecais

3.2.1 Extração do DNA total das fezes

A extração do DNA foi realizada utilizando o kit comercial QIAmp DNA Stool Mini (Qiagen®), conforme instruções do fabricante. O DNA obtido foi avaliado quanto à concentração e integridade, por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA), visualizado em gel de agarose (1%) e mantido a -80 ºC, até seu uso.

3.2.2 Quantificação por PCR em Tempo Real (qPCR)

Para a avaliação quantitativa de alguns dos microrganismos presentes na microbiota fecal dessas crianças foi realizada a PCR em tempo real (qPCR), utilizando o sistema SYBR® Green, tendo como alvo o gene 16S rRNA dos gêneros e espécies: *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *B. fragilis, B. vulgatus, P.*

distasonis, *P. merdae*, *C. difficile, C. perfringens, E. coli, M. smithii* e dos filos *Bacteroidetes e Firmicutes.* As sequencias dos oligonucleotídeos e as condições de PCR encontram-se descritos na Tabela 1. Os oligonucleotídeos utilizados para *M. smithii* e para filo *Bacteroidetes* foram desenhados neste estudo, utilizando os programas primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) e NetPrimer (http://www.premierbiosoft.com/netprimer/).

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na detecção e quantificação por qPCR.

Microrganismos	Oligonucleotídeos 5´⟶ 3´	Tm (ºC)	Tamanho do produto (pb)	Referências
Bifidobacterium spp.	F: GCG TGC TTA ACA CAT GCA AGTC R: CAC CCG TT TCCA GGA GCT ATT	60	125	Ponnusamy et al., 2010
Lactobacillus spp.	F: AGC AGT AGG GAA TCT TCC A R: ATT YCA CCG CTA CAC ATG	56	380	Ponnusamy et al., 2010
Bacteroides fragilis	F: TCR GGA AGA AAG CTT GCT R: CAT CCT TTA CCG GAA TCC T	63	162	Tong et al., 2011
Bacteroides vulgatus	F: GCA TCA TGA GTC CGC ATG TTC R: TCC ATA CCC GAC TTT ATT CCT T	60	287	Wang et al., 1996
Parabacteroides distasonis	F: TGC CTA TCA GAG GGG GAT AAC R: GCA AAT ATT CCC ATG CGG GAT	60	80	Tong et al., 2011
Parabacteroides merdae	F: AGG GTG CGT AGG TGG TGAT R: TTC ACC GCT ACA CCA CGC	60	122	Tong et al., 2011
Clostridium difficile	F: ATT AGG AGG AAC ACC AGT TG R: AGG AGA TGT CAT TGG GAT GT	56	307	Kang et al., 2010
Clostridium perfringens	F: TCA TCA TTCA ACC AAA GGA GCA ATC C R: CCT TGG TAG GCC GTT ACC C	55	105	Siragusa et al., 2007
Escherichia coli	F: AGA AGC TTG CTC TTT GCT GA R: CTT TGG TCT TGC GAC GTT AT	57	120	Lee et al.,2010
Methanobrevibacter smithii	F: AGGTACTCCCAGGGTAGAGG R: TCCCTCACCGTCAGAATCG	59	92	Este estudo
Bacteroidetes	F: TGG TAG TCC RCR CDG TAA ACG ATG R: ATGT TCC TCC GCT TGT GC	60	150	Este estudo
Firmicutes	F: TRAAACTYAAAGGAATTGACG R: ACC ATG CAC CAC CTG TC	61	155	De Gregoris et al., 2011

Foi realizada a padronização da curva padrão para os seguintes microrganismos (Figuras 6 a 17): *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482, *Parabacteroides distasonis* ATCC 8503, *Parabacteroides merdae* ATCC 43184, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 1696, *Clostridium difficile* VPI 10468, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Escherichia coli* ATCC 25922,

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356, *Methanobrevibacter smithii* ATCC 35061 e para os filos *Bacteroidetes* foi utilizado DNA de *P. merdae* ATCC 43184 e para *Firmicutes* o DNA de *Clostridium perfringens* ATCC 13124, com oito pontos de diluição e realizadas em duplicata. Foram consideradas as curvas que apresentaram uma eficiência de 0,8-1,0.

As reações de amplificações foram realizadas em termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Mort Iake, New South Wales, Australia). A reação de amplificação foi realizada em volume final de 20 µL contendo: 10 µL, de SYBR Green PCR Master Mix 2X (contendo *Taq* DNA polimerase, tampão para PCR, mix de dNTP e SYBR – GoTaq qPCR Master Mix - Promega Corporation, Brasil), 0,9 µL da solução de cada iniciador (5 µM) (Tabela 1), 2 µL de DNA e 7,1 µL de água ultra pura (Promega, Brasil). As condições para amplificação foram: 1 ciclo de 95 ºC por 10 minutos, 40 ciclos de 95 ºC por 15 segundos e temperatura de anelamento dos iniciadores (Tabela 1) por 30 segundos. Após a ciclagem a curva de dissociação (“*melting curve”*) foi realizada para avaliar a presença de produtos inespecíficos (“*primers dimers”*). Como controle negativo foi utilizado uma mistura da reação de PCR sem DNA.

Figura 6 - Curva padrão de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285.

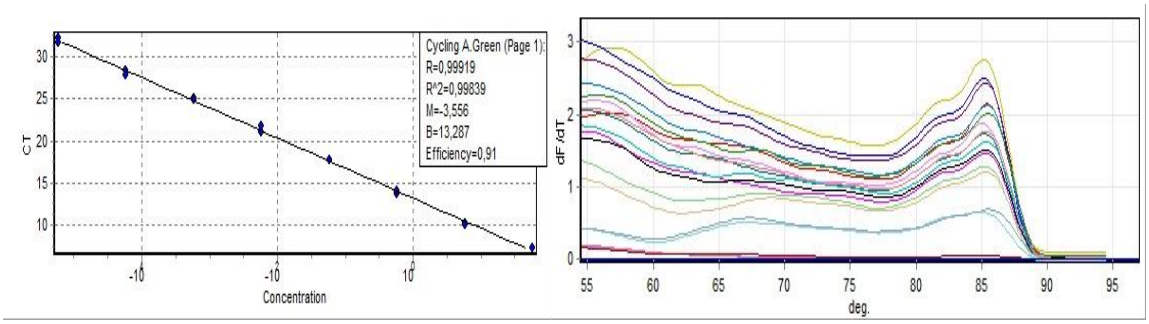


Figura 7- Curva padrão de *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482.

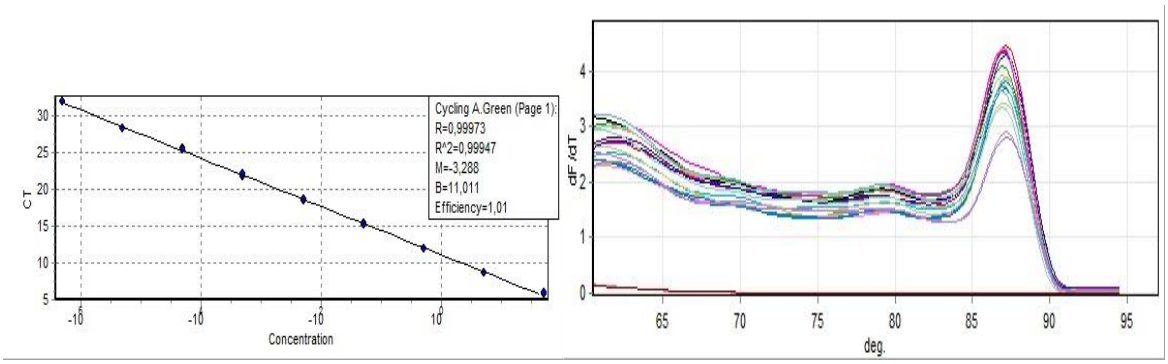


Figura 8 - Curva padrão de *Parabacteroides distasonis* ATCC 8503.

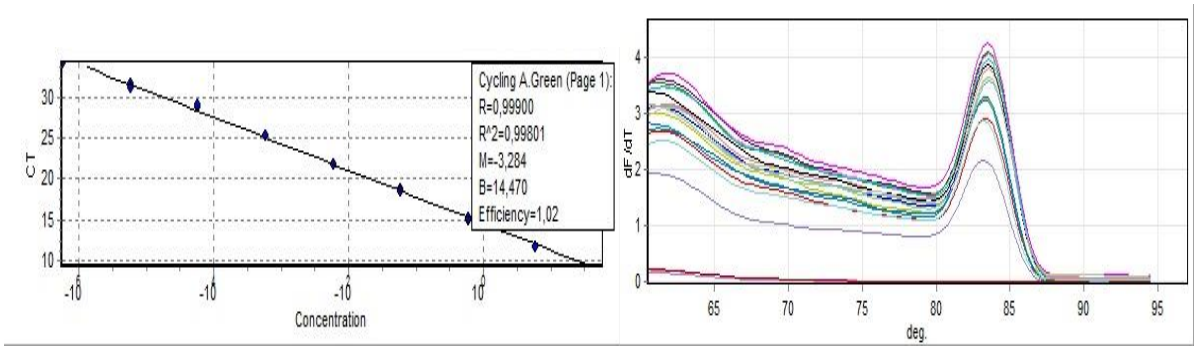


Figura 9 -Curva padrão de *Parabacteroides merdae* ATCC 43184.

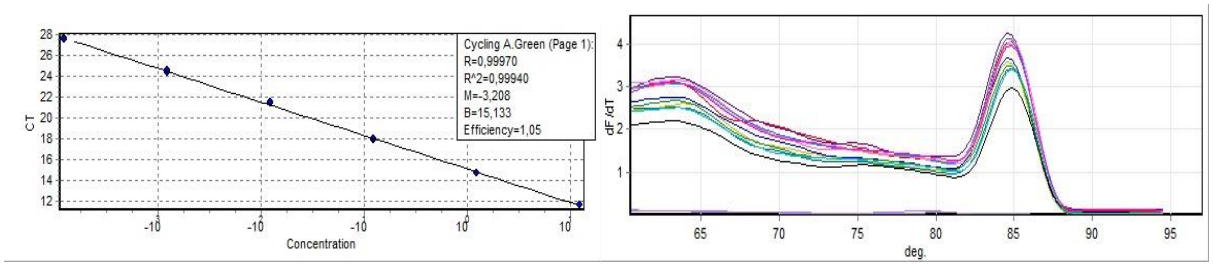


Figura 10- Curva padrão de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 1696.

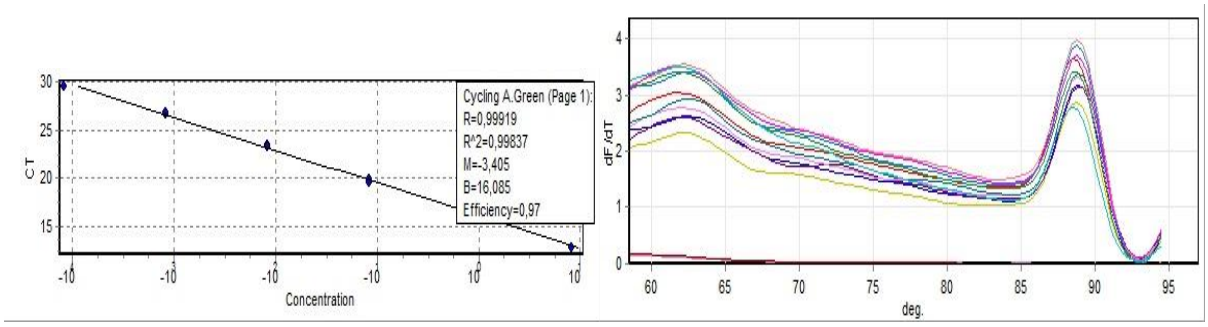


Figura 11- Curva padrão de *Clostridium difficile* VPI 10468.

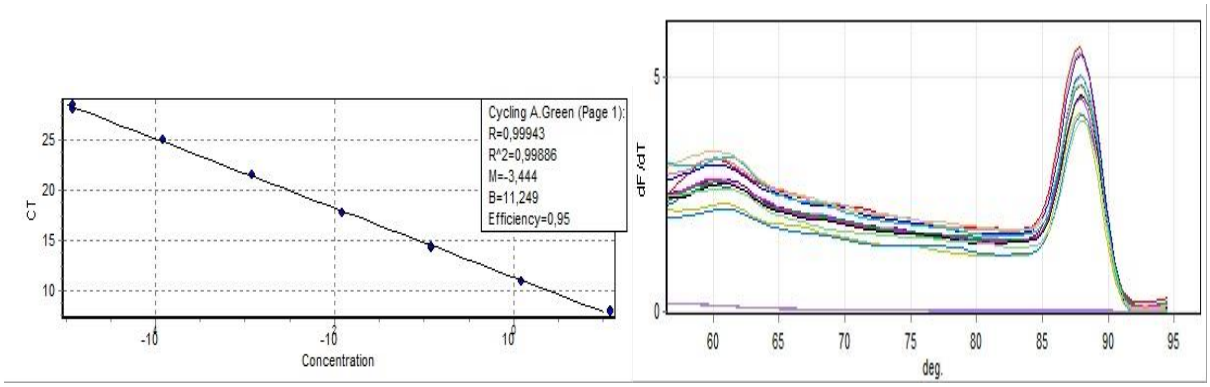


Figura 12 - Curva padrão de *Clostridium perfringens* ATCC 13124.

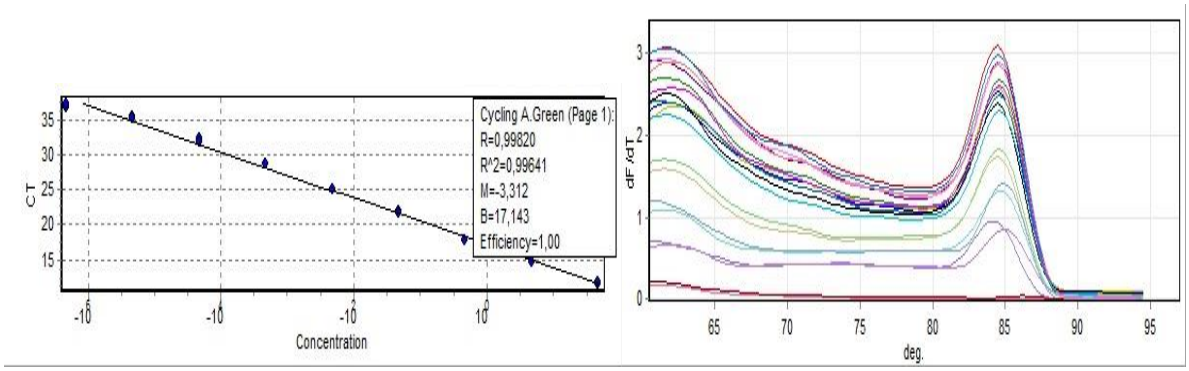


Figura 13 - Curva padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922.

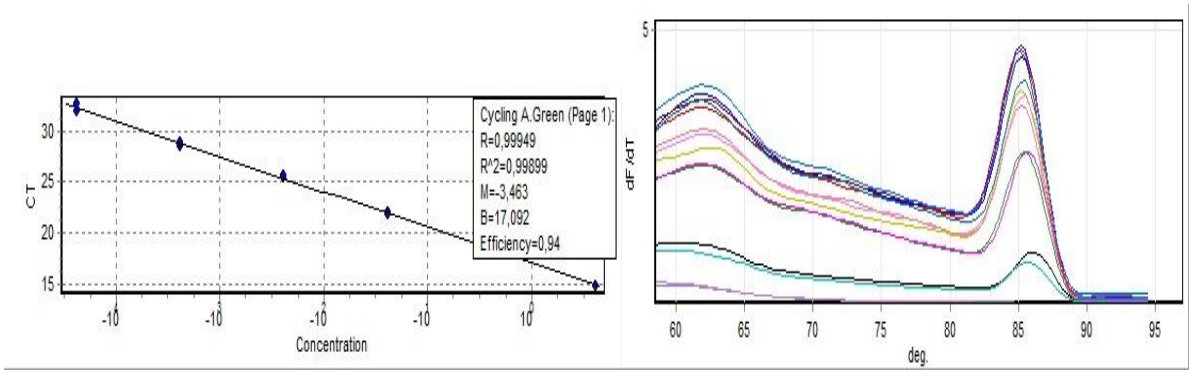


Figura 14 - Curva padrão de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

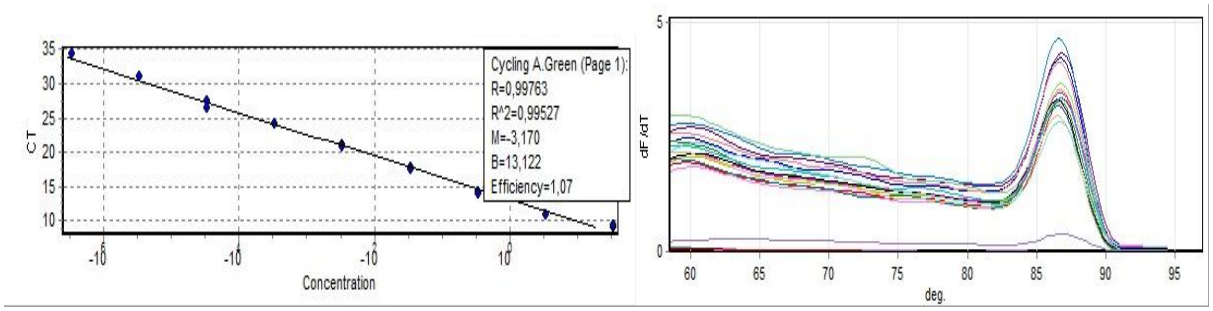


Figura 15 - Curva padrão de *Methanobrevibacter smithii* ATCC 35061.

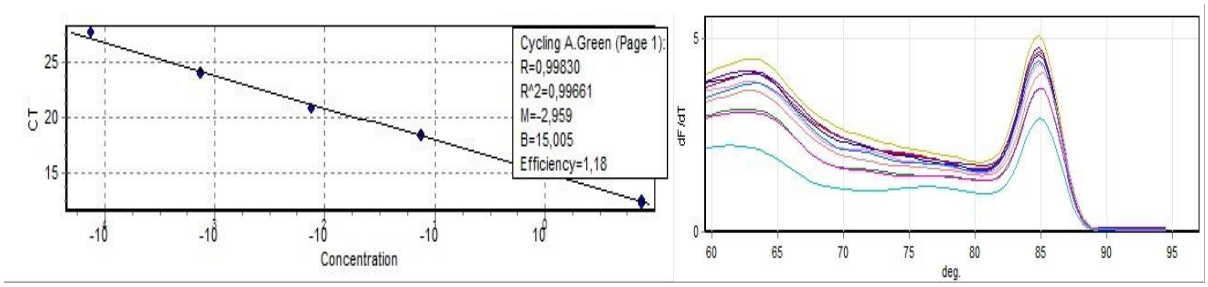


Figura 16 - Curva padrão de *Bacteroidetes.*

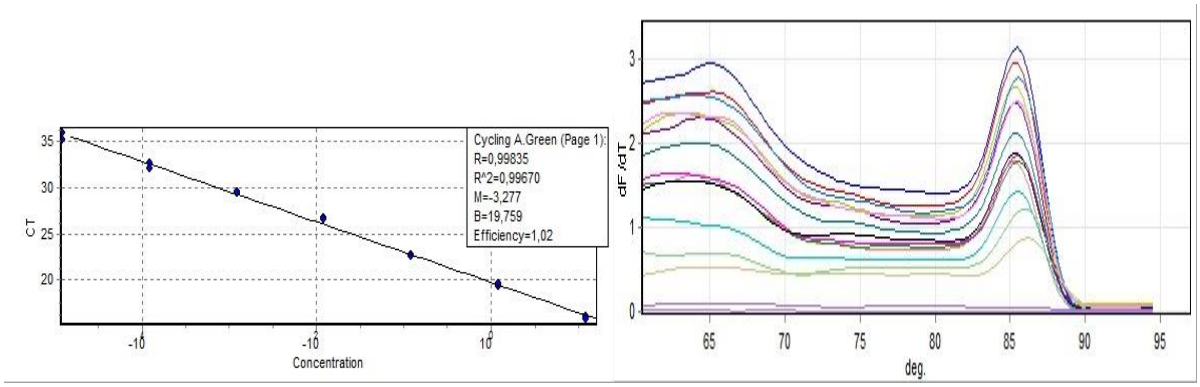
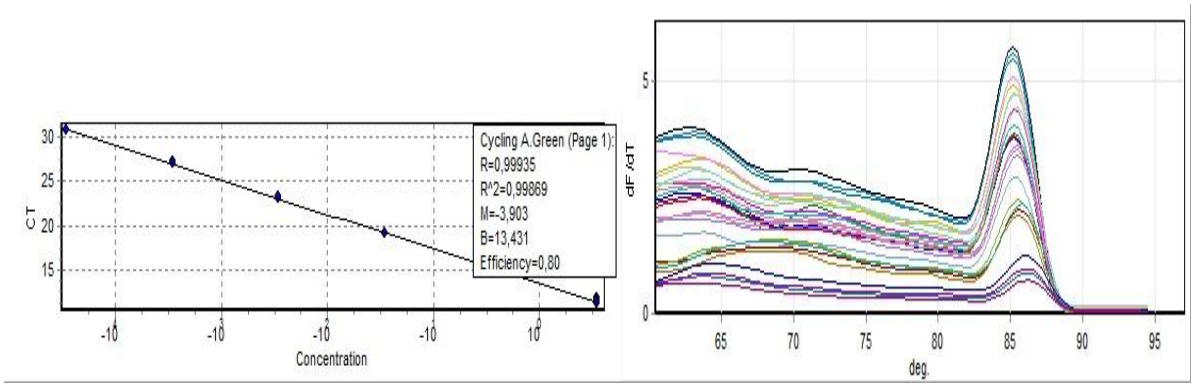


Figura 17 - Curva padrão de *Firmicutes.*



3.3 Isolamento e identificação de *E. coli* comensais e diarreiogênicas

As amostras foram coletadas em coletores universais estéreis e transportadas imediatamente ao laboratório. As fezes foram semeadas em ágar MacConkey (BD, Brasil) para o isolamento bacteriano de *E. coli* sendo incubadas a 37 ºC por 18-24 horas. Para identificação foram selecionadas quatro colônias lactose positiva, e mantidas em meio Luria-Bertani (LB) (BD, Brasil).

A extração de DNA foi realizada pelo método de fervura, a partir de 1 colônia cultivada em meio LB sendo ressuspendida em 200 µL de água ultra pura estéril e fervida por 20 minutos. Após a fervura, o material foi centrifugado 14.000 x *g* por 10 minutos e os sobrenadantes (DNA) foram separados. A identificação de *E. coli* foi realizada por PCR com oligonucleotídeos específicos do gene 16S rRNA (MALINEN et al., 2003) e a identificação de seus patotipos segundo Aranda et al., (2004 e 2007). As sequencias dos oligonucleotídeos e as condições de PCR encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Sequências de oligonucleotídeos para identificação de *E. coli* comensais e diarreiogênicas.

Genes alvo	Patotipos	Oligonucleotídeos 5' ⟶ 3'	Temperatura de anelamento (ºC)	Tamanho dos produtos (pb)
16S rRNA	-*	F: GTT AAT ACC TTT GCT CAT TGA R: ACC AGG GTA TCT AAT CCT GTT	50	340
eae	EPEC	F: CTG AAC GGC GAT TAC GCG AA R: CCA GAC GAT ACG ATC CAG	58	917
bfp	tEPEC	F: AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC R: GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	58	326
CVD432*	EAEC	F: CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT R: CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGTT	58	630
aggR	tEAEC	F: GTA TAC ACA AAA GAA GGA AGC R: ACA GAA TCG TCA GCA TCA GC	50	254
elt	ETEC	F: GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC R: CGG TCT CTA TAT TCC CTGT T	50	450
est	ETEC	F: ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T R: CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT	50	190
ipaH	EIEC	F: GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C R: GCC GGT CAG CCA CCC TC TGA GAG TAC	50	600
stx1	STEC	F: ATA AAT CGC CAT TCG TTG ACT AC R: AGA ACG CCC ACTG AGA TCA TC	50	180
stx2	STEC	F: GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC R: TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	50	255

Gene *eae* (*attaching and effacing lesions*), gene *bfp (bundle forming pillus*), CVD 432 (Sonda), gene *aggR* (*transcriptional activator for the*), genes *elt* e *est* (enterotoxinas de ETEC), gene *ipaH (invasion plasmid antigen H*), genes *stx1* e *stx2 (*Toxina de Shiga 1 e 2).
*-: não determinação dos patotipos; EPEC (*E. coli* enteropatogênica), EPECt (*E. coli* enteropatogênica típica), EAEC (*E. coli* enteroagregativa), EAECt, (*E. coli* enteroagregativa típica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora) STEC (*E. coli* produtora da toxina de Shiga).

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo: água ultra pura, 2,5 µL de 10X de tampão PCR, 1,0 µL $MgCl_2$ (50 mM), 1,0 µL dNTP (20 µM), 0,25 µL de Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) (0,5 U), 1,0 µL de cada iniciador (20 µM) (Tabela 2) e 5,0 µL de DNA. A amplificação

foi realizada no termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Alemanha) nas seguintes condições: 1 ciclo de 94 ºC por 5 minutos; 35 ciclos de 94 ºC por 30 segundos, temperatura de anelamento por 1 minuto e 72 ºC por 1 minuto; e extensão final: 1 ciclo de 72 ºC por 5 minutos.

Foram utilizados como controles positivos: *Escherichia coli* ATCC 25922 e cepas protótipos dos patotipos de DEC: EHEC EDL 933, ETEC H10407, EAEC 042, EIEC O124:14, EPEC E2348/69 (Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo) e como controles negativo as cepas de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 e *E. coli* K12 DH5α.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e fotografados pelo sistema Kodak Scientific System. Foram utilizados marcadores de peso molecular de 100 bp e 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Brasil). Após identificação os isolados foram mantidos em meio LB, congelados em Cryo Care (Key Scientific Products, Inc., EUA) e estocados a -80 °C.

As amostras positivas foram submetidas a reação de sequenciamento, utilizando os mesmos iniciadores (Tabela 2). Os produtos de PCR foram purificados com kit comercial Ilustra GFX (GE Healthcare Life Sciences do Brasil) e enviados para sequenciamento (Centro de Estudos do Genoma Humano, Serviço de Sequenciamento, IB-USP). As reações foram realizadas segundo sistema MegaBACE 1000, utilizando DYEnamic ET Dye Terminator kit (Thermo Sequenase II DNA Polimerase). As sequencias obtidas foram analisadas pelos programas Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd.) e comparadas com as sequencias depositadas no GenBank, com o auxílio do programa BLAST (NCBI).

3.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição (CLSI, 2013), utilizando o meio Muller-Hinton (BD, Brasil)**.** As drogas testadas foram: ampicilina cefoxitina, ceftriaxona, meropenem, ciprofloxacina, canamicina, cloranfenicol, nitrofurantoína, tetraciclina (Sigma-Aldrich Co., EUA), levolofloxacina e tigeciclina (Pharmaceutical Research Institute, EUA). As concentrações dos antibióticos variaram de 0,25 a 256 µg/mL para isolados do grupo controle e de 1 a 1024 µg/mL para os isolados do grupo com antibioticoterapia. Meios sem drogas foram usados como controle de viabilidade do teste; e para

controle de qualidade foram incluídas as cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

O inóculo foi padronizado para 1,5 x 10^8 células/mL com a escala 0,5 de McFarland (BioMerieux, Brasil). A suspensão bacteriana foi diluída (1,5 x 10^6 células/mL) e adicionado 50 µL em cada poço na placa de microtitulação. As placas foram inoculadas, em duplicata, e incubadas a 37 °C, por 18-24 horas.

O CIM foi determinado como a menor concentração de cada droga capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano. Para auxílio da leitura das placas foi utilizado como revelador o corante resazurina (0,002%) e incubado a 37 °C por 20 minutos. O corante resazurina apresenta sua cor natural azul marinho e permanece desta mesma cor em poços em que não há o crescimento bacteriano. Quando há crescimento bacteriano, devido a acidificação do meio, o corante altera sua cor para rosa.

3.5 Detecção dos genes de resistência aos antimicrobianos

Foram avaliados genes de resistência de diversas classes de antimicrobianos, entre elas: aminoglicosídeos (*aac, ant)*; β-lactâmicos (bla_{CTX-M}, bla_{TEM}, bla_{KPC}, bla_{IMP-1}, *amp*C); cloranfenicol (*cmlA, cat, flor*); nitrofurantoína (*nfs*A, *nfs*B); quinolonas (*qnr*B) e tetraciclinas (*tet*A, *tet*B, *tet*C).

Todos os iniciadores para detecção dos genes de resistência foram desenhados neste estudo, utilizando os programas primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) e NetPrimer (http://www.premierbiosoft.com/netprimer/). As sequencias dos oligonucleotídeos e as condições de PCR encontram-se descritos na Tabela 3.

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 µL contendo: água ultra pura, 2,5 µL de 10X de tampão PCR, 0,75 µL $MgCl_2$ (50 mM), 1,0 µL dNTP (20 µM), 0,25 µL de Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) (0,5 U), 1,0 µL de cada iniciador (20 µM) (Tabela 3) e 2,0 µL de DNA. A amplificação foi realizada no termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Alemanha) nas seguintes condições: 1 ciclo de 94 ºC por 5 minutos; 35 ciclos de 94 ºC por 30 segundos, temperatura de anelamento por 30 segundos e 72 ºC por 30 segundos; e extensão final: 1 ciclo de 72 ºC por 5 minutos. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e

fotografados pelo sistema Kodak Scientific System. Foram utilizados marcadores de peso molecular de 100 bp e 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Brasil).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados para detecção dos genes de resistência.

Classes de antimicrobianos	Genes	Oligonucleotídeos 5 ⟶ ´3´	Temperaturas de anelamento (ºC)	Tamanhos dos produtos (pb)
Aminoglicosídeos	*aac*	F: CGA ACA GGT AGC ACT GAG CA R: TGG CAC TGT GAT GGG ATA CG	62	593
	ant	F: ATC ATC CCG TGG CGT TAT CC R: CTG GGC AGG TAG GCG TTT TA	62	372
β-lactâmicos	*bla*$_{CTX-M}$	F: AAT GGG ACGA TGT CAC TGG C R: GCC CGA GGT GAA GTG GTA TC	59	215
	bla$_{TEM}$	F: TCC TTG AGA GTT TTC GCC CC R: TTA TCC GCC TCC ATC CAG TC	60	478
	bla$_{KPC}$	F: ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT R: CGG TCG TGT TTC CCT TTA GC	63	646
	bla$_{IMP-1}$	F: TTA GAA AAG GAA AAG TAT GAG R: GCA ACG ACT TGT TAG AAA T	53	776
	*amp*C	F: CTT TCT GCT CTG CCT CCC TC R: GCT GAT TGAA ACA CAG GGC G	60	167
Cloranfenicol	*cmlA*	F: ATC AGG CAT CCC ATT CCC AT R: TGT CAT TTA CGG CAT ACT CG	58	456
	cat	F: TAT GGC AAT GAA AGA CGG TG R: GGG ATT GGC TGA GAC GA	60	226
	flor	F: GGC TTT CGT CAT TGC GTC TC R: CCA TCT GGC GAC AAA GGA CT	58	565
Nitrofurantoína	*nfsA*	F: ATT GAA GCG GTG ACG GAA CT R: TGC GTC TTT ATC CAG CGG TT	60	159
	nfsb	F: CCC GCT AAA TCT TCA ACC TG R: AAA AGA GTG CGT CCA GGC TA	60	913
Quinolonas	*qnrB*	F: AAT GGC AGA TTT CCG CAA CG R: CCA ATCA CAG CGA TGC CAA G	62	426
Tetraciclinas	tetA	F: CTT TCC TTT GGG TTC TCT AT R: CAA ATG CGG CAA GCG AAA T	57	500
	tetB	F: CAC TAA ATG GGG CGA AAA AA R: CTA AGC ACT TGT CTC CTG TT	59	400
	tetC	F: GAC TAT CGT CGC CGC ACT TA R: TCG TCA TCT ACC TGC CTG GA	61	366

Foram utilizados como controle positivo: *Klebsiella pneumoniae* IAL 922/11 (Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo) para *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{KPC}$; *K. pneumoniae* KpBV-1 (Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas, ICB-USP) para *bla*$_{IMP-1}$, *K. pneumoniae* IAL 1064/13 (Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo) para *amp*C, *Enterobacter cloacae*

284 (Laboratório Especial de Microbiologia Clínica - LEMC, Universidade Federal de São Paulo) para *qnr*B. Para os demais genes utilizou-se como controle positivo amostras positivas que foram confirmadas por sequenciamento conforme descrito no item 3.3.

3.6 Tipagem Molecular por AP-PCR

A diversidade genética dos isolados de *E. coli* comensal e diarreiogênica de ambos os grupos, foi determinada pela técnica de AP-PCR segundo Williams et al., (1990), utilizando o oligonucleotídeo arbitrário OPA-09 (GGG TAA CGC C).

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo: água ultra pura, 2,5 µL de 10X de tampão PCR, 1,5 µL $MgCl_2$ (50 mM), 1,0 µL dNTP (20 µM), 0,25 µL de Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) (0,5 U), 1,0 µL do iniciador (20 µM) e 5,0 µL de DNA. A amplificação foi realizada no termociclador Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) nas seguintes condições: 1 ciclo de 94 ºC por 5 minutos; 35 ciclos de 94 ºC por 30 segundos, 36 ºC por 1 minuto e 72 ºC por 2 minutos; extensão final: 1 ciclo de 72 ºC por 5 minutos. As cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 foram incluídas nas análises.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e fotografados pelo sistema Kodak Scientific System. Foram utilizados marcadores de peso molecular de 100 bp e 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Brasil). Os diferentes perfis genéticos foram analisados e construído dendrogramas com auxíliio do programa NTSYS (Applied Biostatitics, Inc. versão 2.21) utilizando o coeficiente de SM (*Simple Matching*).

3.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através dos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis utilizando nível de significância de 5% (p<0,05). Os dados nominais foram analisados utilizando o teste de Chi-quadrado e para as correlações foi utilizado o teste de Spearman. As análises foram obtidas com os programas estatísticos GraphPad Prism version 6.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA) e BioStat 2009 versão 5.3.5.

4 RESULTADOS

4.1 Análise quantitativa por qPCR das amostras fecais

A análise quantitativa dos microrganismos foi realizada a partir das fezes por qPCR em ambos os grupos, e os resultados estão expressos na Tabela 4 apresentados em valores da mediana do $\log_{10}$ do número de cópias/gramas de fezes.

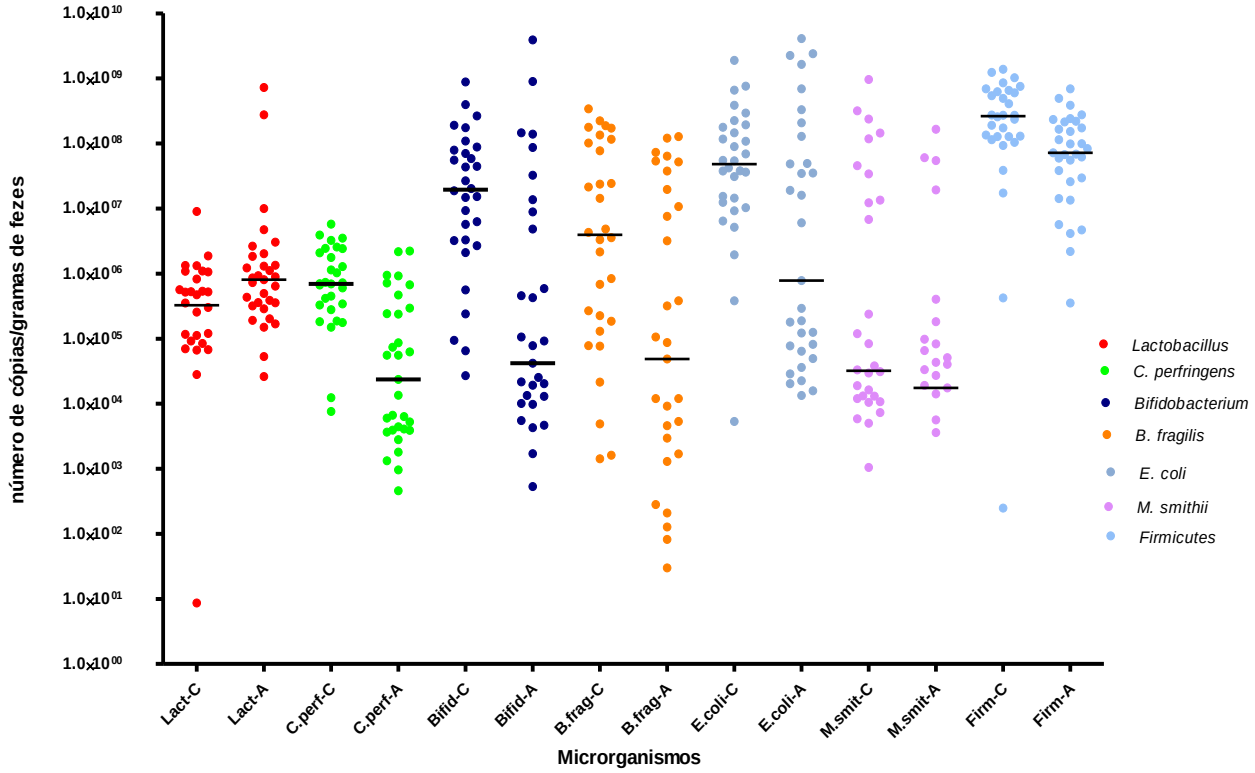
Tabela 4 - Determinação quantitativa dos microrganismos nas amostras fecais das crianças do grupo controle e antibióticos.

Microrganismos	Número de amostras positivas Mediana $\log_{10}$ número de cópias (desvio interquartílico)		Valor de *p*
	Controle (n=30)	Antibióticos (n=31)	
***Bifidobacterium* spp.**	**30 (7,29 [7,89])**	**29 (4,62 [6,83])**	**0,0002***
***Lactobacillus* spp.**	**27 (5,52[5,84])**	**31 (5,91[6,14])**	**0,0092***
B. fragilis	**30 (6,60 [8,02])**	**29 (4,69 [7,24])**	**0,0055***
B. vulgatus	30 (7,12 [7,99])	31 (4,29 [7,55])	0,0901
P. distasonis	29 (3,82 [6,06])	30 (4,12 [5,44])	1
P. merdae	29 (7,27 [7,94])	31 (4,58 [7,87])	0,17
C. difficile	29 (3,00 [3,96])	26 (1,67 [3,30])	0,07
C. perfringens	**29 (5,84 [6,28])**	**31 (4,37 [5,44])**	**<0,0001***
E. coli	**30 (7,68 [8,19])**	**31 (5,89 [8,04])**	**0,0268***
M. smithii	**28 (4,51 [7,12])**	**19 (4,29 [4,79])**	**0,0444***
Bacteroidetes	30 (8,93 [9,21])	31 (8,90 [9,20])	0,3634
Firmicutes	**30 (8,42 [8,69])**	**31 (7,86 [8,25])**	**0,0009***

* Nível de significância do teste de Mann-Whitney (p< 0,05).

As amostras das crianças do grupo controle quando comparadas com o grupo tratado com antibióticos apresentaram diferenças estatísticas significantes para: *Bifidobacterium* spp. (p = 0,0002), *B. fragilis* (p = 0,0055), *C. perfringens* (p = <0,0001), *E. coli* (p = 0,0268), *Lactobacillus* spp. (p = 0,0092), *M. smithii* (p = 0,0444) e *Firmicutes* (p = 0,0009). A dispersão desses microrganismos entre os grupos estudados é observada na Figura 18.

Figura 18 - Dispersão dos microrganismos com significância estatística.



C: grupo controle; A: grupo antibióticos.

Teste Mann-Whitney (*p* <0,05).

De todos os microrganismos avaliados apenas *Lactobacillus* spp. e *P. distasonis* apresentaram maior quantificação no grupo com antibióticos quando comparados com grupo controle, o que sugere que provavelmente os antibióticos utilizados nesse grupo não tenham exercido efeito sobre esses microrganismos se observarmos as quantificações com os outros microrganismos avaliados (Tabela 4).

A correlação entre a quantificação dos microrganismos de cada grupo foi avaliada através do teste de Spearman. A correlação quando presente foi caracterizada variando de fraca a forte (Tabelas 5 e 6). Correlação fraca e moderada foi verificada no grupo controle em diversos microrganismos, exceto em *Bacteroidetes, C. perfringens*, *M. smithii* e *P. merdae*. No grupo antibióticos apenas *E. coli* e *Lactobacillus* spp. não tiveram correlações com os outros microrganismos. Ainda nesse grupo foi observada diversas correlações fortes, sendo *B. fragilis*, *M. smithii* e *P. distasonis* os microrganismos com maiores números de correlações.

Tabela 5 - Correlação de Spearman (rS) e nível de significância (valor de *p*) entre os microrganismos do grupo controle.

Controle	***Bifidobacterium* spp.**	***Lactobacillus* spp.**	***B. fragilis***	***B. vulgatus***	***P. distasonis***	***P. merdae***	***C. perfringens***	***C. difficile***	***E. coli***	***M. smithii***	***Bacteroidetes***	***Firmicutes***
Bifidobacterium spp.		0,164 *p*=0,386	0,122 *p*=0,518	**0,414** ***p*=0,022**	0,191 *p*=0,310	0,170 *p*=0,367	0,243 *p*=0,194	0,277 *p*=0,137	-0,069 *p*=0,716	0,072 *p*=0,703	0,151 *p*=0,425	-0,066 *p*=0,726
Lactobacillus spp.	0,164 *p*=0,386		0,123 *p*=0,513	0,137 *p*=0,469	0,192 *p*=0,309	-0,165 *p*=0,382	0,011 *p*=0,952	0,309 *p*=0,096	0,134 *p*= 0,478	0,055 *p*=0,772	0,351 *p*=0,056	0,267 *p*=0,152
B. fragilis	0,122 *p*=0,518	0,123 *p*=0,513		0,086 *p*=0,649	0,256 *p*=0,170	0,334 *p*=0,070	0,129 *p*=0,496	0,164 *p*=0,384	**0,457** ***p*=0,011**	-0,165 *p*=0,382	-0,050 *p*=0,790	0,003 *p*=0,984
B. vulgatus	**0,414** ***p*=0,022**	0,137 *p*=0,469	0,086 *p*=0,649		0,295 *p*=0,112	0,182 *p*=0,335	-0,033 *p*=0,861	0,038 *p*=0,838	**0,378** ***p*=0,038**	-0,014 *p*=0,937	-0,010 *p*=0,958	-0,193 *p*=0,306
P. distasonis	0,191 *p*=0,310	-0,165 *p*=0,382	0,256 *p*=0,170	0,295 *p*=0,112		0,462 *p*=0,009	-0,099 *p*=0,601	-0,084 *p*=0,656	**0,400** ***p*=0,028**	0,290 *p*=0,119	0,125 *p*=0,509	0,229 *p*=0,221
P. merdae	0,170 *p*=0,367	0,192 *p*=0,309	0,334 *p*=0,070	0,182 *p*=0,335	**0,462** ***p*=0,009**		-0,028 *p*=0,880	-0,053 *p*=0,780	0,211 *p*=0,261	-0,146 *p*=0,440	-0,058 *p*=0,756	-0,007 *p*=0,969
C. perfringens	0,243 *p*=0,194	0,309 *p*=0,964	0,129 *p*=0,496	-0,033 *p*=0,861	-0,099 *p*=0,601	-0,028 *p*=0,880		0,195 *p*=0,300	-0,134 *p*=0,478	-0,012 *p*=0,948	-0,160 *p*=0,397	0,117 *p*=0,537
C. difficile	0,277 *p*=0,137	0,011 *p*=0,952	0,164 *p*=0,384	0,038 *p*=0,838	-0,084 *p*=0,656	-0,053 *p*=0,780	0,195 *p*=0,300		-0,085 *p*=0,652	0,215 *p*=0,252	0,341 *p*=0,064	**0,472** ***p*=0,008**
E. coli	-0,069 *p*=0,716	0,134 *p*=0,478	**0,457** ***p*=0,011**	**0,378** ***p*=0,038**	**0,400** ***p*=0,028**	0,211 *p*=0,261	-0,134 *p*=0,478	-0,085 *p*=0,652		-0,118 *p*=0,534	0,041 *p*=0,827	-0,061 *p*=0,746
M. smithii	0,072 *p*=0,703	0,055 *p*= 0,772	-0,165 *p*=0,382	-0,014 *p*=0,937	0,290 *p*=0,118	0,146 *p*=0,440	-0,012 *p*=0,948	0,215 *p*=0,252	-0,118 *p*=0,534		0,071 *p*=0,706	0,304 *p*=0,101
Bacteroidetes	0,151 *p*=0,425	**0,351** ***p*=0,056**	-0,050 *p*=0,790	-0,010 *p*=0,958	0,125 *p*=0,509	-0,058 *p*=0,756	-0,160 *p*=0,397	0,341 *p*=0,064	0,041 *p*=0,827	0,071 *p*=0,706		0,220 *p*=0,242
Firmicutes	-0,066 *p*=0,726	0,267 *p*=0,152	0,003 *p*=0,984	-0,193 *p*=0,306	0,229 *p*=0,221	-0,007 *p*=0,969	0,117 *p*=0,537	**0,472** ***p* =0,008**	-0,061 *p*=0,746	0,304 *p*=0,101	0,220 *p*=0,242	

Em destaque – correlações significantes; considerar o rS; nula: 0 -0,2; fraca :0,21-0,40; moderada:0,41-0,60; forte: 0,61-0,8; perfeita >0,81. *p* (<0,05

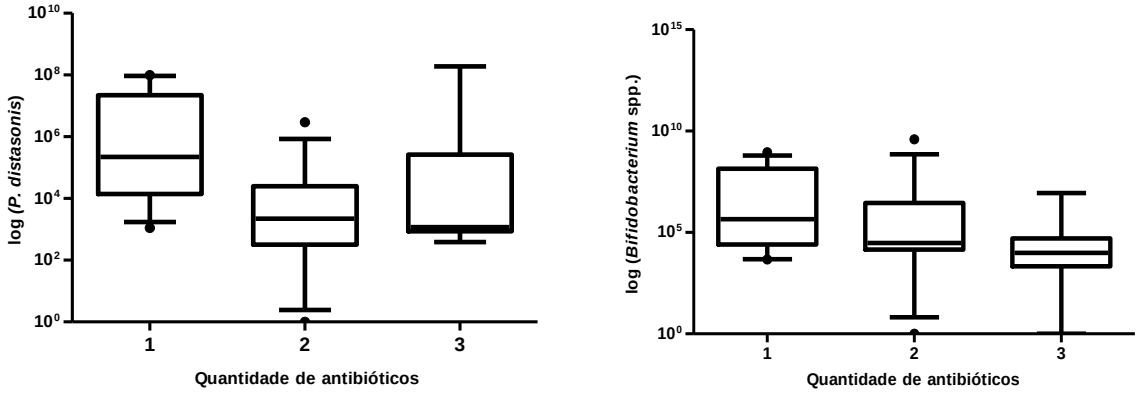
Tabela 6 - Correlação de Spearman (rS) e nível de significância (valor de *p*) entre os microrganismos do grupo antibióticos.

Antibiótico	*Bifidobacterium* spp.	*Lactobacillus* spp.	*B. fragilis*	*B. vulgatus*	*P. distasonis*	*P. merdae*	*C. perfringens*	*C. difficile*	*E. coli*	*M. smithii*	*Bacteroidetes*	*Firmicutes*
Bifidobacterium spp.		0,138 *p*=0,456	**0,420 *p*=0,020**	-0,132 *p*=0,486	0,171 *p*=0,365	0,046 *p*=0,367	0,346 *p*=0,060	0,046 *p*=0,805	0,051 *p*=0,787	**0,371 *p*=0,043**	-0,091 *p*=0,630	**0,364 *p*=0,047**
Lactobacillus spp.	0,138 *p*=0,456		0,391 *p*=0,456	-0,093 *p*=0,615	0,081 *p*=0,664	-0,089 *p*=0,633	0,086 *p*=0,642	0,322 *p*=0,076	-0,104 *p*=0,574	0,314 *p*=0,084	-0,035 *p*=0,849	0,067 *p*=0,717
B. fragilis	**0,420 *p*=0,020**	0,039 *p*=0,029		0,334 *p*=0,070	**0,616 *p*=0,002**	0,185 *p*=0,327	**0,533 *p*=0,002**	0,288 *p*=0,122	-0,136 *p*=0,470	**0,411 *p*=0,023**	0,194 *p*=0,302	0,302 *p*=0,103
B. vulgatus	-0,132 *p*=0,486	-0,093 *p*=0,615	0,334 *p*=0,070		**0,418 *p*=0,021**	0,182 *p*=0,335	**0,458 *p*=0,010**	0,079 *p*=0,675	-0,004 *p*=0,980	0,066 *p*=0,728	0,192 *p*=0,308	0,234 *p*=0,212
P. distasonis	0,171 *p*=0,365	-0,089 *p*=0,633	**0,616 *p*=0,0002**	**0,418 *p*=0,021**		**0,462 *p*=0,009**	**0,470 *p*=0,008**	0,282 *p*=0,130	0,013 *p*=0,945	**0,477 *p*=0,007**	0,372 *p*=0,042	**0,399 *p*=0,028**
P. merdae	0,046 *p*=0,809	0,081 *p*=0,066	0,185 *p* =0,327	0,280 *p*=0,133	**0,478 *p*=0,007**		0,085 *p*=0,651	0,004 *p*=0,980	-0,004 *p*=0,982	**0,544 *p*=0,001**	**0,466 *p*=0,009**	0,207 *p*= 0,272
C. perfringens	0,346 *p*=0,060	0,322 *p*=0,076	**0,533 *p* =0,002**	-0,033 *p*=0,861	**0,470 *p*=0,008**	-0,028 *p*=0,880		**0,493 *p*=0,003**	0,107 *p*=0,572	0,165 *p*=0,382	0,078 *p*=0,680	0,634 *p*=0,001
C. difficile	0,046 *p*=0,805	0,086 *p*=0,642	0,288 *p*=0,122	**0,458 *p*=0,010**	0,282 *p*=0,130	-0,053 *p*=0,780	**0,493 *p*=0,005**		0,112 *p*=0,553	0,126 *p*=0,504	0,300 *p*=0,106	0,268 *p*=0,151
E. coli	0,051 *p*=0,787	-0,104 *p*=0,574	-0,136 *p*=0,470	-0,004 *p*=0,980	0,013 *p*=0,945	0,211 *p*=0,261	0,107 *p*=0,572	0,112 *p*=0,553		-0,343 *p*=0,062	-0,115 *p*=0,543	0,269 *p*=0,149
M. smithii	**0,371 *p*=0,043**	0,314 *p*=0,084	**0,411 *p*=0,023**	0,066 *p*=0,728	**0,477 *p*=0,007**	0,146 *p*=0,440	0,165 *p*=0,382	0,126 *p*=0,504	-0,343 *p*=0,062		**0,407 *p*=0,025**	0,389 *p*=0,316
Bacteroidetes	-0,091 *p*=0,630	-0,035 *p*=0,849	0,194 *p*=0,302	0,192 *p*=0,308	**0,372 *p*=0,042**	-0,058 *p*=0,756	0,078 *p*=0,680	0,300 *p*=0,106	-0,115 *p*=0,543	**0,407 *p*=0,025**		0,084 *p*=0,657
Firmicutes	**0,364 *p*=0,047**	0,067 *p*=0,717	0,302 *p*=0,103	0,234 *p*=0,212	**0,399 *p*=0,028**	-0,007 *p*=0,969	**0,634 *p*=0,001**	0,268 *p*=0,151	0,269 *p*=0,149	0,189 *p*=0,316	0,084 *p*=0,657	

Em destaque – correlações significantes; considerar o rS; nula: 0 -0,2; fraca :0,21-0,40; moderada:0,41-0,60; forte: 0,61-0,8; perfeita >0,81. *p* (<0,05).

Analisando a quantidade de antibióticos utilizados pelas crianças e os valores obtidos no qPCR, observou-se que o número de antibiótico não exerceu grande influência entre as quantificações dos microrganismos; exceto para *Bifidobacterium* spp. e *P. distasonis* que quando comparado nas crianças que tomavam 1 antibiótico com aquelas que tomavam 2 ou 3; a quantidade influenciou nos valores de número de cópias (p <0,05) como mostra a Figura 19.

Figura 19 - Quantidade de antibióticos utilizados e a quantificação de *P. distasonis* e *Bifidobacterium* spp.



Teste Kruskal-Wallis (p <0,05).

Sobre o padrão de microrganismos detectado em cada grupo, verificou-se que os 12 microrganismos estudados foram detectados em 23 (76,6%) crianças do grupo controle e 19 (61,2%) crianças do grupo tratado com antibióticos (Tabela 7 e Apêndice 2). O grupo antibióticos ainda apresentou um padrão para 11 microrganismos em 8 crianças e o grupo controle em 2 crianças, sendo diferenciado dos outros padrões pela ausência de *M. smithii.* Os demais padrões de microrganismos foram bem distintos para cada grupo.

Tabela 7 - Padrão de microrganismos detectados por qPCR nas amostras dos grupos controle e antibióticos.

Padrões de microrganismos por qPCR	Total detectado	Amostras fecais	
		Controle (n=30)	Antibióticos (n=31)
Bif, Lac, Bf, Bv, Pd, Pm, Cd, Cp, Ec, Ms, Bact, Firm	12	23	19
Bif, Lac, Bf, Bv,Pd, Pm, Cd, Cp, Ec, Bact, Firm	11	2	8
Bif, Lac, Bf, Bv, Pm, Cd, Cp, Ec, Ms, Bact, Firm	11	1	-
Bif, Bf, Bv, Pd, Pm, Cd, Ec, Ms, Bact, Firm	10	1	-
Bif, Bf, Bv, Pd, Pm, Cd, Cp, Ec, Ms, Bact, Firm	11	2	-
Bif, Lac, Bf, Bv, Pd,Cd, Cp, Ec, Ms, Bact, Firm	11	1	-
Bif, Lac, Bv, Pd, Pm, Cd, Cp, Ec, Bact, Firm	10	-	1
Bif, Lac, Bf, Bv, Pm, Cd, Cp, Ec, Bact, Firm	10	-	1
Lac, Bf, Bv, Pd, Pm, Cd, Cp, Ec, Bact, Firm	10	-	1
Lac, Bv, Pd, Pm, Cd, Cp, Ec, Bact, Firm	9	-	1

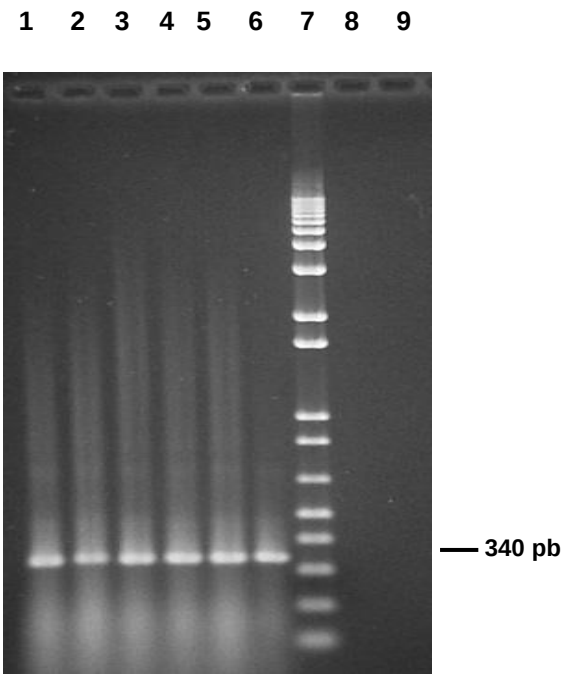
Bif - *Bifidobacterium* spp., Lac - *Lactobacillus* spp., Bf - *B. fragilis*, Bv - *B. vulgatus*, Pd - *P. distasonis*, Pm - *P. merdae*, Cd - *C. difficile*, Cp - *C. perfringens*, Ec - *E. coli*, Ms - *M. smithii*, Bact - *Bacteroidetes*, Firm - *Firmicutes*.

4.2 Isolamento e identificação de *E. coli* comensal e diarreiogênica

Das 61 amostras de fezes coletadas foram identificadas *E. coli* por 16S rRNA (Figura 20) em: 26 crianças (86,7%) do grupo controle e 23 (74,2%) do grupo com antibióticos. Em relação ao número de bactérias isoladas, foi verificado 49 isolados no grupo controle e 47 no grupo com antibióticos.

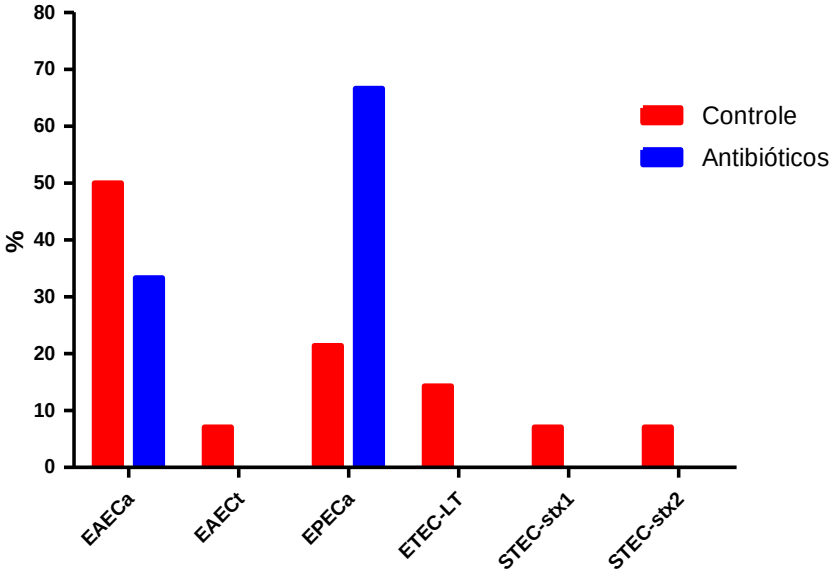
Em relação à presença de DEC nas amostras estudadas foram identificadas no grupo controle 14 (46,7%) crianças portando os seguintes patotipos: 7 (50%) com EAEC atípica e 1 (7,14%) com EAEC típica, 3 (21,4%) com EPEC atípica, 2 (14,3%) com ETEC-LT, 1 (7,14%) com STEC *stx1* e 1 (7,14%) com STEC *stx2*. No grupo com antibióticos detectou-se DEC apenas em 3 (9,7%) crianças sendo: 2 (66,6%) com EPEC atípica e 1 (33,3%) com EAEC atípica (Figura 21).

Figura 20 - Detecção do gene 16S rRNA para identificação de *E. coli.*



Colunas: (1) controle positivo *E. coli* ATCC 25922; (2-6) amostras clínicas positivas; (7) padrão de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen); (8) amostra clínica negativa; (9) controle negativo *B. fragilis* ATCC 25285.

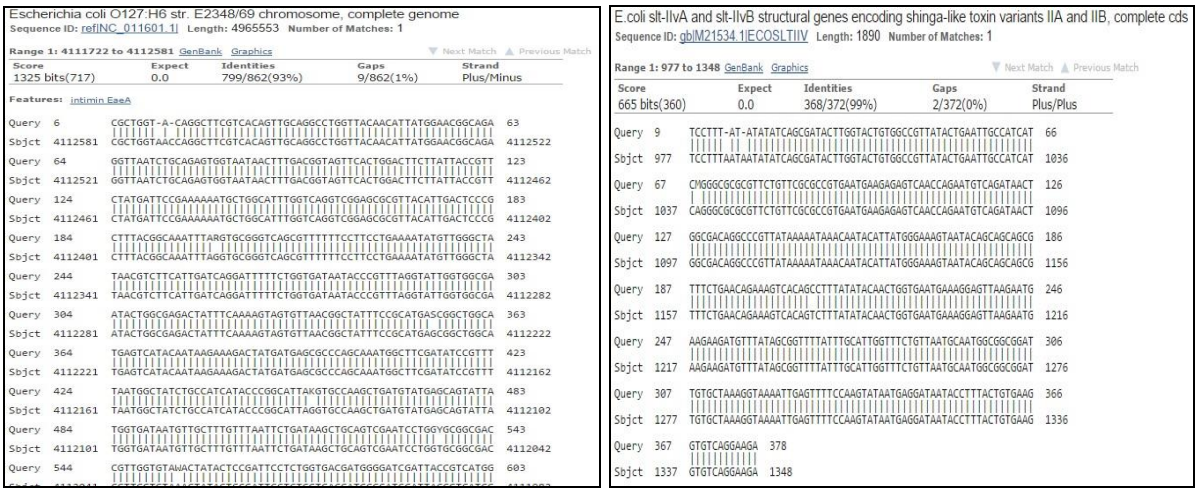
Figura 21 - Frequência das crianças portadoras de DEC entre os grupos controle e antibióticos.



Vale ressaltar que em nossos resultados foi observado uma criança (grupo controle) portadora de dois patotipos sendo: um isolado EPEC atípica e um isolado STEC-*stx2* ambos confirmados por sequenciamento, apresentando 93 e 99% de identidade com as sequências dos genes *eae* e *stx2* depositadas no GenBank (acesso: NC 011601.1 e M21534.1) (Figura 22) (Anexo 1).

Figura 22 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para os genes *eae* e *stx2.*

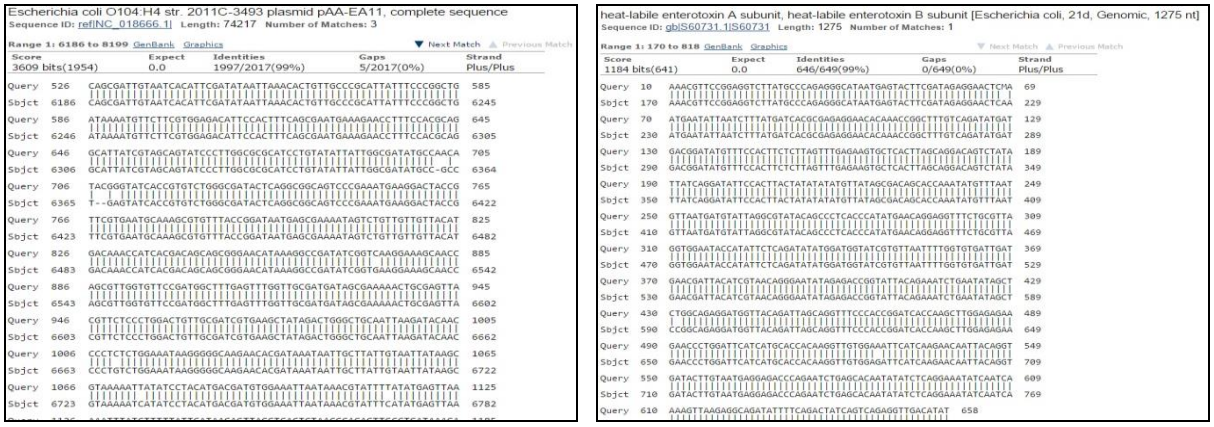
eae ***stx2***



Os outros patotipos encontrados em ambos os grupos (controle e antibióticos) também foram sequenciados apresentando 99-100% de similaridade EAEC (NC_018666.1), ETEC (S6073.1), STEC-stx1 (NC_002695.1) (Figura 23).

Figura 23 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para os genes *aggR, elt, stx1.*

aggR ***elt***



stx1

Escherichia coli O157:H7 str. Sakai chromosome, complete genome
Sequence ID: ref|NC_002695.1| Length: 5498450 Number of Matches: 1

Range 1: 2925507 to 2925716 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
388 bits(210)	2e-105	210/210(100%)	0/210(0%)	Plus/Minus

Features: Shiga toxin I subunit A

```
Query  1        ATGAAAATAATTATTTTTAGAGTGCTAACTTTTTTCTTTGTTATCTTTTCAGTTAATGTG  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2925716  ATGAAAATAATTATTTTTAGAGTGCTAACTTTTTTCTTTGTTATCTTTTCAGTTAATGTG  2925657

Query  61       GTTGCGAAGGAATTTACCTTAGACTTCTCGACTGCAAAGACGTATGTAGATTCGCTGAAT  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2925656  GTTGCGAAGGAATTTACCTTAGACTTCTCGACTGCAAAGACGTATGTAGATTCGCTGAAT  2925597

Query  121      GTCATTCGCTCTGCAATAGGTACTCCATTACAGACTATTTCATCAGGAGGTACGTCTTTA  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2925596  GTCATTCGCTCTGCAATAGGTACTCCATTACAGACTATTTCATCAGGAGGTACGTCTTTA  2925537

Query  181      CTGATGATTGATAGTGGCACAGGGGATAAT  210
                ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2925536  CTGATGATTGATAGTGGCACAGGGGATAAT  2925507
```

A partir da cultura das 61 amostras foram obtidos 96 isolados, sendo 75 de *E. coli* comensal (65,3% no grupo controle e 91% no grupo com antibióticos) e 21 identificadas como DEC (34,6% no grupo controle e 8,5% no grupo antibióticos). Os isolados de DEC de ambos os grupos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Porcentagem de isolados de *E. coli* diarreiogênica entre as crianças do grupo controle e antibióticos.

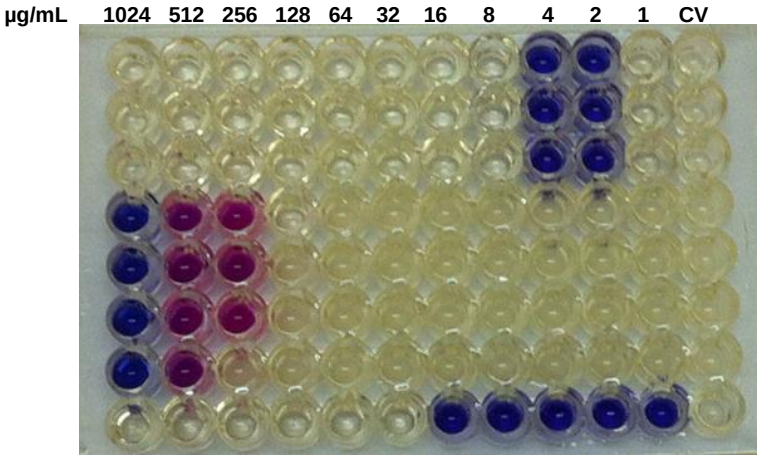
E. coli	**Controle (n=49)**		**Antibióticos (n=47)**	
diarreiogênica	**n**	**(%)**	**n**	**(%)**
EPEC atípica	4	23,6	2	50
EAEC atípica	8	47	2	50
EAEC típica	1	5,9	-	-
ETEC-LT	2	11,8	-	-
STEC-*stx1*	1	5,9	-	-
STEC-*stx2*	1	5,9	-	-
Total	**17**	**34,6**	**4**	**8,5**

EPEC (*E. coli* enteropatogênica), EAEC (*E. coli* enteroagregativa), ETEC-LT (*E. coli* enterotoxigênica), STEC (*E. coli* produtora da toxina de Shiga).

4.3 Determinação da susceptibilidade e padrão dos genes de resistência aos antimicrobianos

A leitura de todos os testes de susceptibilidade (microdiluição) foi realizada utilizando corante revelador resazurina (Figura 24).

Figura 24 - Leitura de placa de microdiluição com resazurina.



Concentração das drogas variando de 1-1024 µg/mL (grupo antibiótico); CV: controle de viabilidade dos isolados.
Azul: sem alteração da cor (sem crescimento); rosa: com alteração da cor (presença de microrganismos).

Os valores de CIM para os 11 antimicrobianos testados, frente aos 96 isolados de *E. coli* das crianças com e sem tratamento com antibióticos, estão dispostos na Tabela 9.

No grupo controle a resistência foi verificada para as drogas: nitrofurantoína (92%), ampicilina (77,6%), cloranfenicol (45%), tetraciclina (30,6%), cefoxitina (18,4%) e levofloxacina (12,2%), canamicina (8%) e ceftriaxona (2%). Ainda nesse grupo foi verificada sensibilidade para: ciprofloxacina, meropenem e tigeciclina.

Foi observado no grupo com antibióticos resistência para todas às drogas testadas e elevada faixa de CIM e porcentagem de resistência variando de 15 a 100% em comparação com o grupo controle. Isso também pode ser evidenciado com as drogas: ceftriaxona e canamicina que apresentaram 66% e 77,7% de resistência para o grupo com antibióticos em relação a 2% e 8% do grupo controle.

Tabela 9 - Valores de CIM e porcentagem de resistência de *E. coli* isoladas de crianças com e sem tratamento com antibióticos.

Antimicrobianos	Ponto crítico*	CIM (μg/mL)			Resistência (%)
		Faixa	50%	90%	
Grupo Controle (49)					
Ampicilina	8	4->256	32	>256	77,6
Canamicina	16	2->256	8	16	8
Cefoxitina	8	2-256	8	32	18,4
Ceftriaxona	1	<0,25-4	<0,25	<0,25	2
Ciprofloxacina	1	<0,25-1	<0,25	<0,25	-
Cloranfenicol	8	4-128	8	32	45
Levofloxacina	2	<0,25-256	<0,25	4	12,2
Meropenem	1	<0,25-0,5	<0,25	<0,25	-
Nitrofurantoína	32	0,5->256	256	>256	92
Tetraciclina	4	0,5->256	2	128	30,6
Tigeciclina**	8	<0,25-4	2	4	-
Grupo Antibióticos (47)					
Ampicilina	8	4->1024	>1024	>1024	91,5
Canamicina	16	4->1024	>1024	>1024	77,7
Cefoxitina	8	2->1024	16	512	55,3
Ceftriaxona	1	<1->1024	8	>1024	66
Ciprofloxacina	1	<1- 1024	8	>1024	57,4
Cloranfenicol	8	1->1024	32	1024	83
Levofloxacina	2	<1-128	<1	64	40,4
Meropenem	1	<1->1024	2	1024	68
Nitrofurantoína	32	512->1024	>1024	>1024	100
Tetraciclina	4	<1-512	64	256	79
Tigeciclina**	8	<1- 128	4	32	25,5

*Ponto crítico expresso em μg/mL (CLSI, 2013),

**FDA - Tigeciclina: sensível ≤2 e resistente ≥8.

-: ausência de resistência.

Todos os isolados de *E. coli* diarreiogênica em ambos os grupos apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico, sendo ampicilina, cloranfenicol e nitrofurantoína os mais frequentes.

Quando observa-se o padrão de resistência dos isolados nota-se que o grupo controle foi o que mais compartilhou perfis de resistência semelhantes, entre isolados de *E. coli* comensal e de DEC (Tabela 10). Apenas três perfis de resistência foram comuns em ambos os grupos, sendo encontrado em *E. coli* comensal resistência para nitrofurantoína e tetraciclina, o outro perfil entre uma *E. coli* comensal e uma ETEC com padrão de resistência para: ampicilina, canamicina,

cloranfenicol, nitrofurantoína e tetraciclina e o terceiro *E. coli* comensal, EPECa e EAECa com resistência para ampicilina, cloranfenicol, nitrofurantoína e tetraciclina.

Tabela 10 - Padrões de resistência das 11 drogas testadas em relação aos 96 isolados deste estudo.

E. coli	**Número de isolados**		**Padrão de resistência**
	Controle	**Antibióticos**	
Comensal	0	7	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Mer,Nit,Tet,Tig
Comensal	0	1	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Mer,Nit,Tet,Tig
Comensal	0	2	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Mer,Nit,Tet
Comensal	0	1	Amp,Can,Cip,Clo,Fox,Lev,Nit,Tet,Tig
Comensal	0	3	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Mer,Nit,Tet
Comensal	0	2	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Mer,Nit
Comensal	0	5	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Nit,Tet
Comensal	0	2	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Lev,Nit,Mer
Comensal	0	1	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Nit,Mer,Tet
Comensal	0	1	Amp,Can,Cip,Cro,Lev,Mer,Tet
Comensal	0	1	Amp,Can,Cip,Mer,Nit,Tet
Comensal	0	1	Amp,Can,Cro,Fox,Mer,Nit
Comensal	0	1	Amp,Can,Clo,Cro,Mer,Nit
Comensal	0	1	Amp,Can,Cip,Clo,Nit,Tet
Comensal	0	2	Amp,Can,Fox,Mer,Nit,Tet
Comensal	0	1	Amp,Clo,Cro,Fox,Nit,Tet
Comensal	0	1	Amp,Clo,Fox,Mer,Nit,Tet
Comensal	0	1	Amp,Can,Clo,Mer,Nit,Tet
Comensal	0	1	Amp,Clo,Cro,Mer,Nit,Tet
Comensal	1	0	Amp,Can,Clo,Fox,Nit,Tet
EAECa	1	0	Amp,Clo,Fox,Lev,Nit,Tet
Comensal	0	1	Amp,Can,Mer,Nit,Tet
Comensal, ETEC	**1**	**1**	**Amp,Can,Clo,Nit,Tet**
Comensal, EAECa	0	2	Amp,Clo,Mer,Nit,Tet
Comensal	1	0	Amp,Clo,Fox,Lev,Nit
Comensal	2	0	Amp,Clo,Fox,Nit,Tet
Comensal, EAECa, STEC-*stx2*	4	0	Amp,Clo,Lev,Nit,Tet
Comensal	1	0	Amp,Clo,Cro,Fox,Nit
Comensal	1	0	Amp,Can,Clo,Fox,Nit
Comensal	2	0	Amp,Clo,Fox,Nit
Comensal, EPECa, EAECa	**2**	**2**	**Amp,Clo,Nit,Tet**
Comensal	0	1	Amp,Can,Clo,Tet
Comensal	0	1	Amp,Can,Mer,Nit
Comensal	2	0	Amp,Clo,Nit
Comensal, EPECa, EAECa, STEC-*stx1*	7	0	Amp,Nit,Tet
Comensal	0	1	Clo,Cro,Nit
EPECa	0	1	Clo,Mer,Nit
Comensal	1	0	Amp,Can,Nit
Comensal, EPECa EAECa	9	0	Amp,Nit
Comensal	**1**	**1**	**Nit,Tet**
Comensal	0	1	Mer,Nit
Comensal	3	0	Amp
Comensal, EAECa, EPECa, EAECt, ETEC	9	0	Nit
Total	**49**	**47**	

EAECa (*E. coli* enteroagregativa atípica); EAECt (*E. coli* enteroagregativa típica); EPECa (*E. coli* enteropatogênica atípica); STEC-stx1 e stx2 (*E. coli* produtora de toxina de Shiga 1 e 2), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica).

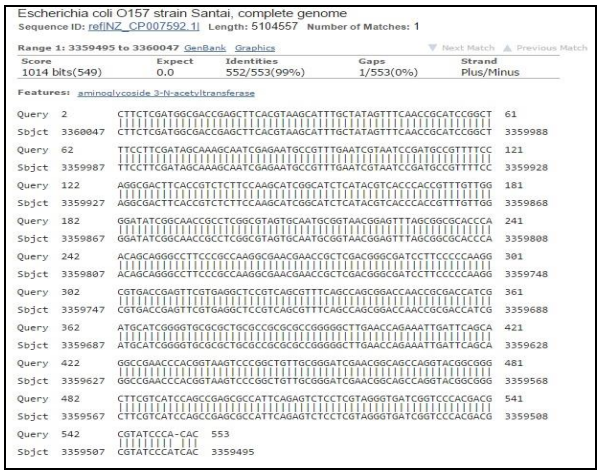
Amp-ampicilina, Can- canamicina, Clo- cloranfenicol, Cip- Ciprofloxacina, Cro- ceftriaxona,Fox- cefoxitina, Lev- levofloxacina, Mer-meropenem, Nit-nitrofurantoína, Tet-tetraciclina, Tig-Tigeciclina.

Em uma análise geral sobre a detecção dos genes de resistência foi verificado que todos os 96 isolados apresentaram pelo menos um dos genes estudados.

O DNA de isolados de cada grupo foram sequenciados para a verificação da similaridade genética e comparados com as sequências depositadas do GenBank,sendo que para *aac* obteve-se 99% de similaridade (NZ_CP007592.1), *ant* 97% (NZ_CP007592.1), $bla_{CTX\text{-}M}$ 96% (NZ_CP009859.1), bla_{TEM} 99% (NC_011740.1), bla_{KPC} 99% (NZ_CP009771.1), *ampC* 94% (NZ_CP007391.1), $bla_{IMP\text{-}1}$ 94% (AP014651.1), *cmlA* 98% (NC_010410.1), *cat* 99% (NZ_CP010315.1), *flor* 99% (NZ_CP007581.1), *nfsA* 97% (NZ_CP009072.1), *nfsB* 95% (NZ_CP009644.1), *qnrB* 92% (NZ_CP010376.1), *tetA* 98% (NC_017626.1), *tetB* 100% (NC_011748.1), *tetC* 97% (NC_017626.1).

Figura 25 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para os genes de aminoglicosídeos.

aac



ant

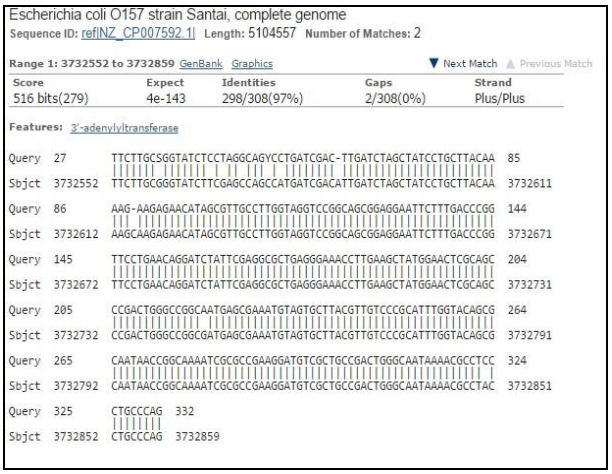


Figura 26 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para os genes de β-lactâmicos.

bla$_{CTX-M}$

Escherichia coli strain ECONIH1, complete genome
Sequence ID: ref|NZ_CP009859.1| Length: 5310511 Number of Matches: 1

Range 1: 555000 to 555186 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
300 bits(162)	2e-78	179/187(96%)	5/187(2%)	Plus/Plus

Features: beta-lactamase

```
Query  4       CGCGCT-MAGTA-AGCGAT-ACGTGGCGATG-ATAAGCTGATWGCTCACGTTGGCGGCCC  59
               ||||||  |||| |||||| |||||||||| |||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  555000  CGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCC  555059

Query  60      GGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTAC  119
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  555060  GGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTAC  555119

Query  120     CGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGC  179
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  555120  CGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGC  555179

Query  180     CA-GGCG  185
                | ||||
Sbjct  555180  AATGGCG  555186
```

bla$_{TEM}$

Escherichia fergusonii ATCC 35469 chromosome, complete genome
Sequence ID: ref|NC_011740.1| Length: 4588711 Number of Matches: 1

Range 1: 1690689 to 1691116 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
780 bits(422)	0.0	426/428(99%)	1/428(0%)	Plus/Minus

Features: Beta-lactamase TEM

```
Query  6       CTAGAGT-AGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCA  64
               ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1691116 CTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCA  1691057

Query  65      TCSTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAA  124
               || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1691056 TCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAA  1690997

Query  125     GGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGA  184
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1690996 GGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGA  1690937

Query  185     TCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCAGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATA  244
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1690936 TCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCAGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATA  1690877

Query  245     ATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCA  304
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1690876 ATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCA  1690817

Query  305     AGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGG  364
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1690816 AGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGG  1690757

Query  365     ATAATACCGCACCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGG  424
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1690756 ATAATACCGCACCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGG  1690697

Query  425     GGCGAAAA  432
               ||||||||
Sbjct  1690696 GGCGAAAA  1690689
```

bla$_{KPC}$

Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain KPNIH33, complete genome
Sequence ID: ref|NZ_CP009771.1| Length: 5574202 Number of Matches: 4

Range 1: 1441825 to 1442417 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1085 bits(587)	0.0	591/593(99%)	1/593(0%)	Plus/Plus

Features: beta-lactamase

```
Query  3       CGCTGCGGCGCAGCCAGTGCAGAGCCCAGTGTCAGTTTTTGTAAGCTTTCCGTCACGGCG  62
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1441825 CGCTGCGGCGCAGCCAGTGCAGAGCCCAGTGTCAGTTTTTGTAAGCTTTCCGTCACGGCG  1441884

Query  63      CGCGSCGATGAGGTATCGCGCGCATCGCCTGGGATGGCGGAGTTCAGCTCCAGCTCCCAG  122
               |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1441885 CGCGGCGATGAGGTATCGCGCGCATCGCCTGGGATGGCGGAGTTCAGCTCCAGCTCCCAG  1441944

Query  123     CGGTCCAGACGGAACGTGGTATCGCCGATAGAGCGCATGAAGGCCGTCAGCCCGGCCGGG  182
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1441945 CGGTCCAGACGGAACGTGGTATCGCCGATAGAGCGCATGAAGGCCGTCAGCCCGGCCGGG  1442004

Query  183     CCGCCCAACTCCTTCAGCAACAAATTGGCGGCGGCGTTATCACTGTATTGCACGGCGGCC  242
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1442005 CCGCCCAACTCCTTCAGCAACAAATTGGCGGCGGCGTTATCACTGTATTGCACGGCGGCC  1442064

Query  243     GCGGACAGCTCCGCCAACCGTCATGCCTGTTGTCAGATATTTTTCCGAGATGGGTGACCAC  302
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1442065 GCGGACAGCTCCGCCAACCGTCATGCCTGTTGTCAGATATTTTTCCGAGATGGGTGACCAC  1442124

Query  303     GGAACCAGCGCATTTTTGCCGTAACGGATGGGTGTGTCCAGCAAGCCGGCCTGCTGCTGG  362
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1442125 GGAACCAGCGCATTTTTGCCGTAACGGATGGGTGTGTCCAGCAAGCCGGCCTGCTGCTGG  1442184

Query  363     CTGCGAGCCAGCACAGCGGCAGCAAGAAAGCCCTTGAATGAGCTGCACAGTGGGAAGCGC  422
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1442185 CTGCGAGCCAGCACAGCGGCAGCAAGAAAGCCCTTGAATGAGCTGCACAGTGGGAAGCGC  1442244

Query  423     TCCTCAGCGCGGTAACTTACAGTTGCGCCTGAGCCGGTATCCATCGCGTACACACCGATG  482
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1442245 TCCTCAGCGCGGTAACTTACAGTTGCGCCTGAGCCGGTATCCATCGCGTACACACCGATG  1442304

Query  483     GAGCCGCCAAAGTCCTGTTCGAGTTTAGCGAATGGTTCCGCGACGAGGTTGGTCAGCGCG  542
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1442305 GAGCCGCCAAAGTCCTGTTCGAGTTTAGCGAATGGTTCCGCGACGAGGTTGGTCAGCGCG  1442364

Query  543     GTGGCAGAAAAGCCAGCCAGCGGCCATGAGAGACAAGACAGCAGA-CTAGACG  594
               |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

ampC

Escherichia coli strain ST540, complete genome
Sequence ID: ref|NZ_CP007391.1| Length: 4875682 Number of Matches: 1

Range 1: 4113925 to 4114032 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
178 bits(96)	1e-41	102/108(94%)	0/108(0%)	Plus/Minus

Features: ampC

```
Query  29      TATGGCGACWGCSTTCMCTGACACGAAACCGGCACCGACGGSAACAAGCGYTCTGCTGCAT  88
               ||||||||  || ||| |||||||||||||||||||||||| |||||||| |||||||||
Sbjct  4114032 TATGGCGACTGCGTTCCCTGACACGAAACCGGCACCGACGGGAACAAGCGCTCTGCTGCAT  4113973

Query  89      CACCGGGAAGGGGAAGGAGGCAGACCTCGCCCTGKGTTTCAATCAGCA  136
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||
Sbjct  4113972 CACCGGGAAGGGGAAGGAGGCAGACCTCGCCCTGTGTTTCAATCAGCA  4113925
```

bla$_{IMP-1}$

Pseudomonas aeruginosa DNA, complete genome, strain: NCGM257
Sequence ID: dbj|AP014651.1| Length: 7090694 Number of Matches: 1

Range 1: 5292271 to 5292999 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1129 bits(611)	0.0	686/730(94%)	12/730(1%)	Plus/Minus

Features: IMP-1 metallo-beta-lactamase

```
Query  15      TTTTRCTTTCGTKTA-CSCTTT-ASCGCCTGMGTCTAATGTAAGTTTCAAGAGTGATGCG  72
               |||| ||||||| || | |||| | ||||||  |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  5292999 TTTTACTTTCGTTTAACCCTTTAACCGCCTG-CTCTAATGTAAGTTTCAAGAGTGATGCG  5292941

Query  73      TCTCCAAGTTGACTGTGACTTGGAACAACCRGTTTTGGCTGACCATGTTTGGACTGTAAT  132
               ||||||| || ||||||||||||||||||||| |||||| || ||||| |||||||| ||||
Sbjct  5292940 TCTCCAACTTCACTGTGACTTGGAACAACCAGTTTTGCCTTACCATATTTGGACTTTAAT  5292881

Query  133     AATTTGGCGGACTTTGGYCAAGCTTCTATATTTGCGGCACCCAAATTGCCTAAACCGWAC  192
               |||||||||||||||| ||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  5292880 AATTTGGCGGACTTTGGCCAAGCTTCTATATTTGCGTCACCCAAATTGCCTAAACCGTAC  5292821

Query  193     GGYTTAATAAAACAACCACCGAATAATATTTTCCTTTCAGGSAACCAARCCACTACGTTA  252
               || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||| ||||||||||
Sbjct  5292820 GGTTTAATAAAACAACCACCGAATAATATTTTCCTTTCAGGCAACCAAACCACTACGTTA  5292761

Query  253     TCGGGAGTGTGTCCCGGGCCTGGATAAAAAACTTCAATTTTATTTTTAAGTGGCCAATAK  312
               || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| | |||||||
Sbjct  5292760 TCTGGAGTGTGTCCCGGGCCTGGATAAAAAACTTCAATTTTATTTTTAACTAGCCAATAG  5292701

Query  313     TTAACTCCGCTAAATGAATTTGTGGCTTGAACCTTACCGTCTTTTTTAAGCAGTTCATTT  372
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  5292700 TTAACTCCGCTAAATGAATTTGTGGCTTGAACCTTACCGTCTTTTTTAAGCAGTTCATTT  5292641

Query  373     GKTAATTCAGATGCATACGTGGGGAGAGATCGAGAATTGRGCCRCTCTATTCCGCCCGTG  432
               | |||||||||||||||||||||| ||||||||||||  ||| |||||||||||||||||
Sbjct  5292640 GTTAATTCAGATGCATACGTGGGGATAGATCGAGAATTAAGCCACTCTATTCCGCCCGTG  5292581

Query  433     CTGTCGCTATGAAAATGAGAGGAAATGCTGCCTTTTATTTTATAGCCRCGCTCCACAAAC  492
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct  5292580 CTGTCGCTATGAAAATGAGAGGAAATGCTGCCTTTTATTTTATAGCCACGCTCCACAAAC  5292521

Query  493     CAAGTGACTAACTTTTCAGTATCTTTAGCCGTAAATGGAGTGTCAATTAGGTRAGCCTCA  552
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct  5292520 CAAGTGACTAACTTTTCAGTATCTTTAGCCGTAAATGGAGTGTCAATTAGGTAAGCCTCA  5292461

Query  553     GCATTTACAAGAACCACCAAASCATGTTTAGGAACAACGCCCCACCCGTTAACTKCTTCA  612
```

Figura 27 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para os genes de cloranfenicol.

cmlA

Acinetobacter baumannii str. AYE, complete genome
Sequence ID: refINC_010410.1| Length: 3936291 Number of Matches: 1

Range 1: 3658332 to 3658747 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
726 bits(393)	0.0	409/417(98%)	3/417(0%)	Plus/Minus

Features: MFS transporter

```
Query  7        CGGCGGTAGG--CATTGCTCGGAGCGCTCGTCGACATGTGGCTTGGGTGGCGGGCTATCT  64
Sbjct  3658747  CGGCGGTAGGCCCATTGCTCGGAGCGCTCGTCGACATGTGGCTTGGGTGGCGGGCTATCT  3658688

Query  65       TTGCGTTTCTAGGTTTGGGCATGATCGCTGCATCTGCAGCAGCGTGGCGATTCTGGCCTG  124
Sbjct  3658687  TTGCGTTTCTAGGTTTGGGCATGATCGCTGCATCTGCAGCAGCGTGGCGATTCTGGCCTG  3658628

Query  125      AAACCCGGGTGCAACGAGTTGCGGGCTTGCAATGGTCGCAGCTGCTACTCCCCGTTAAGT  184
Sbjct  3658627  AAACCCGGGTGCAACGAGTTGCGGGCTTGCAATGGTCGCAGCTGCTACTCCCCGTTAAGT  3658568

Query  185      GCCTGAACTTCTGGTTGTACACGTTGTGTTACGCCGCTGGAATGGGTAGCTTCTTCGTCT  244
Sbjct  3658567  GCCTGAACTTCTGGTTGTACACGTTGTGTTACGCCGCTGGAATGGGTAGCTTCTTCGTCT  3658508

Query  245      TTTTCTCCATTGCGCCCGGACTAATGATGGGCAGGCAAGGTGTGTCTCAGCTTGGCTTCA  304
Sbjct  3658507  TTTTCTCCATTGCGCCCGGACTAATGATGGGCAGGCAAGGTGTGTCTCAGCTTGGCTTCA  3658448

Query  305      GCCTGCTGTTCGCCACAGTGGCAATTGCCATGGTGTTTACAGCTCGTTTTATGGGGCGTG  364
Sbjct  3658447  GCCTGCTGTTCGCCACAGTGGCAATTGCCATGGTGTTTACGGCTCGTTTTATGGGGCGTG  3658388

Query  365      TAATACCCAAGTGGGGCAGCCCAAGCGTCTTGCGAATGGGAATGGRATKSCCTGATA  421
Sbjct  3658387  TGATACCCAAGTGGGGCAGCCCAAGTGTCTTGCGAATGGGAATGGGATG-CCTGATA  3658332
```

cat

Escherichia coli strain 789, complete genome
Sequence ID: refINZ_CP010315.1| Length: 5017219 Number of Matches: 1

Range 1: 701 to 1244 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
977 bits(529)	0.0	539/544(99%)	0/544(0%)	Plus/Plus

```
Query  1     GATTTGCCGTGGCGAGAAAATGTCGATCGCCATTATGGCCGGCGTGTTAGAAGCGCGTGG  60
Sbjct  701   GATTTGCCGTGGCGAGAAAATGTCGATCGCCATTATGGCCGGCGTGTTAGAAGCGCGTGG  760

Query  61    TCACAACGTTACCGTTATCGATCCGGTCGAAAAACTACTGGCAGTGGGGCATTACCTCGA  120
Sbjct  761   TCACAACGTTACCGTTATCGATCCGGTCGAAAAACTACTGGCAGTGGGGCATTACCTCGA  820

Query  121   ATCTACCGTCGATATTGCTGAGTCCACCCGCCGTATTGCGGCAAGTCGTATTCCGGCTGA  180
Sbjct  821   ATCTACCGTCGATATTGCTGAGTCCACCCGCCGTATTGCGGCAAGTCGTATTCCGGCTGA  880

Query  181   TCACATGGTGCTGATGGCAGGTTTCACCGCCGGTAATGAAAAAGGCGAACTGGTGGTGCT  240
Sbjct  881   TCACATGGTGCTGATGGCAGGCTTCACCGCCGGTAATGAAAAAGGCGAACTGGTGGTACT  940

Query  241   TGGACGTAACGGTTCCGACTACTCCGCTGCGGTGCTGGCTGCCTGTTTACGCGCCGATTG  300
Sbjct  941   TGGACGCAACGGTTCCGACTACTCCGCGGCGGTGCTGGCTGCCTGTTTACGCGCCGATTG  1000

Query  301   TTGCGAGATTTGGACGGACGTTGACGGGGTTTATACCTGCGACCCGCGTCAGGTGCCCGA  360
Sbjct  1001  TTGCGAGATTTGGACGGACGTTGACGGGGTTTATACCTGCGACCCGCGTCAGGTGCCCGA  1060

Query  361   TGCGAGGTTGTTGAAGTCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAGCTTTCCTACTTCGGCGC  420
Sbjct  1061  TGCGAGGTTGTTGAAGTCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAGCTTTCCTACTTCGGCGC  1120

Query  421   TAAAGTTCTTCACCCCCGCACCATTACCCCCATCGCCCAGTTCCAGATCCCTTGCCTGAT  480
Sbjct  1121  TAAAGTTCTTCACCCCCGCACCATTACCCCCATCGCCCAGTTCCAGATCCCTTGCCTGAT  1180

Query  481   TAAAAATACCGGAAATCCTCAAGCACCAGGTACGCTCATTGGTGCCAGCCGTGATGAAGA  540
Sbjct  1181  TAAAAATACCGGAAATCCTCAAGCACCAGGTACGCTCATTGGTGCCAGCCGTGATGAAGA  1240

Query  541   CGAA  544
Sbjct  1241  CGAA  1244
```

floR

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain 138736, complete genome
Sequence ID: refINZ_CP007581.1| Length: 4933618 Number of Matches: 1

Range 1: 4114066 to 4114589 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
931 bits(504)	0.0	518/524(99%)	4/524(0%)	Plus/Plus

Features: floR

```
Query  3        CTTC-ACTGCA-CGG-CTTTGTCGCTTTCCGTCTACTTCAAGCAGTGGGCGCGTCGGCCA  59
Sbjct  4114066  CTTCAACTGCACCGGCCTTTGTCGCTTTCCGTCTACTTCAAGCAGTGGGCGCGTCGGCCA  4114125

Query  60       TGCTGGTGGCGACGTTCGCGACGGTTCGCGACGTTTATGCCAACCGTCCTGAGGGTGTCG  119
Sbjct  4114126  TGCTGGTGGCGACGTTCGCGACGGTTCGCGACGTTTATGCCAACCGTCCTGAGGGTGTCG  4114185

Query  120      TCATCTACGGCCTTTTCAGTTCGATGCTGGCGTTCGTGCCTGCGCTCGGCCCTATCGCCG  179
Sbjct  4114186  TCATCTACGGCCTTTTCAGTTCGATGCTGGCGTTCGTGCCTGCGCTCGGCCCTATCGCCG  4114245

Query  180      GAACATTGATCGGCGAGTTCTTGGGATGGCAGGCGATATTCATTACTTTGGCTATACTGG  239
Sbjct  4114246  GAGCATTGATCGGCGAGTTCTTGGGATGGCAGGCGATATTCATTACTTTGGCTATACTGG  4114305

Query  240      CGATGCTCGCACTCCTAAATGCGGGTTTCAGGTGGCACGAAACCCGCCCTCTGGATCAAG  299
Sbjct  4114306  CGATGCTCGCACTCCTAAATGCGGGTTTCAGGTGGCACGAAACCCGCCCTCTGGATCAAG  4114365

Query  300      TCAAGACGCGCCGATCTGTCTTGCCGATCTTCGCGAGTCCGGCTTTTTGGGTTTACACTG  359
Sbjct  4114366  TCAAGACGCGCCGATCTGTCTTGCCGATCTTCGCGAGTCCGGCTTTTTGGGTTTACACTG  4114425

Query  360      TCGGCTTTAGCGCCGGTATGGGCACCTACTTCGTCTTCTTCTCGACGGCTCCCCGTGTGC  419
Sbjct  4114426  TCGGCTTTAGCGCCGGTATGGGCACCTTCTTCGTCTTCTTCTCGACGGCTCCCCGTGTGC  4114485

Query  420      TCATAGGCCAAGCGGAATATTCCGAGATCGGATTCAGCTTTGCCTTCGCCACTGTCGCGC  479
Sbjct  4114486  TCATAGGCCAAGCGGAATATTCCGAGATCGGATTCAGCTTTGCCTTCGCCACTGTCGCGC  4114545

Query  480      TTGTAATGATCGTGACAACCCGTTTCGCGAAGTCCTTTG-CGCC  522
Sbjct  4114546  TTGTAATGATCGTGACAACCCGTTTCGCGAAGTCCTTTGTCGCC  4114589
```

Figura 28 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para os genes de nitrofurantoína.

nfsA

Escherichia coli ATCC 25922, complete genome
Sequence ID: refINZ_CP009072.1| Length: 5130767 Number of Matches: 1

Range 1: 4377322 to 4377439 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
202 bits(109)	7e-49	115/118(97%)	2/118(1%)	Plus/Plus

Features: nitroreductase A

```
Query  8        AAATGGAGGCCGGTAA-CGCGGCTT-AGATCCGGATTATCCGCAGGCCAGCCAAGGCACA  65
Sbjct  4377322  AAATGGAGGCCGGTAAACGCGGCTTAAGATCCGGATTATCCGCAGGCCAGCCAAGGCACA  4377381

Query  66       GCCCAAACAGCGGCAGAACATGCTGCGGTAATWTCAGCAGTTCCGTCACCGCTTCAAT  123
Sbjct  4377382  GCCCAAACAGCGGCAGAACATGCTGCGGTAATTTCAGCAGTTCCGTCACCGCTTCAAT  4377439
```

nfsB

Escherichia coli ER2796, complete genome
Sequence ID: refINZ_CP009644.1| Length: 4558663 Number of Matches: 1

Range 1: 601533 to 602280 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1181 bits(639)	0.0	710/748(95%)	18/748(2%)	Plus/Plus

Features: nitroreductase B

```
Query  45       CTG-AACAGGGTTATGCAAATCARGAGAATCTGAGAGGAAATAGCCGGGCAGATGCCCGG  103
Sbjct  601533   CTGAAACAGGGTTATGCAAATCAGGAGAATCTGAGAGGAAATAGCCGGGCAGATGCCCGG  601592

Query  104      CAAGAGAGAATTACMCTTCGGTTAAGGTGATGTTTTGCGGCAGACGAGATTTCGGCAGCG  163
Sbjct  601593   CAAGAGAGAATTACACTTCGGTTAAGGTGATGTTTTGCGGCAGACGAGATTTCGGCAGCG  601652

Query  164      TAGCGTTAAAATCTTCAACGCTGTGATGACCTACCGGAACAACCACCAGACTGGTGTAGC  223
Sbjct  601653   TAGCGTTAAAATCTTCAACGCTGTGATGACCTACCGGAACAACCACCAGACTGGTGTAGC  601712

Query  224      CTTTCTCTTTCAGACCAAATTCTGCRTCGAGGATGGSGGCGTCAAAACCTTCGATGGGTA  283
Sbjct  601713   CTTTCTCTTTCAGACCAAATTCTGCATCGAGGATGGCGGCGTCAAAACCTTCGATGGGTA  601772

Query  284      CCGCGTCCAGACCCAGAGCCGCCACGCCGAGCAGGAAGTTACCGACGTTGAGATAAACCT  343
Sbjct  601773   CCGCGTCCAGACCCAGAGCCGCCACGCCGAGCAGGAAGTTACCGACGTTGAGATAAACCT  601832

Query  344      GTTTTGCCATCCACTCTGCATCATCATGCAGATCTTTACGGTGCATATCASCRAAGAACT  403
Sbjct  601833   GTTTTGCCATCCACTCTGCATCATCATGCAGATCTTTACGGTGCATATCAGCGAAGAACT  601892

Query  404      TGCGACCTTTATCGTTCGCGGCTTTCGCTTCCGGCGTGGCAAAGCGGCCATCGGCATCTT  463
Sbjct  601893   TGCGACCTTTATCGTTCGCGGCTTTCGCTTCCGGCGTGGCAAAGCGGCCATCGGCATCTT  601952

Query  464      CCTGGTCAACAACCAGCTTCAGCCAGACATCGTCCATCGCGGTTTTTGCACAGAACACCA  523
Sbjct  601953   CCTGGTCAACAACCAGCTTCAGCCAGACATCGTCCATCGCGGTTTTTGCACAGAACACCA  602012

Query  524      CGACGTGCGAGGCATCAAGCATTTTACGCTCGTTGAACACGTAATTACCGGCAGCGGATT  583
Sbjct  602013   CGACGTGCGAGGCATCAAGCATTTTACGCTCGTTGAACACGTAATTACCGGCAGCGGATT  602072

Query  584      TGGCAACACGCGCTTTACCTTCWTCCGTGCTGGCAACAATAAAATGCCACGGCTGGGAGT  643
Sbjct  602073   TGGCAACACGCGCTTTACCTTCTTCCGTGCTGGCAACAATAAAATGCCACGGCTGGGAGT  602132

Query  644      TGGTGCTGGATGGGCTGYATTGCAGTAGCGW-TTGATCTGCTCGGCCTGTAC-GGG-TA-  699
```

Figura 29 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para o gene de quinolonas.

qnrB

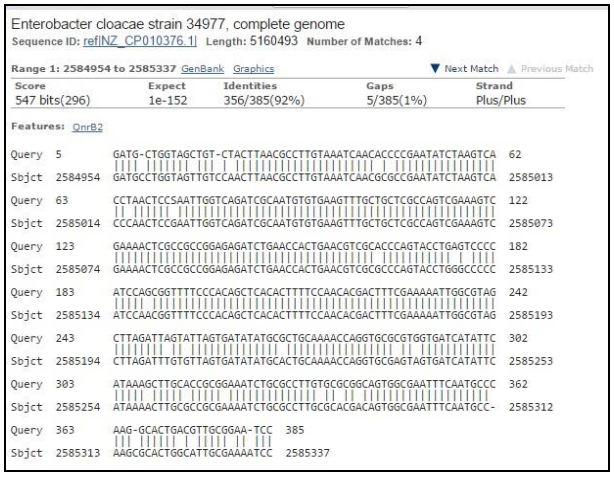
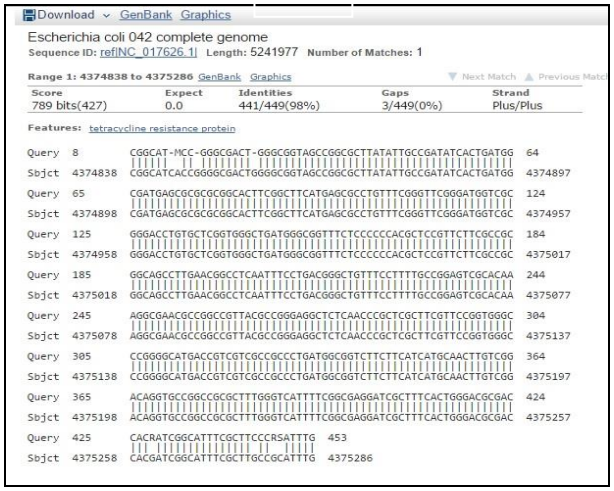
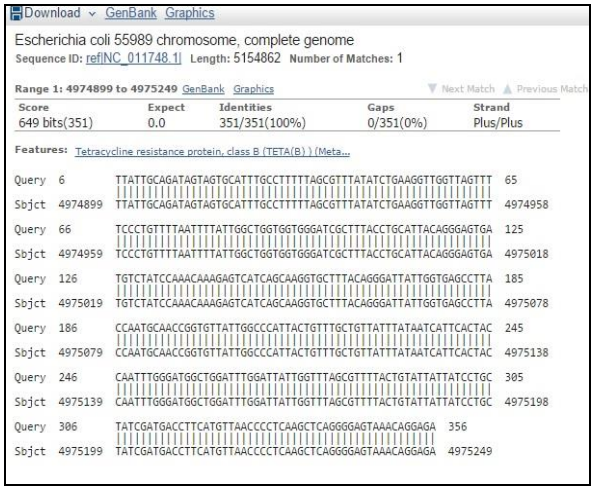


Figura 30 - Análise do alinhamento gerado pelo programa BLAST para os genes de tetraciclina.

tetA



tetB



tetC

O grupo controle apresentou elevada porcentagem de detecção para: *ant* (100%), *nfsA* (98%), *ampC* (83,7%), *tetA* (73,5%) e *nfsB* (59%) quando comparado ao grupo com antibióticos *ant* (83%), *ampC* (74,5%), *tetA* (68%), *nfsA* (66%), *nfsB* (23,4%) (Tabela 11). No grupo controle o único gene não detectado foi bla_{KPC}, sendo verificado em todos os isolados do grupo com antibióticos.

O gene *tetB* (93,6%) foi o mais frequente no grupo com antibióticos, seguido do *tetA* (68%) e *tetC* (32%), sendo que no grupo controle os mais encontrados foram: *tetA* (73,5%), *tetB* (59,2%) e *tetC* (18,4%). A associação do perfil de susceptibilidade e a presença desses genes nos isolados, mostraram que ambos os grupos que apresentavam resistência para tetraciclina estavam associados com a presença do gene *tetB* (p = <0,001) (Tabela 12).

Tabela 11 - Detecção dos genes de resistência entre os isolados dos grupos controle e antibióticos.

Genes	Grupos			
	Controle (n=49)		Antibióticos (n=47)	
	n	(%)	n	(%)
aac	3	6	25	53
ant	49	100	39	83
bla_{CTX-M}	5	10,2	15	32
bla_{TEM}	11	22,4	41	87,2
bla_{KPC}	-	-	33	70,2
bla_{IMP-1}	3	6	10	21,3
ampC	41	83,7	35	74,5
cmlA	7	14,3	23	49
cat	35	71,4	38	80,5
floR	5	10,2	2	4,3
nfsA	48	98	31	66
nfsB	29	59	11	23,4
qnrB	5	10,2	5	10,6
tetA	36	73,5	32	68
tetB	29	59,2	44	93,6
tetC	9	18,4	15	32

-: ausência dos genes.

Genes: aminoglicosídeos: *aac* (*acetylation*), *ant* (*adenylation*), β-lactamases: bla_{CTX-M}, bla_{TEM}, bla_{KPC}, bla_{IMP-1}, *ampC;* cloranfenicol: *cmlA, cat, floR*; nitrofurantoína: *nfsA, nfsB* (*nitroreductases);* quinolonas: *qnrB;* tetraciclina: *tetA, tetB, tetC*.

Para os genes relacionados aos β-lactâmicos, o grupo com antibióticos apresentou uma elevada porcentagem para: bla_{TEM} (87,2%), bla_{KPC} (70,2%), bla_{CTX-M} (32%) e bla_{IMP-1} (21,3%), entretanto no grupo controle essas porcentagens mostraram-se mais baixas para bla_{TEM} (22,4%), bla_{CTX-M} (10,2%) e bla_{IMP-1} (6%). Na susceptibilidade e detecção dos genes entre os grupos (Tabela 12), observou-se que os isolados sensíveis tiveram uma associação com a presença dos genes: bla_{KPC} (p = <0,001), bla_{TEM} (p = <0,001) e bla_{IMP-1} (p = 0,004).

Nos genes para nitrofurantoína (*nfsA* e *nfsB)* o grupo controle apresentou porcentagem mais alta (98%) e (59%) que o grupo com antibióticos (66%) e (23,4%); a associação entre a susceptibilidade e a detecção dos genes ocorreu nos isolados resistentes para *nfsA* (p = <0,001) e *nfsB* (p = <0,001) (Tabela 12).

O gene *cat* de cloranfenicol no grupo com antibióticos foi detectado em (80,5%) dos isolados e no controle (71,4%) e *floR* foi maior no grupo controle (10,2%) e menor no com antibióticos (4,2%); o gene *cmlA* apresentou maior porcentagem no grupo com antibióticos (49%) que no grupo controle (14,3%), e obteve-se associação desse gene (Tabela 12) tanto para os isolados sensíveis (p = 0,049) quanto para os resistentes (p = 0,007).

Tabela 12 - Associação dos genes de resistência frente ao perfil de susceptibilidade dos grupos controle e antibióticos.

Antimicrobianos	Presença dos Genes	Perfil de Susceptibilidade					
		Sensível			Resistente		
		Controle n (%)	Antibióticos n (%)	*p*	Controle n (%)	Antibióticos n (%)	*p*
Tetraciclina	*tetA*	8 (80)	24 (64,9)	0,746	24 (75)	12 (70,6)	0,679
	tetB	8 (80)	36 (97,3)	0,641	21 (65,6)	8 (47)	**<0,001**
	tetC	0	15 (40,5)	1	2 (6,3)	7 (41,2)	1
β-lactâmicos	bla_{KPC}	6 (40)	27 (84,4)	**<0,001**	0	-	-
	bla_{TEM}	27 (96,4)	13 (68,4)	**<0,001**	11 (23)	0	-
	bla_{CTXM}	4 (16,7)	11 (48)	0,706	5 (10,4)	0	-
	ampC	2 (50)	33 (76,8)	-	9 (81,8)	32 (84,2)	0,574
	bla_{IMP-1}	6 (40)	4 (12,5)	**0,004**	3 (5)	-	-
Nitrofurantoína	*nfsA*	-	31 (66)	-	4 (100)	45 (100)	**<0,001**
	nfsB	-	11 (23,4)	-	2 (50)	27 (60)	**<0,001**
Cloranfenicol	*cmlA*	5 (62,5)	18 (38,3)	**0,049**	5 (18,5)	2 (10)	**0,007**
	cat	6 (75)	32 (82)	0,695	16 (59,2)	20 (91)	0,575
	floR	0	2 (5)	0,789	3 (11)	2 (10)	0,951
Quinolonas	*qnrB*	2 (7,1)	3 (15,8)	0,970	5 (10,2)	-	-
Aminoglicosídeos	*aac*	3 (10,8)	22 (61)	**0,025**	1 (2,2)	2 (50)	-
	ant	8 (72,8)	31 (86,6)	**0,004**	45 (100)	4 (100)	-

Teste utilizado *Chi-quadrado*

- Sem amostragem suficiente para realização do teste chi-quadrado.

Para aminoglicosídeos o gene *aac* teve maior detecção no grupo com antibióticos (53%) que no grupo controle (6%), e foi associada a presença desse gene (Tabela 12) nos isolados sensíveis (p = 0,025). O gene *ant* foi detectado em todos os isolados do grupo controle (100%) e em 83% no grupo com antibióticos, e

foi encontrada associação com a presença desse gene nos isolados sensíveis (*p* = 0,004).

Em relação as quinolonas, o gene *qnrB* apresentou porcentagens semelhantes tanto no grupo controle (10,2%) como no grupo com antibióticos (10,6%).

4.4 Diversidade genética

A análise da diversidade genética por AP-PCR utilizando o oligonucleotídeo OPA 09 revelou bandas nítidas, o que facilitou a análise de ambos os dendrogramas (grupo controle e antibióticos).

O dendrograma do grupo controle apresentou dois clusters distintos em 70% de similaridade, um deles compostos por todos isolados e no outro agrupamento ficou a cepa *E. coli* ATCC 25922. Com 85% de similaridade foram verificados 14 grupos genéticos. Desses, foi observado 10 agrupamentos (em destaque) abrigando mais de uma cepa com 100% de similaridade (Tabela 13 e Figura 31).

O cluster I abrigou cinco cepas com dois grupos: A e B. O grupo I-A agrupou um clone (C1a e C1b) da mesma criança, sendo uma *E. coli* comensal e a outra EAEC atípica, ambas apresentaram resistência para ampicilina, cefoxitina, cloranfenicol e nitrofurantoína e foram positivas para os genes *ant, cat e nfsA*. No cluster I-B as três cepas eram de crianças diferentes sendo todos resistentes a nitrofurantoína e apresentando os genes *ant, cat, tetA e tetB.*

O cluster II apresentou apenas uma cepa de *E. coli* comensal (C2a) e se caracterizou por apresentar resistência à seis das onzes drogas testadas e pela presença dos genes *ampC, ant,* bla_{TEM}*, cat, nfsA, tetA e tetB.*

No cluster III observou-se a formação de dois grandes grupos com vários subgrupos. No grupo A agruparam-se 5 cepas de *E. coli* comensal e uma EAEC atípica. Esse grupo apresentou características semelhantes tanto no padrão quanto na presença dos genes de resistência, entretanto o isolado C13a apresentou resistência apenas para ampicilina e nitrofurantoína e se diferenciou dos outros isolados pela presença do gene *floR.* O grupo B agrupou 8 cepas, incluindo *B. fragilis* ATCC 25285 e três clones de 3 diferentes crianças sendo: EAEC atípica (C11a) e *E. coli* comensal (C11b), EAEC típica (C24a) e *E. coli* comensal (C24b), EPEC atípica (C30a) e *E. coli* comensal (C30b), todos esses clones foram resistentes para nitrofurantoína e apresentaram os genes: *ampC, ant, cat* e *nfsA.* O

isolado C25a agrupou-se separadamente, pois foi sensível a nitrofurantoína e resistente apenas para ampicilina.

O cluster IV abrigou dois grupos sendo verificado no agrupamento A, um clone de uma mesma criança, composto por três cepas: uma *E. coli* comensal (C12a) e duas diarreiogênicas: STEC-*stx2* (C12b) e EPEC atípica (C12c). Os isolados de (C12a e C12c) apresentaram o mesmo perfil de resistência para ampicilina e nitrofurantoína, entretanto a cepa C12b apresentou um padrão de resistência maior para ampicilina, cloranfenicol, levofloxacina, nitrofurantoína e tetraciclina. Os três clones tiveram em comum a presença dos genes *ampC, cat e nfsA*. O grupo IV-B apresentou apenas a cepa C27c com resistência para ampicilina e nitrofurantoína e difere dos demais isolados deste cluster pela presença dos genes de resistência: *cmlA* e *tetA*.

No cluster V foi agrupado um clone de uma mesma criança sendo, uma *E. coli* comensal (C23a) e uma EAEC atípica (C23b), ambas tendo resistência em comum a nitrofurantoína, e o padrão de genes semelhantes para *ant, nfsA tetA e tetB.*

O cluster VI obteve-se diversos agrupamentos. No subgrupo VI-A1 foram encontrados 2 clones de duas crianças, sendo que uma cepa era *E. coli* comensal (C25b) que não apresentou resistência para nenhuma das 11 drogas testadas e a outra ETEC-LT (C25c); entretanto ambas apresentaram o mesmo padrão de genes: *ant, cat, nfsA e tetB.* O outro clone foi composto por *E. coli* comensal (C29a) e EAEC atípica (C29b) apresentando mesmo perfil de resistência para: ampicilina, cloranfenicol, nitrofurantoína e tetraciclina, e padrão de genes iguais, diferenciando apenas o gene *tetC*. O subgrupo VI-A2 foi agrupado um clone, sendo uma *E. coli* comensal (C15a) e uma EAEC atípica (C15b), entretanto apresentaram apenas semelhança no perfil de resistência para ampicilina e nitrofurantoína e o padrão de genes para *ampC, ant* bla_{TEM}*, nfsA* e. O subgrupo VI-B1 agrupou as cepas de *E. coli* comensal (C19a, C19b e C19c) e apresentaram o mesmo padrão para os genes: *ampC, ant, nfsA, nfsB* e *tetB.* O subgrupo VI-B2 agrupou as cepas (C20a e C20b) de *E. coli* comensal e apresentaram resistência para ampicilina e nitrofurantoína.

O cluster VII mostrou o agrupamento de um clone com duas cepas de EAEC atípica de uma mesma criança (C7a e C7b), que apresentaram diferenças no perfil de resistência para cefoxitina e padrão de genes: *ampC* e bla_{CTX-M}.

Dos cluster VIII até o XIV os agrupamentos foram determinados por outro fator externo do que avaliamos no momento, pois foi verificado ramificações

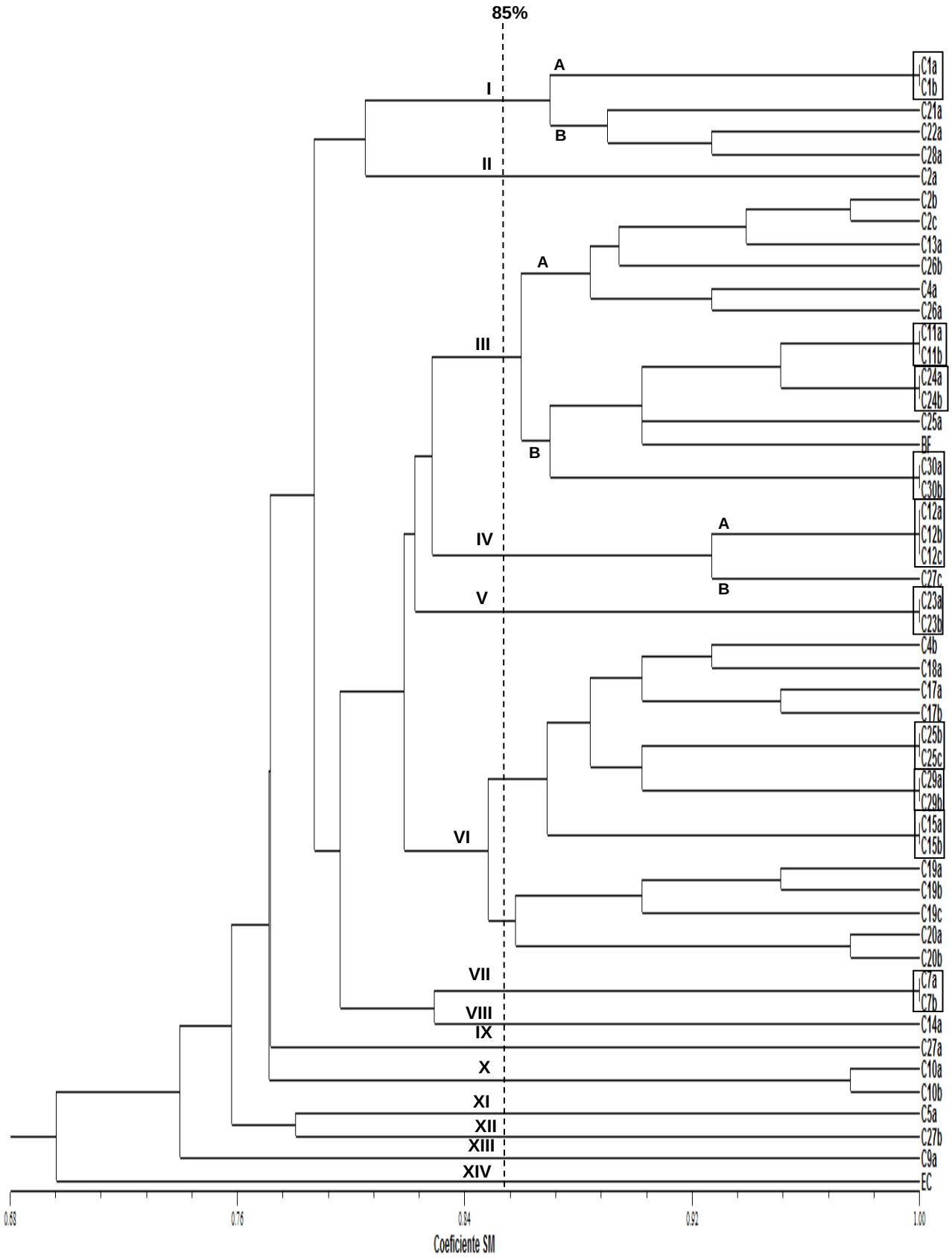
compostas, em sua maioria, apenas por uma única cepa e com características fenotípicas e genotípicas semelhantes à observadas nos outros clusters já descritos.

Tabela 13 - Características fenotípicas e genotípicas dos 49 isolados de *E. coli* do grupo controle.

Isolados	*E. coli*	Presença de genes de resistência	Grupo genético por AP-PCR	Padrão de resistência
C1a	Comensal	*ampC,ant,bla$_{CTX-M}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA*	I	Amp,Clo,Fox,Nit
C1b	EAECa	*ant,cat,nfsA*	I	Amp,Clo Fox,Lev,Nit
C2a	Comensal	*ampC,ant,bla$_{TEM}$,cat,nfsA,tetA,tetC*	II	Amp,Can,Clo,Fox,Nit,Tet
C2b	Comensal	*ampC,ant,bla $_{CTX-M}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA tetA,tetC*	III	Amp,Clo,Fox,Nit,Tet
C2c	Comensal	*ampC,ant,bla$_{CTXM}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA,nfsB,tetA,tetC*	III	Amp,Clo,Fox,Nit,Tet
C4a	Comensal	*ant,cat,bla$_{TEM}$,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	III	Amp,Clo,Fox,Nit
C4b	Comensal	*ant,bla$_{TEM}$,cat,nfsA,nfsB,qnrB,tetA*	VI	Amp,Clo,Nit
C5a	ETEC-LT	*ampC,ant,bla$_{CTX-M}$,cat,nfsA,qnrB,tetA*	XI	Amp,Can,Clo,Nit,Tet
C7a	EAECa	*ant,bla$_{CTX-M}$,cat,nfsA,nfsB,tetA,tetC*	VII	Amp,Clo,Fox,Lev,Nit,Tet
C7b	EAECa	*ampC,ant,cat,nfsA,nfsB,tetA,tetC*	VII	Amp,Clo,Lev,Nit,Tet
C9a	Comensal	*ampC,ant,cat,nfsA,qnrB,tetA,tetB*	XIII	Amp,Clo,Lev,Nit,Tet
C10a	EPECa	*ampC,ant,cat,nfsA,tetA*	X	Amp,Nit,Tet
C10b	EPECa	*ampC,ant,cat,nfsA,nfsB*	X	Amp,Nit,Tet
C11a	EAECa	*ampC,ant,cat,nfsA*	III	Amp,Nit,Tet
C11b	Comensal	*ampC,ant,floR,nfsA,nfsB,qnrB*	III	Amp,Nit,Tet
C12a	Comensal	*ampC,ant,cat,nfsA,nfsB*	IV	Amp,Nit
C12b	STEC-stx2	*ampC,cat,floR,nfsA,qnrB,tetB*	IV	Amp,Clo,Lev,Nit,Tet
C12C	EPECa	*ampC,ant,cat,nfsA*	IV	Amp,Nit
C13a	EAECa	*ampC,ant,cat,floR,nfsA*	III	Amp,Nit
C14a	Comensal	*ampC,ant,cat,nfsA,nfsB,tetA*	VIII	Amp,Clo Cro,Fox,Nit
C15a	Comensal	*ampC,ant,bla$_{TEM}$,cat,nfsA,nfsB*	VI	Amp,Clo,Lev,Nit,Tet
C15b	EAECa	*aac,ampC,ant,bla$_{IMP-1}$,bla$_{TEM}$,nfsA,tetA*	VI	Amp,Can,Nit
C17a	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{IMP-1}$,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	VI	Amp,Nit,Tet
C17b	Comensal	*ant,cat,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	VI	Amp,Nit,Tet
C18a	Comensal	*ampC,ant,cat,nfsA,tetB*	VI	Amp
C19a	Comensal	*ampC,ant,bla$_{TEM}$,cmlA,nfsA,nfsB,tetB*	VI	Nit,Tet
C19b	Comensal	*ampC,ant,cmlA,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	VI	Amp
C19c	Comensal	*ampC,ant,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	VI	Amp,Nit
C20a	Comensal	*ampC,ant,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	VI	Amp,Nit
C20b	Comensal	*ampC,ant,nfsA,nfsB,tetA*	VI	Amp,Clo,Nit
C21a	Comensal	*ampC,ant,cat,tetA,tetB*	I	Amp,Nit
C22a	Comensal	*aac,ant,cat,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	I	Amp,Can,Clo,Fox,Nit
C23a	Comensal	*ampC,ant,floR,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	V	Amp,Nit
C23b	EAECa	*ant,nfsA,tetA,tetB*	V	Nit
C24a	EAECt	*ampC,ant,cat,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	III	Nit
C24b	Comensal	*ampC,ant,cat,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	III	Nit
C25a	Comensal	*ampC,ant,cat,nfsA,tetA,tetB*	III	Amp
C25b	Comensal	*ant,cat,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	VI	-
C25c	ETEC-LT	*ampC,ant,cat,nfsA,tetB*	VI	Nit
C26a	Comensal	*ampC,ant,cat,nfsA,nfsB,tetA,tetB,tetC*	III	Nit
C26b	Comensal	*ampC,ant,bla$_{TEM}$,cat,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	III	Nit
C27a	STEC-stx1	*ampC,ant,cat,nfsA,nfsB,tetA,tetB,tetC*	IX	Amp,Nit,Tet
C27b	Comensal	*ampC,ant,bla$_{TEM}$,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	XII	Amp,Nit
C27c	Comensal	*ampC,ant,cmlA,nfsA,tetA,tetB*	IV	Amp,Nit
C28a	Comensal	*ampC,ant,cat,floR,nfsA,tetA,tetB*	I	Nit
C29a	Comensal	*ampC,ant,cmlA,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	VI	Amp,Clo,Nit,Tet
C29b	EAECa	*ampC,ant,cmlA,nfsA,tetA,tetB,tetC*	VI	Amp,Clo,Nit,Tet
C30a	EPECa	*ampC,ant,bla$_{IMP1,}$cat,cmlA,nfsA,nfsB,tetA,tetB,tetC*	III	Nit
C30b	Comensal	*ampC,ant,cmlA,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	III	Nit

*Amp - ampicilina, Can - canamicina, Clo - cloranfenicol, Cro - ceftriaxona, Fox - cefoxitina, Lev - levofloxacina, Mer - meropenem, Nit - nitrofurantoína, Tet - tetraciclina.

Figura 31 - Dendrograma dos 49 isolados de *E. coli* nas crianças do grupo controle.



Coeficiente de Simple Matching (SM). EC – *Escherichia coli* ATCC 25922, BF- *Bacteroides fragilis* ATCC 25285.

No dendrograma do grupo tratado com antibióticos em 86% de similaridade foram verificados 24 grupos genéticos. Desses, pôde ser observado apenas 2 agrupamentos (em destaque) abrigando mais de uma cepa com 100% de similaridade. Ainda, nesse dendrograma, as cepas *E. coli* ATCC 25922 e *B. fragilis* ATCC 25285 agruparam-se em ramificações distintas, mas inseridos nos clusters dos isolados do grupo antibiótico (Tabela 14 e Figura 32).

O cluster I apresentou dois grandes grupos: A e B, sendo I-A composto por 13 cepas (A1a, A1b, A31b, A25b, A28a, A31c, A21a, A25a, A11c, A29a, A4b, A30b, A30c) de *E. coli* comensal que apresentaram perfil de resistência amplo tendo em comum a resistência para: ampicilina, meropenem, nitrofurantoína; e I-B formado por 5 cepas: três *E. coli* comensal (A6b, A7a e A7b) e duas diarreiogênicas (A4a) EPEC atípica e (A9a) EAEC atípica tendo em comum apenas a presença do gene $bla_{TEM.}$ Esse cluster também apresentou um clone de duas crianças diferentes (A1b e A31b) ambas *E. coli* comensal e que apresentaram os genes resistência: *ampC, cat*, *cmlA, nfsA* e *tetB*.

O cluster V agrupou um outro clone de duas crianças diferentes (A5a e A6a) ambas *E. coli* comensais, tendo em comum a resistência a nitrofurantoína e tetraciclina e a presença dos genes: *ant*, bla_{CTX-M}, bla_{TEM}, *cat* e *nfsA.*

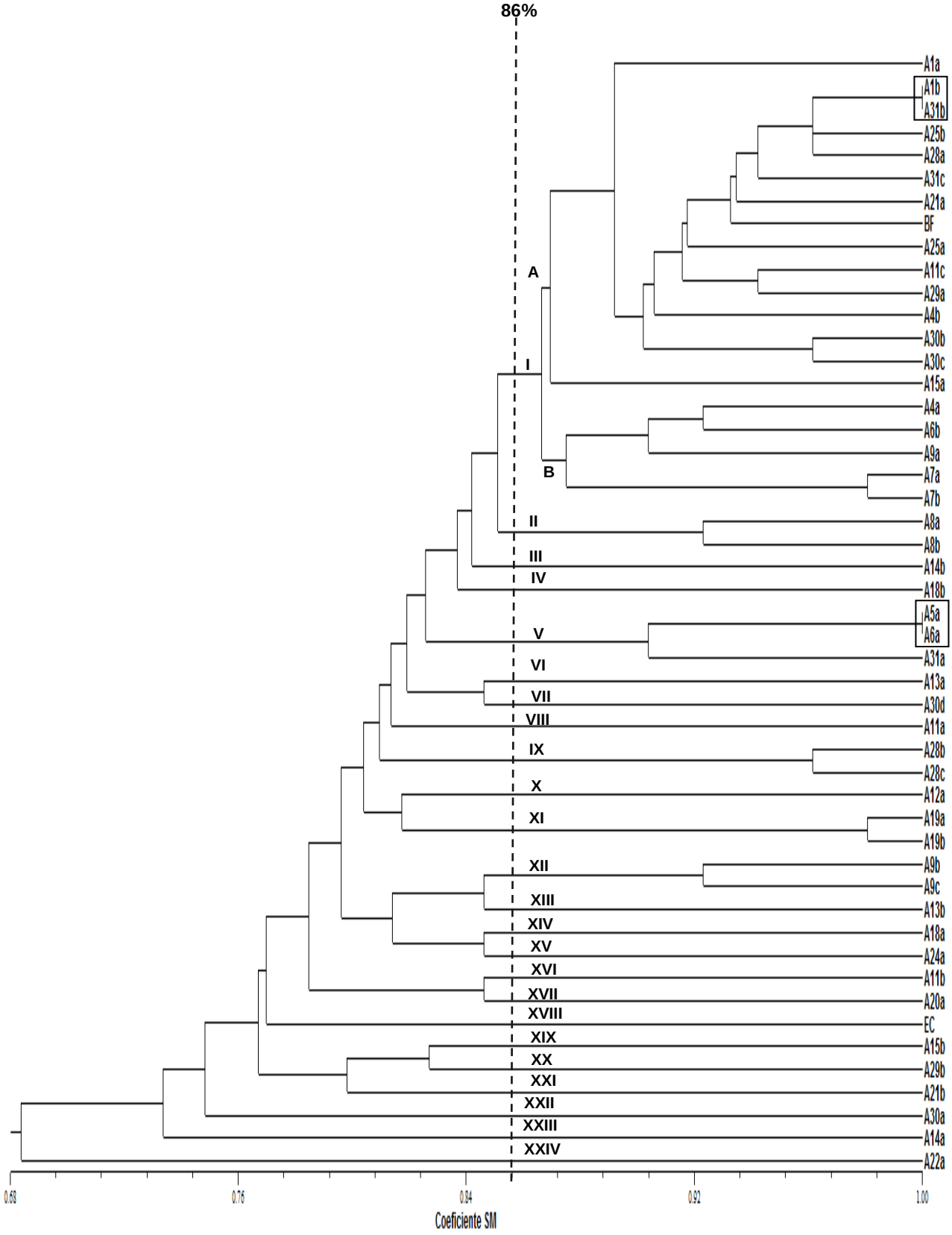
Assim como no dendrograma do grupo controle, dos clusters VI até o XXIV os agrupamentos foram determinados por outro fator externo do que foi avaliado, pois verificou-se ramificações compostas, em sua maioria, apenas por uma única cepa e com características fenotípicas e genotípicas semelhantes às observadas nos outros clusters já descritos. Pode-se inferir que talvez esses agrupamentos foram formados devido a resistência às diversas classes de drogas testadas e a associação de variados genes de resistência sendo expressos.

Tabela 14 - Características fenotípicas e genotípicas dos 47 isolados de *E. coli* do grupo com antibióticos.

Isolados	*E. coli*	Genes de resistência	Grupo genético por AP-PCR	Perfil de resistência
A1a	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{TEM}$,cat,cmlA,nfsA,tetB*	I	Amp,Clo,Mer,Nit,Tet
A1b	Comensal	*ampC,bla$_{TEM}$,cat,cmlA,nfsA,tetB*	I	Amp,Clo,Cro,Mer,Nit,Tet
A4a	EPECa	*ampC,bla$_{TEM}$,cat,cmlA,nfsA,nfsB,tetA*	I	Clo,Nit,Mer
A4b	Comensal	*ampC,ant,bla$_{TEM}$,cat,cmlA,nfsA*	I	Nit,Mer
A5a	Comensal	*ant,bla$_{CTX-M}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA*	V	Nit,Tet
A6a	Comensal	*aac,ant,cat,bla$_{CTX-M}$,bla$_{TEM}$,cmlA,nfsA,nfsB,tetB*	V	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Nit,Tet
A6b	Comensal	*aac,bla$_{CTX-M}$,bla$_{TEM}$,tetB*	I	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Nit,Tet
A7a	Comensal	*aac,bla$_{CTX-M}$,bla$_{TEM}$,cmlA,nfsB,qnrB,tetA,tetB,tetC*	I	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Nit,Tet
A7b	Comensal	*aac,bla$_{CTXM}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA,nfsB,qnrB,tetA,tetB,tetC*	I	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Nit,Tet
A8a	Comensal	*bla$_{CTX-M}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA,nfsB,qnrB,tetA,tetB*	II	Clo,Cro,Nit
A8b	EPECa	*ampC,bla$_{CTXM}$,bla$_{TEM}$,cat,qnrB,tetA,tetB*	II	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Nit,Tet
A9a	EAECa	*ant,bla$_{TEM}$,cat,tetB,tetC*	I	Amp,Clo,Nit,Tet
A9b	Comensal	*aac,ant,bla$_{IMP-1}$,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,qnrB,tetB,tetC*	XII	Amp,Can,Clo,Mer,Nit,Tet
A9c	EAECa	*aac,ant,bla$_{IMP-1}$,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,tetB*	XII	Amp,Clo,Mer,Nit,Tet
A11a	Comensal	*ampC,ant,bla$_{IMP-1}$,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,tetB,tetC*	VIII	Amp,Clo,Fox,Mer,Nit,Tet
A11b	Comensal	*ampC,ant,bla$_{IMP-1}$,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA,tetA,tetB*	XVI	Amp,Can,Clo,Nit,Tet
A11c	Comensal	*ampC,ant,bla$_{IMP-1}$,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA,tetB,tetC*	I	Amp,Can,Fox,Mer,Nit,Tet
A12a	Comensal	*ant,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,nfsA,tetA,tetB,tetC*	X	Amp,Can,Fox,Mer,Nit,Tet
A13a	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{IMP1}$,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA tetA,tetB,tetC*	VI	Amp,Clo,Nit,Tet
A13b	Comensal	*ampC,ant,bla$_{IMP-1}$,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,cmlA,nfsA, tetA,tetB,tetC*	XIII	Amp,Clo,Cro,Fox,Nit,Tet
A14a	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{CTX-M}$,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cmlA,cat, tetA,tetB*	XXIII	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Mer,Nit,Tet
A14b	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,cmlA,tetB*	III	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Mer,Nit,Tet
A15a	Comensal	*ampC,ant,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,cmlA,floR,nfsB,tetA,tetB*	I	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Mer,Nit,Tet
A15b	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,cmlA,floR,nfsB,tetA, tetB*	XIX	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Mer,Nit
A18a	Comensal	*ampC,ant,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,cmlA,nfsA,tetA,tetB,tetC*	XIV	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Mer,Nit, Tet,Tig
A18b	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA,nfsB,tetA,tetB, tetC*	IV	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Mer,Nit, Tet,Tig
A19a	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{KPC}$,bla$_{CTX-M}$,bla$_{TEM}$,cat nfsA, tetA,tetB,tetC*	XI	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Mer,Nit,Tet, Tig
A19b	Comensal	*ampC,aac,ant,bla$_{CTX-M}$,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,cmlA nfsA, tetA,tetB,tetC*	XI	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Nit,Tet, Tig
A20a	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{IMP-1}$,bla$_{TEM}$,cat,cmlA,nfsB,tetA, tetB,tetC*	XVII	Amp,Can,Clo,Tet
A21a	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{IMP-1}$,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA,tetA, tetB,tetC*	I	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Nit,Tet, Tig
A21b	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{IMP-1}$,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA,nfsB, tetA,tetB*	XXI	Amp,Can,Cip,Clo,Nit,Tet
A22a	Comensal	*aac,ant,ampC,bla$_{CTX-M}$,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA, tetA,tetB*	XXIV	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Mer,Nit, Tet
A24a	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA,tetA,tetB*	XV	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Mer,Nit, Tet,Tig
A25a	Comensal	*ampC,ant,bla$_{CTX-M}$,bla$_{KPC}$,cat,nfsA,tetB*	I	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Mer,Nit
A25b	Comensal	*ampC,ant,bla$_{KPC}$,cat,tetA,tetB*	I	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Lev,Mer,Nit
A28a	Comensal	*ampC,cat,cmlA,nfsA,tetA,tetB*	I	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Lev,Mer,Nit
A28b	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,cmlA,nfsA,tetA,tetB*	IX	Amp,Can,Clo,Cro,Nit,Mer
A28c	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA,tetA,tetB*	IX	Amp,Can,Cro,Fox,Mer,Nit
A29a	Comensal	*ampC,ant,bla$_{KPC}$,nfsA,nfsB,tetA,tetB*	I	Amp,Can,Mer,Nit
A29b	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cmlA,nfsA,tetA,tetB*	XX	Amp,Can,Mer,Nit,Tet
A30a	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,cmlA,nfsA,tetB*	XXII	Amp,Can,Cip,Clo,Fox,Cro,Lev,Mer,Nit, Tet,Tig
A30b	Comensal	*aac,ampC,ant,bla$_{KPC}$,cmlA,nfsA,tetA,tetB*	I	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Mer,Nit, Tet,Tig
A30c	Comensal	*aac,ant,bla$_{KPC}$,cmlA,tetA,tetB*	I	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Lev,Mer,Nit, Tet,Tig
A30d	Comensal	*ant,bla$_{CTX-M}$,bla$_{KPC}$,cmlA,tetA,tetB*	VII	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Fox,Mer,Nit,Tet,Tig
A31a	Comensal	*ant,bla$_{CTX-M}$,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,cmlA,tetB*	V	Amp,Can,Cip,Cro,Mer,Nit,Tet,Tig
A31b	Comensal	*ampC,ant,bla$_{CTXM}$,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,cmlA,nfsA,tetA, tetB*	I	Amp,Can,Cip,Cro,Lev,Mer,Nit,Tet
A31c	Comensal	*ampC,ant,bla$_{KPC}$,bla$_{TEM}$,cat,nfsA,tetA,tetB*	I	Amp,Can,Cip,Clo,Cro,Mer,Nit,Tet

*Amp - ampicilina, Can - canamicina, Cip - ciprofloxacina, Clo - cloranfenicol, Cro - ceftriaxona, Fox - cefoxitina, Lev - levofloxacina, Mer - meropenem, Nit - nitrofurantoína, Tet - tetraciclina, Tig - tigeciclina.

Figura 32 - Dendrograma dos 47 isolados de *E. coli* das crianças com antibióticos.



Coeficiente de Simple Matching (SM). EC – *Escherichia coli* ATCC 25922, BF- *Bacteroides fragilis* ATCC 25285.

As análises dos dendrogramas revelaram que muitos agrupamentos foram formados, entretanto os dois principais fatores: a presença dos genes e posterior o padrão de resistência, bem como, os demais parâmetros (origem e patotipos) aparentemente não foram determinantes na separação dos clusters.

No grupo controle foi verificado menos padrões de resistência, em destaque a sensibilidade para ciprofloxacina, meropenem e tigeciclina, e menor presença do número de genes de resistência, se comparar com o grupo com antibióticos; entretanto se observar o número encontrado é alto por tratar-se de um grupo de crianças saudáveis e sem tratamento com antibioticoterapia. Observou-se também que no grupo com antibióticos tanto a presença quanto o padrão de resistência foram verificados em maior quantidade e em todos os isolados se comparado com o grupo controle.

Nenhuma cepa do grupo controle se agrupou com cepas do grupo com antibióticos apresentando 100% de similaridade, além disso foi verificado que não houve uma separação das amostras (controle e antibióticos) isto é, as cepas de ambos os grupos se agruparam formando diversos clusters; e devido ao grande número de isolados avaliados (98 cepas sendo: 96 dos grupos controle e antibióticos e duas ATCC) foi impossível a contrução de um único dendrograma.

5 DISCUSSÃO

De todas as influências exógenas que possam alterar a microbiota intestinal residente, os agentes antimicrobianos são capazes de causar rápidas e drásticas mudanças. A extensão do impacto na população microbiana depende do tipo de antimicrobiano utilizado, do tempo de exposição, do mecanismo de ação da droga e do grau de resistência dessa comunidade (JERNBERG et al., 2010).

A diminuição no número de microrganismos devido à terapia antimicrobiana pode conduzir a vários efeitos indesejáveis, como favorecer a colonização de bactérias potencialmente patogênicas (KLEESSEN et al., 2000; NICOLI, 1995; NICOLI e VIEIRA, 2004), além da estabilização de uma população bacteriana resistente que pode persistir por anos nessa microbiota (JAKOBSSON et al., 2010).

Estudos sobre os impactos da exposição aos antimicrobianos na microbiota intestinal relatam que existe uma diminuição, algumas vezes mais acentuadas, de determinados gêneros e espécies. Entre os microrganismos que mais sofrem esse tipo de alteração estão as enterobactérias, enterococos e bactérias anaeróbias (NORD; EDLUND, 1991; PANDA et al.,2014; RAFII et al., 2008;).

Na análise quantitativa foram detectados os 12 microrganismos avaliados em ambos os grupos, entretanto foi observado que alguns microrganismos apresentaram uma redução no número de cópias por g/fezes: *Bifidobacterium* spp., *B. fragilis*, *C. perfringens*, *E. coli*, *M. smithii* e *Firmicutes* nas amostras das crianças que utilizaram antibióticos em relação ao grupo controle.

Panda et al., (2014) analisaram a microbiota intestinal de adultos antes e depois do tratamento com antibióticos β-lactâmicos e fluoroquinolonas, e os resultados mostraram uma diminuição de aproximadamente 25% no número de microrganismos do filo *Firmicutes*, e um aumento no filo *Bacteroidetes* independentemente do tipo de antimicrobiano utilizado.

Pérez-Cobas et al., (2012) avaliaram a microbiota de um indivíduo adulto em diversos momentos (3 ,6, 11 e 14 dias) durante tratamento com β-lactâmicos, e observaram alterações a partir do 6º dia de tratamento para vários filos como: *Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria* e *Proteobacteria*.

Essa variação e diminuição no número de microrganismos também foi observada por Antonopoulos et al., (2009) em estudo realizado com animais (ratos) que foram expostos a alimentos com adição de antibióticos (amoxicilina,

metronidazol, cefoperazona) durante 10 dias; e os resultados mostraram aumento na quantificação de microrganismos pertencentes ao filo *Proteobacteria* e diminuição dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* em relação ao grupo controle.

Esses dados, evidenciam que a microbiota intestinal sofre alterações quantitativas e qualitativas independentemente da dosagem e classe de antimicrobianos utilizados, tanto em modelos animais como em humanos (ANTONOPOULOS et al., 2009; PANDA et al., 2014; PÉREZ-COBAS et al., 2012).

No entanto foi observado que *Lactobacillus* spp. e *P. distasonis* apresentaram maior quantificação no grupo antibiótico quando comparados com grupo controle, indicando que esses microrganismos podem não ter sido afetados pela exposição aos antibióticos.

O aumento do número de *Lactobacillus* spp. em crianças com antibióticos em nosso estudo chama a atenção, pois essas bactérias são caracterizadas como probióticos e esse aumento na detecção, sugere que esses microrganismos poderiam carrear genes de resistência aos antimicrobianos, o que seria um grande problema devido a transferência horizontal de genes levando ao desenvolvimento de cepas resistentes na microbiota intestinal (ASHRAF; SHAH, 2011).

Em relação ao *P. distasonis,* Nakano et al., (2011), avaliaram a susceptibilidade aos antimicrobianos dessa espécie isolada de amostras fecais e observaram resistência para diversas drogas testadas, e provavelmente essa resistência possa ter sido adquirida por transferência horizontal com cepas de *Bacteroides* spp.. Nossos dados mostram que esses microrganismos, possivelmente, possuem algum mecanismo de resistência, devido sua elevada quantificação no grupo com antibioticoterapia.

Neste estudo analisando a quantidade de antibióticos utilizados pelas crianças e os valores obtidos no qPCR foi observado que o número de antibióticos não exerceu uma grande influência na quantificação dos microrganismos. Entretanto, no caso de *Bifidobacterium* spp. e *P. distasonis* em comparação as crianças que tomavam 1 antibiótico com aquelas que tomavam 2 ou 3; a quantidade influenciou nos valores de número de cópias, chamando a atenção para uma possível resistência desses microrganismos.

Croswell et al (2009), avaliaram diferentes antibioticoterapias para examinar o impacto sobre a microbiota intestinal, e observaram mudanças distintas no total de número de bactérias, com perdas variando de 0,5 a 3 logs de bactérias, e a

quantidade desses antimicrobianos também tiveram efeitos sobre os gêneros *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp. e *Clostridium* spp.

No entanto, uma questão-chave em relação à administração de antibióticos é se a comunidade microbiana recupera a sua composição original após o tratamento. Poucos estudos analisaram os efeitos a longo prazo do uso de antibióticos em seres humanos, mas os resultados diferem entre técnicas de biologia molecular (qPCR, pirosequenciamento, metagenômica, análise *in silico*) e métodos clássicos de cultura (DE La COCHETIERE et al., 2005, JERNBERG et al., 2010).

Pelo padrão de microrganismos foi observado que todos os microrganismos estudados foram detectados em 23 (76,6%) crianças do grupo controle e 19 (61,2%) crianças do grupo com antibióticos. O grupo com antibióticos ainda apresentou um padrão de 11 microrganismos em 8 crianças e o grupo controle em 2 crianças, sendo diferenciado dos outros padrões pela ausência de *M. smithii.* Os demais padrões de microrganismos foram bem distintos em ambos os grupos.

Ainda em relação à quantificação, em nossos resultados, ressalta-se a presença de *M. smithii* nas amostras estudadas. É interessante observar a detecção desse microrganismo no grupo com antibioticoterapia com valores quantitativos muito semelhantes ao grupo controle. Estudos sobre padrões de susceptibilidade em *Archaea* mostram que *M. smithii,* apesar de possuírem sítios alvos diferente de *Bacteria,* apresenta resistência para diversas classes de antimicrobianos incluindo: penicilinas, quinolonas e aminoglicosídeos (DERMOUMI; ANSORG, 2001; DRIDI et al., 2011) e isso deve ser investigado, devido a possível transferência horizontal entre os microrganismos.

A espécie *E. coli* é a bactéria facultativa mais predominante no ecossistema intestinal. Quando são submetidas ao efeito dos antimicrobianos podem tornar-se resistentes, sendo consideradas reservatório de genes, capazes de adquirir e transferir genes a outras bactérias da microbiota residente (WOO et al., 2003).

Neste estudo foram isoladas *E. coli* em 80,3% das amostras de crianças sem diarreia (grupo controle e antibióticos), sendo 26 (86,7%) crianças controles e em 23 (74,2%) crianças tratadas com antibióticos. Samb-Ba et al., (2014) reportaram que *E. coli* foi o microrganismo mais encontrado em indivíduos senegalenses sem diarreia (84,9%) e em indivíduos com diarreia (64,2%). No Brasil, Garcia et al., (2011) também verificaram maior presença de *E. coli* nas amostras de crianças sem diarreia

(80,9%) em comparação as crianças com diarreia (73,7%). Esses dados mostram a prevalência desse microrganismo facultativo em amostras da microbiota intestinal.

Nossos dados mostram *E. coli* comensal em 72,3% e DEC em 27,8% das crianças sem diarreia. *E. coli* comensal foi observada em 53,3% das crianças controle e 90,3% das crianças com antibioticoterapia. Também foi verificada a presença de DEC em 14 (46,7%) crianças do grupo controle: 7 (50%) EAEC atípica e 1 (7,14%) EAEC típica, 3 (21,4%) EPEC atípica, 2 (14,3%) ETEC-LT, 1 (7,14%) STEC *stx1* e 1 (7,14%) STEC *stx2*, e no grupo com antibióticos foi observada apenas em 3 (9,7%) crianças: 2 (66,6%) EPEC atípica e 1 (33,3%) EAEC atípica.

Bonkoungou et al., (2011) detectaram DEC em 45% das crianças com diarreia e 29% das crianças sem diarreia, sendo que EAEC foi o patotipo mais encontrado em ambos os grupos com diarreia (25,9%) e sem diarreia (20,6%), seguido de EPEC (16,3% e 5,3%, respectivamente), ETEC (12,9% e 3,7%, respectivamente); STEC (1,7%) e EIEC (0,6%) foram verificados apenas nas crianças com diarreia.

Garcia et al., (2011) observaram a presença de DEC em crianças com e sem diarreia, e detectou em 36,8% das crianças com diarreia e 29,8% nas amostras não diarreicas, onde EAEC foi o único patotipo encontrado nas amostras sem diarreia (30,9%), e teve maior prevalência em comparação as amostras diarreicas (16,2%).

Diversos trabalhos brasileiros mostram que EAEC tem sido considerado um patógeno emergente no Brasil e em outros países em desenvolvimento da América do Sul e da África, e está associada com diarreia aguda em crianças, mas também tem sido encontrado na microbiota fecal de crianças saudáveis (BUERIS et al., 2007, GARCIA et al., 2011; HUANG et al., 2006 ; WEINTRAUB, 2007).

A maior parte dos estudos epidemiológicos de ocorrência, prevalência e distribuição de DEC são realizados com amostras humanas diarreicas. E por não se conhecer de fato se DEC pode também pertencer a microbiota intestinal, isto é, se poderia colonizar e qual seria o número de unidades formadoras de colônias encontradas nesta população; um diagnóstico de diarreia acometido por DEC poderia gerar dúvidas entre ser o agente principal causador ou se esse microrganismo pertence a essa microbiota (BONKOUNGOU et al., 2011).

Em nosso estudo foi encontrada uma criança (grupo controle) portadora de dois patotipos: um isolado de EPEC atípica e um de STEC-*stx2* (FERNANDES et al., 2014). O relato da detecção de dois patotipos em amostras fecais sem diarreia ainda é escasso, principalmente no Brasil, entretanto, Bonkoungou et al., (2011) em

Burkina Faso (África) encontraram co-infecção de DEC em 2 crianças sem diarreia: uma com EAEC e EPEC e a outra com EPEC e STEC. O que demonstra que esses microrganismos são microbiota transitória em indivíduos assintomáticos. Entretanto mais estudos são necessários para determinar o real papel das DEC, a co-infecção de patotipos e sua presença assintomática no trato intestinal humano, principalmente em crianças.

A resistência em *E. coli* comensais em indivíduos saudáveis foi demonstrada pela primeira vez há mais de 40 anos e muitos estudos têm destacado sua elevada resistência aos antimicrobianos em diversos países (AMAYA et al., 2011; BAILEY et al., 2010; BARTOLONI et al., 2006; ERB et al., 2007; MOSQUITO et al., 2012).

Em relação ao teste de susceptibilidade, nossos resultados revelaram alta porcentagem de resistência entre os isolados, mas principalmente entre o grupo com antibioticoterapia que apresentou resistência para diversos antimicrobianos como: nitrofurantoína (100%), ampicilina (91,5%), cloranfenicol (83%) e canamicina (77,7%), em comparação a 92% para nitrofurantoina, 77,6% para ampicilina, 45% para cloranfenicol e 8% para canamicina no grupo controle. Estudo sobre a susceptibilidade de *E. coli* em crianças sem diarreia apresentaram resistência de 46,4% para ampicilina e 17,6% para cloranfenicol (AMAYA et al., 2011).

Em relação ao perfil de resistência de *E. coli* comensal avaliado por Garcia et al., (2011) em crianças (de 0 a 5 anos) sem diarreia, foi encontrada resistência para tetraciclina (34,9%), ampicilina (30,2%) e levofloxacina (4,6%), em contrapartida nosso trabalho observou elevada porcentagem de resistência tanto nas crianças controle (30,6%, 77,6% e 12,2%, respectivamente) como nas crianças em tratamento com antibióticos (79%, 91,5% e 40,4%, respectivamente).

Em outro estudo realizado no Perú e Bolívia com isolados de *E. coli* comensais, foi verificada elevada resistência variando de 18 a 95% para as mais diversas classes de antimicrobianos: ampicilina (95%), tetraciclina (93%), cloranfenicol (70%), canamicina (28%) e ciprofloxacina (18%) (BARTOLONI et al., 2006). No nosso trabalho a resistência variou de 0 a 91,5% para os mesmos antimicrobianos testados em ambos os grupos

Estudos realizados com crianças e adultos sem diarreia, demostraram variações nas taxas de resistência para ampicilina. Em crianças foram observados perfis mais altos no México (100%); entretanto, em adultos na Turquia foi observado

78% de resistência, e menores taxas foram vistas na população alemã (16,7%) e holandesa (13%) (ERB et al., 2007).

Diferentes padrões de resistência foram observados em todos os nossos isolados de *E. coli* comensais e diarreiogênicas, sendo caracterizada a maioria das cepas como MDR (apresentando padrão de resistência para mais de 3 antibióticos de classes diferentes). Entre eles os que mostraram maior incidência foram: ampicilina, cloranfenicol e nitrofurantoína. Das 96 cepas isoladas de *E. coli,* 26 (53%) foram consideradas MDR no grupo controle e 45 (95,7%) no grupo com antibióticos.

Mosquito et al., (2012) avaliaram perfis de resistência de *E. coli* comensais e DEC isoladas de crianças com e sem diarreia, e verificaram elevada resistência para: ampicilina (80%), tetraciclina (56%), cloranfenicol (21%) e ciprofloxacina (10,3%), corroborando com nossos dados. Ainda nesse estudo, Mosquito et al., (2012), os isolados de EAEC apresentaram 76% de MDR; nossas cepas EAEC (70%) também foram MDR em ambos os grupos analisados.

Em relação aos genes de resistência aos antimicrobianos foi observada elevada prevalência em ambos os grupos, sendo que o grupo controle apresentou maior porcentagem para: *ant* (100%), *nfsA* (98%), *ampC* (83,7%), *tetA* (73,5%) e *nfsB* (59%) se comparado ao grupo com antibióticos: *ant* (83%), *ampC* (74,5%), *tetA* (68%), *nfsA* (66%), *nfsB* (23,4%)

Dominguez et al., (2012) reportaram a presença de cepas de *E. coli* isoladas de crianças espanholas sem diarreia com diversos genes de resistência para β-lactamases de espectro estendido: bla_{TEM} (83%), bla_{SHV} (2%) e bla_{OXA-30} (2%), e para tetraciclinas: *tet*A (57%), *tet*B (24%), *tet*D (2%).

Em nosso trabalho para os genes *tet,* houve associação entre os grupos que apresentavam resistência para tetraciclina e a presença do gene *tetB.* As cepas do grupo com antibióticos apresentaram *tetB* em 93,6% dos isolados, seguido do *tetA* (68%) e *tetC* (32%), entretanto, no grupo controle os mais encontrados foram: *tetA* (73,5%), *tetB* (59,2%) e *tetC* (18,4%). Apesar da tetraciclina não ser uma droga de escolha para infecção acometidas por gram negativos, verificou-se elevada porcentagem tanto na resistência quanto na detecção dos genes (*tet*A, *tet*B e *tet*C), e isso poderia ser o reflexo da grande quantidade utilizada em animais de corte e domésticos.

Para os genes de resistência aos β-lactâmicos foi verificada elevada porcentagem para: *bla*$_{TEM}$ (87,2%), *bla*$_{KPC}$ (70,2%), *bla*$_{CTX-M}$ (32%) e *bla*$_{IMP-1}$ (21,3%), entretanto no grupo controle esses valores mostraram-se mais baixos: *bla*$_{TEM}$ (22,4%), *bla*$_{CTX-M}$ (10,2%) e *bla*$_{IMP-1}$ (6%). Observou-se que os isolados sensíveis, em ambos os grupos controle e antibióticos, tiveram associação com a presença dos genes: *bla*$_{KPC,}$ *bla*$_{TEM}$ e *bla*$_{IMP-1,}$ demonstrando que esses genes estão silenciosos, podendo ser expressos a qualquer instante durante uma pressão exercida pelo uso de antimicrobianos.

Bailey et al (2010) avaliaram os perfis e os genes de resistência de *E. coli* em adultos saudáveis australianos, e verificaram que os isolados resistentes para ampicilina possuíam o gene *bla*$_{TEM,}$ Em nosso estudo a prevalência da resistência para ampicilina foi alta em ambos os grupos estudados e a detecção do gene *bla*$_{TEM}$ no grupo controle foi de 22,4% e 87,2% no grupo tratado com antibióticos.

A prevalência de isolados resistentes produtores de ESBL não aumentou apenas em bactérias patogênicas; a colonização intestinal por *E. coli* produtora de ESBL, principalmente do tipo CTX-M, atingiu níveis de pandemias em poucos anos, e estima-se que há 1.753 milhões de pessoas colonizadas por esse microrganismo em todo o mundo (WOERTHER et al., 2013).

As hipóteses para explicar a alta prevalência de resistência por de β-lactamases no Brasil, quando comparada com Estados Unidos e países da Europa, deve-se ao fato de que as amostras isoladas no Brasil são resistentes as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, devido a produção de β-lactamases (cromossômicas e plasmidiais) e/ou por alteração da permeabilidade citoplasmática (GALES, 1997).

Em relação as carbapenemases foi observado o gene *bla*$_{KPC}$ em 70,2% das cepas do grupo com antibióticos, não sendo encontrado em nenhuma cepa do grupo controle. Para *bla*$_{IMP-1}$ foram detectados em 21,3% do grupo com antibióticos e em 6% do grupo controle. Peirano et al., (2014) avaliaram a prevalência de cepas de *E. coli* produtoras de carbapenemases, e detectaram 33% de *bla*$_{KPC}$ e 2% de *bla*$_{IMP.}$ Entretanto os dados epidemiológicos para *E. coli* produtora de *bla*$_{KPC}$ ainda permanecem relativamente escassos e o gene *bla*$_{IMP-1}$ tem sido detectado em outros membros da família *Enterobacteriaeceae,* como *Klebsiella pneumoniae* e em gram negativos não fermentadores, como *Acinetobacter baumanni* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Cada vez mais é frequente a associação de diferentes mecanismos de resistência para a mesma classe de antimicrobianos em uma única cepa. Na Espanha foi reportado uma cepa de *E. coli* isolada de ITU produtora de duas carbapenemases (VIM-1, KPC-3), uma β-lactamase *ampC* plasmidial (CMY-2) e uma ESBL (SHV-12) (PORRES-OSANTE et al., 2014). Em nosso trabalho encontramos em todas as cepas a presença de mais de um gene de resistência para a mesma classe e/ou diferentes classes de antimicrobianos, demostrando a extensão da problemática das cepas MDR.

O gene *cat* de cloranfenicol no grupo tratado com antibióticos foi detectado em 80,5% das cepas e 71,4% no controle. Bartoloni et al (2006) investigaram a prevalência de *E. coli* MDR em crianças e detectaram 70% de resistência para cloranfenicol, sendo que apenas o gene *cat* foi detectado em todos os isolados resistentes.

Para os outros genes associados a resistência ao cloranfenicol foram detectados: *floR* em 10,2% no grupo controle e 4,2% no com antibióticos; e *cmlA* que apresentou maior porcentagem no grupo com antibioticoterapia (49%) em comparação ao grupo controle (14,3%); obteve-se associação desse gene tanto para os isolados sensíveis quanto para os resistentes. Mosquito et al (2012) detectaram em *E. coli* comensal o gene *cat* em 70% e o gene *floR* em 30% dos isolados, corroborando com nossos dados.

Para aminoglicosídeos, o gene *aac* teve maior detecção no grupo com antibióticos (53%) que no grupo controle (6%), e foi associada a presença desse gene nos isolados sensíveis em ambos os grupos. O gene *ant* foi detectado em todas as cepas do grupo controle (100%) e em 83% do grupo com antibióticos, e também foi encontrada associação com a presença desse gene nos isolados sensíveis dos grupos avaliados. Da mesma forma, Soleimani et al., (2014) detectaram, em isolados de *E. coli* de ITU, a presença do gene *ant* (78,8%) seguido do gene *aac* (47,8%).

Em relação as quinolonas, o gene *qnrB* apresentou porcentagens semelhantes tanto no grupo controle (10,2%) como no grupo com antibióticos (10,6%). Viana et al., (2013) reportou isolados resistentes para quinolonas e encontraram em *E. coli* apenas duas cepas com a presença dos genes *qnrB* e *qnrS*. Diversos estudos realizados em todo o mundo têm demonstrado a baixa prevalência

de genes *qnr* particularmente entre isolados de *E. coli* em comparação com outras *Enterobacteriaceae* (VIANA et al., 2013; ZURFLUH et al., 2014; YANG et al., 2014).

Para os genes de nitrofurantoína *nfsA* e *nfsB,* o grupo controle apresentou uma porcentagem mais alta (*nfsA* 98%) e (*nfsB* 59%) que o grupo tratado com antibióticos (*nfsA* 66%) e (*nfsB* 23,4%); houve uma associação dos genes nos isolados resistentes para nitrofurantoína. Sandegren et al., (2008) avaliaram isolados de *E. coli* de ITU dos quais apresentavam elevada resistência para nitrofurantoína, e observaram que todos os isolados resistentes apresentaram os genes *nfsA* e *nfsB*, entretanto os dados sobre prevalência de resistência para nitrofurantína são escassos e sua utilização na clínica humana foi substituída por outras drogas.

A diversidade de *E. coli* é frequentemente avaliada por ferramentas laboriosas e de alto custo como: sorotipagem, *Multilocus Sequence Typing* (MLST), *Pulse Field Gel Electrophoresis* (PFGE). No entanto existem técnicas para tipagem mais simples como PCR multiplex para os grupos filogenéticos de *E. coli* (CLERMONT et al., 2000), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) e *Arbitrary Primer*-PCR (AP-PCR), *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR) que são menos trabalhosas e apresentam baixo custo, permitindo a análise de maior número de cepas (ERIBE; OLSEN, 2000; RAMAZANZADEH et al., 2013).

A análise da diversidade genética por AP-PCR mostrou boa discriminação entre os nossos isolados. A utilização dessa técnica diferencia diversos polimorfismos facilitando a comparação clonal através da similaridade genética dos microrganismos (ABILDGAARD et al., 2009; WILLIAMS et al., 1990).

No grupo controle foram verificados 14 grupos genéticos com 85% de similaridade. Desses, foi observado 10 agrupamentos abrigando mais de uma cepa com 100% de similaridade. O grupo tratado com antibióticos apresentou 24 grupos genéticos com 86% de similaridade. Desses, pôde ser observado apenas 2 agrupamentos abrigando mais de uma cepa com 100% de similaridade.

É interessante observar que não houve separação entre as cepas de *E. coli* comensal e diarreiogênicas em ambos os grupos avaliados, e que os clones encontrados foram sempre associados entre *E. coli* comensal e DEC, entretanto o perfil de resistência apresentou-se semelhante entre os agrupamentos.

No grupo controle houve maior número de agrupamentos em relação ao grupo com antibióticos, entretanto ambos demonstram elevada diversidade genética provavelmente por serem amostras de crianças sem diarreia e pertencentes a

microbiota residente. E apesar dos diversos genes de resistência detectados e dos perfis de susceptibilidade não foi possível fazer a associação desses fatores com os agrupamentos e que provavelmente outro fator não avaliado (mecanismo de resistência, fator de virulência ou mesmo fisiológico) tenha sido determinante nesta distinção.

Amaya et al., (2001) avaliaram as relações epidemiológicas de isolados *E. coli* comensal e DEC em crianças com e sem diarreia por RAPD. Os agrupamentos formados foram distintos entre as cepas. Entretanto houve apenas um agrupamento entre uma *E. coli* comensal e uma EAEC nas crianças com diarreia que apresentavam o mesmo padrão de genes de resistência, e dois padrões entre uma *E. coli* comensal e uma EAEC nas crianças sem diarreia que também apresentavam padrões semelhantes. Em outro estudo sobre diversidade por RAPD com cepas de *E. coli* resistentes e sensíveis verificaram que houve separação entre as cepas de acordo com o fenótipo (BAILEY et al., 2010).

Ramazanzadeh et al., (2013) avaliaram a diversidade genética por ERIC-PCR de 230 isolados de *E. coli* de ambientes hospitalares e observou 205 padrões diferentes sendo que 81,3% apresentaram perfil único e apenas 18,7% apresentaram 100% de similaridade, mostrando a alta diversidade genética dos isolados de *E. coli*.

Estudo sobre filogenia de cepas de *E. coli* utilizando a técnica de AP-PCR são escassos, mas esse método é comumente utilizado para diversos microrganismos como: *Bacteroides* spp., *Clostridium perfringens, Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* (AVILA-CAMPOS et al., 2006; KAPLAN et al., 2002; LLANCO et al., 2015; NAKANO et al. 2007).

Assim, este estudo demonstra as alterações qualitativas e quantitativas ocasionadas pelo uso de antimicrobianos nas populações bacterianas da microbiota residente intestinal, como diminuição do número de microrganismos e a elevada prevalência de cepas MDR. Além disso, foi observada a presença de DEC nessas amostras lembrando que são de pacientes assintomáticos, e como as cepas de *E. coli* comensais, apresentaram diversos padrões de resistência e alta diversidade genética.

Desta forma, a magnitude do problema da resistência aos antimicrobianos é de urgente necessidade de vigilância e controle. Métodos baratos e sensíveis para monitorar a resistência em bactérias comensais podem ser ferramentas valiosas,

estudos de vigilância são também importantes para melhorar a eficácia das intervenções de controle da resistência, além do uso correto e da conscientização dos profissionais da saúde e da população.

6 CONCLUSÕES

Com os dados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

1. Através do qPCR foi observada a redução no número de cópias por gramas/fezes de: *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Methanobrevibacter smithii* e *Firmicutes* nas amostras das crianças que utilizaram antibióticos em relação ao grupo controle, exceto para *Lactobacillus* spp. e *Parabacteroides distasonis* que apresentaram uma quantificação maior no grupo antibiótico.

2. Das amostras avaliadas tanto o grupo controle como o com antibióticos apresentaram alta taxa de isolamento de *E. coli*.

3. Em relação à presença de DEC foram identificadas no grupo controle: EAEC atípica, EAEC típica, EPEC atípica, ETEC-LT, STEC *stx1* e STEC *stx2*; e no grupo com antibióticos detectou-se EPEC e EAEC atípica.

4. Foi observada resistência para diversas drogas no grupo controle exceto para ciprofloxacina, meropenem e tigeciclina. Em contrapartida, o grupo tratado com antibióticos apresentou alta resistência para todas as drogas avaliadas; caracterizando as cepas desse estudo como MDR.

5. Todos os isolados do grupo controle e antibióticos possuíram diversos genes de resistência, entretanto o gene bla_{KPC} foi o único não detectado em isolados do grupo controle.

6. A análise da diversidade genética por AP-PCR mostrou boa discriminação entre os isolados No grupo controle foram verificados grupos genéticos com 85% de similaridade e no grupo com antibióticos com 86%. Entretanto ambos os grupos demonstram a elevada diversidade genética desta espécie.

REFERÊNCIAS*

ABILDGAARD, L. In vitro production of necrotic enteritis toxin B, NetB,by netB positive and netB negative *Clostridium perfringens* originatinf from healthy and diseased broiler chickens. **Vet. Microbiol.,** v. 144, p. 231-235, 2009.

ADLERBERTH, I; WOLD, A. E. Establishiment of the gut microbiota in Western infants. **Acta.Pediatr**., v.98, p.229-238, 2009.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico**. Brasilia, 2007. Disponivel em:<http//:www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/pop.mecanismo.htm >. Acesso em :24 fev.2015.

ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post antibiotic era? **Arch. Med. Res.,** v. 6, p. 697-705, 2005.

ALDRED, K. J. et al. Mechanism of quinolone action and resistance. **Biochemistry,** v.53, p.1565-1574, 2014.

ÁLVAREZ, V. R. et al. Intestinal microbiota, immune system and obesity. **Rev.Cub. Invest. Biom.,** v.29, p.364-397, 2010.

AMAYA, E. et al. Antibiotic resistance patterns of intestinal *Escherichia coli* isolates from Nicaraguan children. **J. Med. Microbiol.,** v. 60, p. 216–222, 2011.

ANTONOPOULOS, D.A. et al. Repoducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. **Infect. Immun**.,v. 77, p. 2367-2375, 2009.

ARANDA, K.R.S.et al. Evaluation of Multiplex PCRs for Diagnosis of Infection with Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J. Clin. Microbiol**., v. 42, n.12, p. 5849–5853, 2004.

ARANDA, K.R.S. et al. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 267, p.145–150, 2007.

ARENAS-HERNÁNDEZ, M.M. et al. Clinical implications of enteroadherent *Escherichia coli*. **Curr. Gastroenterol. Rep.,** v. 14, p. 386-394, 2012.

ARRIETA, M.C. et al. The intestinal microbiome in early life: health and disease. **Front. Immunol.,** v. 5, p.427, 2014.

ASHRAF, R; SHAH, N. P. Review Article Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. **Int. Food Res. J**., v.18, p. 837-853, 2011.

---

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e *documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.*

AVILA-CAMPOS, M.J. et al. Genetic diversity of oral *Fusobacterium nucleatum* isolated from patients with diferente clinical conditions. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo., v. 48, p. 59-63, 2006.**

BACKHED, F. et al. Host-bacterial mutualismin the human intestine. **Science**, v. 307, p.1915–1920, 2005.

BARBOSA, F.H.F. et al. Microbiota indígena do trato gastintestinal. **Rev. Biol. Ciên. da Terra**., v.10, p.78-93, 2010.

BARTOLONI, A. et al., Multidrug-resistant Commensal *Escherichia coli* in children, Peru and Bolivia. **Emerg. Infec. Dis.,** v. 12, p. 906-913, 2006.

BASSETTI, M. et al. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob**., v.28, p. 12:22, 2013.

BAILEY, J.K, et al. Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. **J. Med. Microbiol.,** v. 59, p.1331–1339, 2010.

BENGMARK, S**.** Ecological control of the gastrointestinal tract: the role of probiotic flora. **Gut**, v.42, p. 2-7, 1998.

BERGAN, J. et al. Shiga Toxin. **Toxicon**, v. 60, p.1085-1087, 2012.

BERTIN, J. et al. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. **J. Clin. Microbiol.,** v. 39, p. 3060-3065, 2001.

BERVOETS, L. et al. Differences in gut microbiota compositiom between obese and lean children: a cross-sectional study. **Gut Pathog.,** v.5, p. 10, 2013.

BEZIRTZOGLOU, E**.** The intestinal microflora during the first weeks of life. **Anaerobe**, v.3, p. 173-177, 1997.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Rev. Microbiol.,** v. 13, p. 42-51, 2014.

BONACORSI, S; BINGEN, E. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. **Int. J. Med. Microbiol.,** v. 295, p. 373-381, 2005.

BONKOUNGOU, I.J.O. et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* detected by 16-plex PCR in children with and without diarrhoea in Burkina Faso. **Clin. Microbiol. Infec.,** v. 18, p. 901-906, 2012.

BRUMBAUGH AR, MOBLEY HL. Preventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. **Expert. Rev. Vaccines**, v. 11, p. 663-676, 2012.

BUERIS, V. et al**.** Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 102, p. 839-844, 2007.

BUSH, K. et al. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob. Agents Chemother.,** v.6, p.1211-1233, 1995.

BUFFIE, C. G; PAMER. E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. **Nat. Rev. Immunol.,** v. 13, p. 790-801, 2013.

BUSH, K; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.,**v. 54, p. 969-976, 2010.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological expansion, structural studies and clinical challenges of new β-lactamases from gram-negative bactéria. **Annu. Rev. Microbiol.,** v. 65, p. 455-478, 2011.

CETINKAYA, Y. et al. Vancomicin-resistant enterococci. **Clin. Microbiol.Rev.,** 13, p. 686-707, 2000.

CIVARDI, E. et al. Enteral nutrition and infections: the role of human milk. **Early Hum. Dev.,** v. 90S1, p. S57-S59, 2014.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes.,** v. 3, p. 71-87, 2012.

CLERMONT O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Env. Microbiol. Rep.,** v.5, p. 58-65, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE**.** Performace standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-third information supplement. **CLSI document** M100-S23, USA, 2013.

COLLINS, M. D. et al. The phylogeny genus *Clostridium:* proposal of five new genera and eleven new species combinations. **Int. J. Syst. Bacteriol**., v. 44, p. 812-826, 1994.

COX, L.M.; BLASER, M.J. Pathways in Microbe-Induced Obesity. **Cell Metab.**, v. 17, p.883-894, 2013.

CROSWELL, A. et al. Prolonged Impact of Antibiotics on Intestinal Microbial Ecology and Susceptibility to Enteric *Salmonella* Infection. **Infect. Immun.,** v. 77, p. 2741–2753, 2009.

CROXEN, M.A; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev.,** v.8 , p. 26-38, 2010.

DAVIES, J; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.,** v. 74, p. 417-433, 2010.

DE GREGORIS, T. B.et al. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. **J. Microbiol. Methods**, v. 86, p. 351–356, 2011.

DE La COCHETIERE, M.F. et al. Resilience of the Dominant Human Fecal Microbiota upon Short-Course Antibiotic Challenge. **J. Clin. Microbiol.,** v.43, p. 5588-5592, 2005.

DERMOUMI H. L; ANSORG, R. A. Isolation and antimicrobial susceptibility testing of fecal strains of the archae on *Methanobrevibacter smithii*. **Chemotherapy,** v.47, p. 177–183, 2001.

DiGIULIO, D.B. et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. **PLoS one.,** v. 3, p. e3056, 2005.

DRIDI, B. et al. The antimicrobial resistance pattern of cultured human methanogens reflects the unique phylogenetic position of *Archaea*. **J. Antimicrob. Chemother**. v.66, p.1-7, 2011.

DOMÍNGUEZ, E. et al. Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from healthy children in Spain. **Microb. Drug Resist**., v. 8, p. 321–327, 2002.

ERB, A. et al. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli:* overview of geographical, temporal, and methodological variations. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.,** v. 26, p. 83–90, 2007.

FANARO, S. et al. Intestinal microflora in early infancy: composition and development.**Acta Paediatr. Suppl.,** v.91, p.48-55,2003.

FERNANDES, M. R. et al**.** Presence of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* in an asymptomatic child. **J. Med. Microbiol. Case Reports.,** v. 1, p. e000001-e 000003, 2014.

FERRARI, R. et al., Plasmid-mediated quinolone resistance by genes qnrA1 and qnrB19 in *Salmonella* strains isolated in Brazil. **J. Infect. Dev. Ctries.,** v. 5, p. 496-498, 2011.

FLECKENSTEIN, J. M. et al. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. **Microbes Infect**., v. 12, p 89-98, 2010.

FOUHY, F. et al. A degenerate PCR-based strategy as a means of identifying homologues of aminoglycoside and β-lactamresistance genes in the gut microbiota. **BMC Microbiol.,** v. 5, p. 14:25, 2014.

FUNKHOUSER, L.J., BORDENSTEIN, R.S. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. **PLoS Biol.,** v.11, p.e1001631, 2013.

GALES, A. C et al. Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum beta-lactamase (ESBL) Isolated in Hospitals in Brazil. **Braz . J. Infect. Dis.,** v. 1, p. 196-203, 1997.

GALES, A. C. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of na epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeuruginosa* producing SPM metallo-β-lactamses. **J. Antimicrob. Chemeoth.,** v. 52, p. 699-702, 2003.

GARCIA, P. G. et al. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic *E. coli* in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. **J. Microbiol.,** v. 49, p. 46-52, 2011.

GUARDABBASI, L.C. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. 2006.In: AARESTRUP, F.M (ed.) **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.** Washigton, D.C.: American Society for Microbiology, p. 326-333, 2006.

GOMES, T.A.et al. Adhesin-encoding genes from shigatoxin-producing *Escherichia coli* are more prevalente in atypical than in typical enteropathogenic *E. coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, p. 3334-3337, 2011.

GONSALBES, M.J. et al. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bactéria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. **Clin. Exp. Allergy,** v. 43, p. 198-211, 2013.

HASCOET, J. M. et al. Effect of formula composition on the development of infant gut microbiota.**J. Pediatr. Gastroenterol.Nutr**., v.52, p.756-762, 2011.

HILL, M.J; Drasar, B.S. The normal colonic bacterial flora. **Gut**, v.16, p.318-323, 1975.

HUANG, D.B. et al. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli.* **J. Med. Microbiol.,** v. 55, p. 1303-1311, 2006.

HUOVINEN, P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. **Clin. Infec. Dis.,** v. 32, p. 1608-1614, 2001.

HUYS, G, et al., *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens Bangladeshi children. Int. **J.Syst. Evol. Microbiol.,** v.53, p. 807-810, 2003.

IDSA, Infectious Diseases Society of America. et al. Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives. **Clin. Infect. Dis.,** v.5, p.S397-428, 2011.

ISERI, L. et al. The prevalence of Enterotoxigenic *E. coli* from the stools of children aged 0-10 years with diarrhea in Mid –Anatolia region, Turkey. **Braz. J. Microbiol**., v.42, p. 243-247, 2011.

HOLZAPFEL, W.H. et al. Overview a gut flora and probiotics. **Int. J. Food Microbial.,** v.41, p.85-101, 1998.

JACOBY, G.A. AmpC beta-lactamases. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 22, p. 161-182, 2009.

JAKOBSSON, H.E. et al. Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. **PLoS One,** v. 5, p. e9836, 2010.

JERNBERG, C. et al. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. **Microbiology,** v. 156, p. 3216-3223, 2010.

JIMENÉZ, E. et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. **Curr. Microbiol.,** v. 51, p. 270-274, 2005.

JOHNSON JR, RUSSO TA. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli***. Int. J. Med. Microbiol**., v. 295, p. 383-404, 2005.

KANG, S. et al. Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's diseases patients as revealed by a custom phylogenetic microarray. **Inflamm. Bowel.Dis.**, v.16, p. 2034-2042, 2010.

KAPER, J.B. et al. Pathogenic *Escherichia coli.* **Nature**, vol.2, p. 123-140, 2004.

KAPLAN, J. B. et al. Population Structure and Genetic Diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Strains Isolated from localized Juvenile Periodontitis Patients. **J. Clin. Microbiol.,** v. 40, p. 1181–1187, 2002.

KLEESSEN, B. et al. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. **Microbiol. Ecol. Health Dis**., v. 2, p. 53-63, 2000.

KOVATCHEVA-DATCHARY, P. et al. Tools for the tract: understanding the functionality of the gastrointestinal tract. **Therap. Adv. Gastroenterol.,** v. 2, p. 9-22, 2009.

LEE, D.H. et al. Quantitative Detection of Residual *E. coli* Host Cell DNA by Real-Time PCR. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.20, n.10, 1463–1470, 2010.

LIN, H. C. et al. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth infants. **Pediatrics,** v.3, p. 1-4, 2005.

LINCOPAN, N. et al. Enterobacteria producing extend-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Braziliand hospitals**. J. Med. Microbiol.,** v. 55, p. 1611-1613, 2006.

LINKEVICIUS, M. et al. Mechanisms and fitness costs of tigecycline resistance in *Escherichia coli.* **J. Antimicrob. Chemother.,** v; 68, p. 2809-2819, 2013.

LIVERMORE, D.M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 557-584, 1995.

LLANCO, L. A. et al. Sialidase Production and Genetic Diversity in *Clostridium perfringens* Type A Isolated from Chicken with Necrotic Enteritis in Brazil. **Curr. Microbiol.,** v. 70, p. 330–337, 2015.

LOZER, D. M. et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infect. Dis.,** v. 13, p. 418-423, 2013.

MAGALHÃES, J. G. et al. The intestinal ephitelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. **Semin. Immunol.,** v. 19, p. 106-115, 2007.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin. Microbiol. Infect.,** v. 18, p. 268-281, 2012.

MALINEN, E. et al. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. **Microbiology**, v.149, p. 269-277,2003.

MENG, H. Body Weight Selection Affects Quantitative Genetic Correlated Responses in Gut Microbiota. **PLoS One,** v.9, p. e89862, 2014.

MOLES, L. et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the firstmonth of life. **PLoS one**, v.8, p. e66986, 2013.

MONIRA, S. et al. Gut microbiota of healthy and malnourished children in Bangladesh. **Front. Microbiol**., vol.2, p. 228-232, 2011.

MOREDO, F.A; VIGO, G.B; CAPPUCCIO, J.A; PINEYRO, P; PERFUMO, C.J; GIACOBONI,G.I. Resistencia a lós antimicrobianos de aislamientos de *E. coli* obtenidos de credos de La Republica Argentina. **Rev. Arg. Microbiol**.,v.39, p. 227-229, 2007.

MOREIRA, M.A.S. et al. Multidrug efflux system in gram-negative bacteria. **Brazilian J.Microbiol.,** v.35, p. 19-28, 2004.

MORIN, N. et al. Characterization of the AggR Regulon in Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.,** v.81, p. 122-132, 2013.

MOSQUITO, S. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from children. **Int. J. Antimicrob. Agents**., v.40, p. 544–548, 2012.

MULVEY, M. R. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? **CMAJ.,** v. 180, p. 408-415, 2009.

NAKANO, V. et al. *bft* gene subtyping in enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* isolated from children with acute diarrhea. **Anaerobe,** v.13, p. 1–5, 2007.

NAKANO, V. et al. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal *Bacteroidales*. **Clinics,** v.66, p. 543–547, 2011.

NATARO, J.P; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli.* **Clin. Microbiol. Rev.,** v.11, p. 142-201, 1998.

NAVANEETHAN, U.; GIANNELLA, R.A. Mechanisms of infectious diarrhea**. Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 11, p. 637-647, 2008.

NUNES, M. R. et al Attaching and effacing *Escherichia coli* and Shiga toxin producing *E. coli* in children with acute diarrhoea and controls in Teresina/PI, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, p. 43-47, 2012.

NICOLI, J.R. Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings. **Enferm. Infec. Microbiol**., v. 15, p. 183-190, 1995.

NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. **Gastroenterology,** v. 1, p. 1037-1047, 2004.

NIKAIDO, H; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochim. Bioph. Acta**., v. 1794, p. 769–781, 2009.

NORD, C.E; EDLUND, C. Ecological effect of antimicrobial agents on the human intestinal microflora. **Microbiol. Ecol. Health Dis**., v. 4, p.193-207, 1991.

OHARA, J. A. et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Escherichia coli*: occurrence of ST131-fimH30 subclone harboring pKpQIL-like IncFIIk plasmid. **Antimicrob. Agents Chemother.,** v. 58, p. 4234-4237, 2014.

PAGÈS, J.M. et al. Inhibitors of efflux pumps in gram-negative bacteria. **TRENDS Molec. Med.,** v.11, p. 382-389, 2005

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PloS Biol**., v. 5, p. 1556-1573, 2007.

PANDA, S. et al. Short-Term Effect of Antibiotics on Human Gut Microbiota. **PLoS One,** v.9, p. e95476, 2014.

PAVEZ, M. et al. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC *β*-lactamase in Brazil. **J. Medical Microbiol.,** v.57, p. 1590-1592, 2008.

PEIRANO, G. et al. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. **J. Antimicrob. Chemother**., v. 58, p. 305-309, 2006.

PEIRANO, G. et al. Global incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* ST131. **Emerg. Infect. Dis.,** v. 20, p. 1928-1931, 2014.

PEIRANO, G; PITOUT, J. D. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. **Int. J. Antimicrob. Agents.,** v. 35, p. 316-321, 2010.

PENDERS, J. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early **Pediatrics**, v.118, p. 511-521, 2006.

PÉREZ-COBAS, A. E. et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. **Gut,** v. 62, p. 1591–1601, 2013.

PIDDOCK, L.J.V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 19, p. 382-402, 2006a.

PIDDOCK, L.J.V. Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance. **Nat. Rev. Microbiol.,** v.4, p. 629-636, 2006b.

POETA, P. et al. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. **Inter. J. Antimicrobial. Agents.,** v. 27, p. 131-137, 2006.

PONNUSAMY, K. et al. Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces. **J. Med. Microbiol**., v. 60, p. 817–827, 2010.

PORRES-OSANTE, N. et al. Emergence of a multiresistant KPC-3 and VIM-1carbapenemase-producing *Escherichia coli* strain in Spain. **J. Antimicrob. Chemother**., v. 69, p. 1792–1795, 2014.

POWERS, J.H. Antimicrobial drug development- the past, the present and the future.**Clin. Microbiol. Infec**., v.62, n.4,p. 23-31, 2004.

PHILLIPS, I. et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **J. Amicrob. Chemother.**, v.53, n.1, p.28-52.

QUEIROZ, M. L. et al. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases, antimicrobial resistance genes, and plasmid contente in *Escherichia coli* isolates from diferente sources in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.,** v. 74, p. 91-94, 2012.

RAFII, F. et al. Effect of treatment with antimicrobial agents on the human colonic microflora. **Therap. Clin. Risk Manag.,** v. 4, p. 1343-1347, 2008.

RAMAZANZADEH, R. et al. Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)–PCR technique in Sanandaj hospitals. **Iranian J. Microbiol.,** v.5, p. 126-133, 2013.

RILEY, T.V. From obscurity to ‘superbug’: the rise of *C. difficile*. **Heath Infect**., v.15, p. 59-61, 2010.

ROBERTS M. C**.**Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.19, p. 1-24, 1996.

ROCHA, D. P. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Quim. Nova.,** v. 34., p. 111-118, 2011.

RUSSELL, D.A. et al. Metabolic activies and probiotic potential of bifidobacteria**. Inter.J. Food Microbiol**.,v. 149, p. 88-105, 2011.

SAAVEDRA, M; B; DATILLO, A. M. Early development of intestinal microbiota: implications for future health. **Gastroenterol. Clin. North. Am.,** v.41, p. 717-731, 2012.

SADER, H.S. et al. Cefdinir activity against contemporary North American isolates from community- acquired urinary tract infections. **Int. J. Antimicrob. Agents.,** v. 25., p. 89-92, 2005.

SÁENZ, Y. **Caracterizacion fenotipica y genotipica de la resistencia a antibioticos en cepas de *Escherichia coli* no patogenas de alimentos y de la microflora intestinal de humanos y animales.** 2004. 89 p. Dissertacion de Doutoramento na area de Bioquimica e Biologia Molecular. Universidade de La Rioja, 2004.

SÁEZ-LLORENS, X. et al. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. **Pediatr Infect Dis J.,** v. 19, p. 200-206, 2000.

SAMB-BA, B. et al. MALDI-TOF Identification of the Human Gut Microbiome in People with and without Diarrhea in Senegal. **PLoS One**, v.9, p. e87419,2014.

SANDEGREN, L. et al. Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli.* J. Antimicrobial Chemoth., v. 62, p. 495–503, 2008.

SARANTUYA, J. et al. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **J Clin. Microbiol.,** v.42, p.133-139, 2004.

SATAKORI, S. et al., *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta. **Lett. Appl.Microbiol**., v. 48, p. 8-12, 2009.

SCALETSKY, I. C. et al. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in Young children in Northeast Brazil: a case-control study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 645-648, 2002.

SEFTON, A. M. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millenium. **Drugs,** v. 62, p. 557-566, 2002.

SEPP, E. et al. The occurrence of antimicrobial resistance and class 1 integrons among comensal *Escherichia coli* isolates from infants and elderly persons. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.,** v.8, p. 34, 2009.

SETHABUTR, O. et al. Detection of Shigellae and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen HDNA sequence in patients with dysentery. **J. Infect. Dis**.,v.167, p.458-61,1993.

SILVA, K; LINCOPAN, N. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: clinical impact and implications for agribusiness. **Bras. Patol. Med. Lab.,** v. 48, p. 91-99, 2012

SIRAGUSA, G.R. et al. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one-to three week old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic free vegetables based diets. **J. App. Microbiol**., v. 102, p.1138-1149, 2007.

SHAW, K.J. ET AL. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. **Microbiol. Rev**., v. 57, p. 138–163, 1993.

SHEN, J. et al. The gut microbiota,obesity and insulin resistance. **Mol. Aspects. Med.** v.34, p. 39-58, 2013.

STEWART, J.A. et al. Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microbiota of children. **J. Med. Microbiol**., v.54, p. 1239-1242, 2005.

SOLEIMANI, N. et al. Frequency distribution of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes in uropathogenic *E. coli* isolated from Iranian hospital. **BMC Res. Notes**, v. 7, p. 842-847, 2014.

SPELLBERG, B. et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.,** v. 46, p.155-164, 2008.

TANNOCK, G.W. Molecular assessment of intestinal microflora. **Am. J. Clin. Nutr**., v. 73, p. 410S-414S, 2001.

TOIVANEN, P. et al. Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora. **Infect. Immun**., v.69, p. 2372-2377, 2001.

TONG, J.et al. Application of quantitative real-time PCR for rapid identification of *Bacteroides fragilis* group and related organisms in human wound samples. **Anaerobe**, v.17, p. 54-68, 2011,

VAN DER WAAIJ, L.A et al. Bacterial populations analysis of human colon and terminal ileum biopsies with 16S rRNA based fluorescent probes: commensal bacteria live in suspension and have no direct contact with epithelial cells. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.11, p. 865-871, 2005.

VAN HOEK, A. H. et al. Acquired antibiotic resistance genes: na overview. **Front. Microbiol.,** v.2, p.203, 2011.

VASCONCELOS, F. Perfil de resistência antimicrobiano de *E. coli* isoladas do açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, p. 405-410, 2010.

VIANA, A.L.M. Extended-spectrum b-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil carry distinct types of plasmid-mediated quinolone resistance genes. **J. Med. Microbiol.,** v.62, p. 1326-1331, 2013.

VIDAL, J.E. et al. Patogénesis molecular, epidemiologia y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. **Salud Publica Mex**.,v. 49, p.376-386, 2007.

XAVIER, B. B. et al. Complete Genome Sequences of Nitrofurantoin-Sensitive and-Resistant *Escherichia coli* ST540 and ST2747 Strains. **Genome Announc.**, v. 2, p. e00239-14, 2014.

ZOETENDL, E.G. et al. DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. **Syst. Appl. Microbiol.,** v.24, p.405-410,2001.

ZURFLUH, K. et al. Quinolone Resistance Mechanisms among Extended- Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* Isolated from Rivers and Lakes in Switzerland. **PLoS One,** v. 9, p. e95864, 2014.

WALSH, C. Antibiotics that block DNA replication and repair: the quinolones. In: ___ (Ed.). **Antibiotics: Actions, origins, resistance**. Washigton DC:. American Society for Microbiology, 2003.

WANG, R.F. et al. PCR detection and quantification of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. **App. Envir.Microbiol.,** v.4, p.1242-1247,1996.

WEBBER, M.A; PIDDOCK, L.J.V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **J. Antimicrobial Chemother.,** v.51, p. 9-11, 2003.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **J. Med. Microbiol.,** v. 56, p. 4-8, 2007.

WEXLER, H.M. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. **Clin. Microbiol. Rev**., v.20, p. 593-621, 2007.

WIEDEMANN, B.; HEISIG, P. Mechanisms of quinolone resistance. **Infection,** v. 22, p. 73–79, 1994.

WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, vol. 18, p. 6531-6535, 1990

WINKLER, P. et al. Molecular and cellular basis of microflora host interactions. **J. Nutr**., v.137, p. 756S-772S, 2007.

WOERTHER, P.L. et al. Trends in human fecal carriage of extended-β-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 26, p. 744-758-,2003.

WRIGHT, G. D. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. **Can. J. Microbiol**. v. 60, p.147-54, 2014.

WOLOWCZUK, I. et al. Feeding Our Immune System: Impact on Metabolism. **Clin. Devol. Immuol**., v. 639803, p. 1-19, 2008.

WOO, P.C.Y. et al. Facilitation of horizontal transfer of antimicrobial resistance by transformation of antibiotic-induced cell-wall-deficient bactéria. **Med. Hypotheses**, v. 61, p. 503–508, 2003.

YANG, T. et al., The association between occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance and ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolates of different origins. **Vet. Microbiol.,** v. 170, p. 89–96, 2014.

YOON, S. S. et al. Functional genomic and metagenomic approaches to understanding gut microbiota–animal mutualismo. **Curr. Opin. Microbiol**., v. 24, p. 38-46, 2015.

APÊNDICES

Apêndice A. Características gerais das amostras analisadas dos grupos controle (C) e antibióticos (A).

Crianças	Isolados	Origem	Sexo	Idade	Antimicrobianos
C1	1 EAEC, 1 comensal	Escola Privada	M	9 anos	-
C2	3 Comensais	Escola Privada	F	8 anos	-
C3	-	Escola Privada	F	4 anos	-
C4	2 Comensais	Escola Privada	F	10 anos	-
C5	1 ETEC-LT	Escola Privada	F	3 anos	-
C6	-	Escola Privada	F	3 anos	-
C7	2 EAECa	Escola Privada	F	8 anos	-
C8	-	Escola Pública	F	7 anos	-
C9	1 Comensal	Escola Pública	M	10 anos	-
C10	2 EPECa	Escola Pública	F	8 anos	-
C11	1 EAECa, 1 comensal	Escola Pública	M	7 anos	-
C12	1 Comensal, 1 STEC, 1 EPECa	Escola Privada	F	10 anos	-
C13	1 EAECa	Escola Privada	M	3 anos	-
C14	1 Comensal	Escola Privada	M	7 anos	-
C15	1 Comensal, 1 EAECa	Escola Privada	F	9 anos	-
C16	-	Escola Pública	F	8 anos	-
C17	2 Comensais	Escola Pública	M	6 anos	-
C18	1 Comensal	Escola Pública	F	3 anos	-
C19	3 Comensais	Escola Pública	F	4 anos	-
C20	2 Comensais	Escola Pública	F	9 anos	-
C21	1 Comensal	Escola Privada	M	8 anos	-
C22	1 Comensal	Escola Pública	F	9 anos	-
C23	1 Comensal, 1 EAECa	Escola Pública	F	7 anos	-
C24	1 Comensal, 1 EAECt	Escola Pública	F	7 anos	-
C25	2 Comensais, 1 ETEC-LT	Escola Pública	M	9 anos	-
C26	2 Comensais	Escola Pública	M	9 anos	-
C27	1 STEC, 2 comensais	Escola Pública	M	5 anos	-
C28	1 Comensal	Escola Pública	F	9 anos	-
C29	1 Comensal, 1 EAECa	Escola Pública	F	5 anos	-
C30	1 Comensal, 1 EPECa	Escola Pública	M	11 anos	-
A1	2 Comensais	Icr-HCFMUSP	M	4 anos	Ceftriaxona, claritromicina
A2	-	Icr-HCFMUSP	M	10 anos	Penicilina
A3	-	Icr-HCFMUSP	F	7 anos	Teicoplamina, Piperacilina+Tazobactam
A4	1 Comensal, 1 aEPEC	Icr-HCFMUSP	M	11 anos	Ceftriaxona

Continua

Apêndice A. Características gerais das amostras analisadas dos grupos controle (C) e antibióticos (A).

Crianças	Isolados	Origem	Sexo	Idade	Antimicrobianos
A5	1 Comensal	Icr-HCFMUSP	M	11 anos	Cefepime
A6	2 Comensais	Icr-HCFMUSP	M	7 anos	Ceftriaxona
A7	2 Comensais	Icr-HCFMUSP	M	11 anos	Sulfametoxazol+trimetoprima
A8	1 Comensal, 1 aEPEC	Icr-HCFMUSP	M	8 anos	Cefalexina
A9	1 Comensal, 1 aEAEC	Icr-HCFMUSP	M	8 anos	Amicacina, meropenem
A10	-	Icr-HCFMUSP	F	9 anos	Amicacina, meropenem
A11	3 Comensais	Icr-HCFMUSP	F	6 anos	Azitromicina, gentamicina, meropenem
A12	1 Comensal	Icr-HCFMUSP	F	7 anos	Azitromicina, clindamicina, oxacilina
A13	2 Comensais	Icr-HCFMUSP	M	7 anos	Cefepime
A14	2 Comensais	Icr-HCFMUSP	F	7 anos	Ampicilina, cefotaxima
A15	2 Comensais	Icr-HCFMUSP	M	12 anos	Amicacina, azitromicina, meropenem, vancomicina
A16	-	Icr-HCFMUSP	F	6 anos	Cefepime, teicoplamina
A17	-	Icr-HCFMUSP	M	8 anos	Piperacilina+Tazobactam,
A18	2 Comensais	Icr-HCFMUSP	M	5 anos	Etambutol, Isoniazida, pirazinamida,rifampicina,amicacina, linezolida,meropenem
A19	2 Comensais	Icr-HCFMUSP	F	6 anos	Amoxicilina
A20	1 Comensal	Icr-HCFMUSP	F	5 anos	Sulfametoxazol+trimetoprima
A21	2 Comensais	Icr-HCFMUSP	M	11 anos	Sulfametoxazol+trimetoprima
A22	1 Comensal	Icr-HCFMUSP	F	8 anos	Azitromicina, ceftazidima, oxacilina, tobramicina
A23	-	Icr-HCFMUSP	F	7 anos	Ceftriaxona, claritromicina
A24	1 Comensal	Icr-HCFMUSP	F	10 anos	Amicacina, azitromicina, ceftazidima, oxacilina,tobramicina
A25	2 Comensais	Icr-HCFMUSP	M	6 anos	Ceftazidima, cetriaxona
A26	-	Icr-HCFMUSP	F	3 anos	Amicacina, ceftazidima, oxacilina
A27	-	Icr-HCFMUSP	F	3 anos	Ceftriaxona
A28	3 Comensais	Icr-HCFMUSP	M	12 anos	Ceftriaxona, clindamicina
A29	2 Comensais	Icr-HCFMUSP	M	6 anos	Meropenem, teicoplamina
A30	4 Comensais	Icr-HCFMUSP	M	11 anos	Azitromicina, meropenem, sulfametoxazol+trimetoprima
A31	3 Comensais	Icr-HCFMUSP	F	9 anos	Piperacilina+tazobactam, vancomicina, sulfametoxazol+trimetoprima

-: ausência de isolamento; Comensal (*E. coli*); EPECa (*E. coli* enteropatogênica atípica), EAECa (*E. coli* enteroagregativa atípica) EAECt (*E. coli* enteroagregativa típica), ETEC –LT (*E. coli* enterotoxigênica - toxina termolábil), STEC (*E. coli* produtora da toxina de Shiga); F: Feminino; M: Masculino; Icr-HCFMUSP (Instituto da Criança – Hospital das Clinicas – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo).

Apêndice B. Padrão de microrganismos encontrados nas crianças dos grupos controle e antibióticos.

Crianças	Presença de microrganismos no qPCR	Isolamento de DEC
C1	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	EAECa
C2	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
C3	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
C4	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
C5	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	ETEC-LT
C6	Bif,Lac,Bf,Bv,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
C7	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Bact,Firm	EAECa
C8	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
C9	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
C10	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	EPECa
C11	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	EAECa
C12	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	EPECa, STEC-*stx2*
C13	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	EAECa
C14	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
C15	Bif,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Ec,Ms,Bact,Firm	EAECa
C16	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
C17	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
C18	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
C19	Bif,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
C20	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
C21	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Bact,Firm	-
C22	Bif,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
C23	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	EAECa
C24	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	EAECt
C25	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	ETEC-LT
C26	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
C27	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	STEC-*stx1*
C28	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
C29	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	EAECa
C30	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	EPECa
A1	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
A2	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
A3	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
A4	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	EPECa
A5	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
A6	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
A7	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
A8	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	EPECa
A9	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	EAECa
A10	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
A11	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
A12	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
A13	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
A14	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
A15	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Bact,Firm	-
A16	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
A17	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	
A18	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Bact,Firm	-
A19	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
A20	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Bact,Firm	-
A21	Bif,Lac,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Bact,Firm	-
A22	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Bact,Firm	-
A23	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Bact,Firm	-
A24	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Bact,Firm	-
A25	Bif,Lac,Bf,Bv,Pm,Cd,Cp,Ec,Bact,Firm	-
A26	Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Bact,Firm	-
A27	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-
A28	Lac,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Bact,Firm	-
A29	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Bact,Firm	-
A30	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Bact,Firm	-
A31	Bif,Lac,Bf,Bv,Pd,Pm,Cd,Cp,Ec,Ms,Bact,Firm	-

Bif- *Bifidobacterium* spp., Lac-*Lactobacillus* spp, Bf- *B. fragilis*, Bv- *B. vulgatus*, Pd-P. distasonis, Pm-P. merdae, Cd- C. difficile, Cp-C. perfringens, Ec- E. coli, Ms- M. smithii, Bact- Bacteroidetes, Firm- Firmicutes.

-: ausência de isolamento; Comensal (*E. coli*); EPECa (*E. coli* enteropatogênica atípica), EAECa (*E. coli* enteroagregativa atípica) EAECt (*E. coli* enteroagregativa típica), ETEC –LT (*E. coli* enterotoxigênica - toxina termolábil), STEC (*E. coli* produtora da toxina de Shiga).

ANEXO

Case Report

Presence of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* in an asymptomatic child

Miriam Rodriguez Fernandes,[1†] Aline Ignacio,[1†] Fernando H. Martins,[2] Leticia B. Rocha,[2] Roxane M. F. Piazza,[2] Tânia M. I. Vaz,[3] Mario Julio Avila-Campos[1] and Viviane Nakano[1]

[1]Anaerobe Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

[2]Bacteriology Laboratory, Butantan Institute, Brazil, São Paulo

[3]Bacteriology Laboratory, Adolfo Lutz Institute, Brazil, São Paulo

Correspondence
Viviane Nakano
vivinkn@usp.br

Introduction: *Escherichia coli* causes gastroenteritis in humans and animals.

Case presentation: In this study, both Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains were identified in a stool sample from a healthy child, and they were serotyped as Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) ONT : H19 and atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) O37 : H45.

Conclusion: This is the first report, to our knowledge, of a concomitant presence of diarrhoeagenic *E. coli* (DEC) strains in an asymptomatic child. None of the microorganisms was able to produce diarrhoea, maybe because they were transient bacteria or because of the good immune status of the child. Attention should be paid to this result and it could be of interest in vaccine prospects.

Received 11 September 2014
Accepted 21 October 2014

Keywords: aEPEC; asymptomatic child; diarrhoeal; STEC; *stx2e*.

Introduction

Escherichia coli is the major bacterial causative agent of diarrhoea worldwide (Lanata *et al.*, 2013). Based on epidemiological and clinical features, specific virulence determinants and association with certain serotypes, diarrhoeagenic *E. coli* (DEC) can be divided into different pathotypes, enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), diffusely adherent *E. coli* (DAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) (Croxen *et al.*, 2013).

EPEC is a significant cause of diarrhoea-associated mortality, particularly among children under five years of age (Lanata *et al.*, 2013). The central mechanism of EPEC pathogenesis is the ability to produce a characteristic histopathological lesion on the intestinal epithelium, designated attaching and effacing (A/E). This phenotype is elicited by a set of proteins encoded by genes contained in a chromosomal pathogenicity island called locus of enterocyte effacement (LEE). EPEC strains are also divided into typical (tEPEC) and atypical (aEPEC), by bundle-forming pilus (BFP) presence in tEPEC or absence in aEPEC. Epidemiological studies have demonstrated that aEPEC is more prevalent than tEPEC in both developing and developed countries, where aEPEC plays an important role as a causative agent of endemic diarrhoea and gastrointestinal outbreaks (Hernandes *et al.*, 2009).

STEC is frequently associated with gastroenteritis outbreaks with life-threatening complications, such as hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic-uremic syndrome (HUS) (Karch *et al.*, 2005). STEC produces either one or both types of Shiga toxins (Stx1 and Stx2), whose genes are encoded on prophages that are integrated in the chromosome (Schmidt, 2001). Three subtypes of Stx1 (a, c and d) and seven subtypes of Stx2 (a, b, c, d, e, f and g) have been described (Scheutz *et al.*, 2012). In addition to *stx* genes, a subset of STEC strains also carries the LEE pathogenicity island, designated enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), which is frequently associated with severe diseases in humans (Karch *et al.*, 2005).

Abbreviations: aEPEC, atypical enteropathogenic *Escherichia coli*; BFP, bundle-forming pilus; DEC, diarrhoeagenic *E. coli*; LEE, locus of enterocyte effacement; STEC, Shiga toxin-producing *E. coli*.; enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC); enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC).

†These authors contributed equally to this work.

© 2014 The Authors. Published by SGM
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Despite the epidemiological significance of EPEC and STEC as human pathogens, some individuals infected with these pathotypes show no apparent clinical signs of infection (De Moura *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2012). The presence of such pathogens in asymptomatic carriers is a public health concern because they act as reservoirs transmitting the disease throughout the community; however, little information is available about such cases. In this report, we describe the concomitant carriage of aEPEC and STEC by an asymptomatic child.

Case report

Stool specimens were collected from 115 children without diarrhoea aged 3 to 12 years, who were not under antibiotic treatment. Four lactose-fermenting colonies were selected from each sample and further identified as *E. coli* by biochemical assays and PCR amplification of the 16S rRNA gene (Malinem *et al.*, 2003). *E. coli* isolates were screened for the *eae* (attaching and effacing lesions), *bfpA* (bundle forming pilus), *aggR* (enteroaggregative adherence), *ipaH* (enteroinvasive mechanism), *elt* (heat-labile toxin, LT), *est* (heat-stable toxin, ST) and *stx1* and *stx2* (Shiga toxins) genes by multiplex PCR according to the protocol of Aranda *et al.* (2004).

The presence of DEC was detected in 28 (24.3 %) children, 11 (39.3 %) EAEC, 10 (35.7 %) EPEC, 5 (18 %) ETEC and 1 (3.5 %) STEC, but only one ten-year-old child harbored two pathotypes (EPEC and STEC). From the stool samples, four lactose-fermenting *E. coli* were characterized as three colonies were DEC belonging to two different pathotypes, while one was non-DEC. Two isolates showed the genotype *eae*-positive/*bfpA*-negative, and they were identified as aEPEC, and another isolate was *stx2*-positive and classified as STEC. These results were confirmed by simplex PCR using the same primers, and by sequencing of the PCR products. The STEC isolate was *stx2e*-positive as determined by PCR (Scheutz *et al.*, 2012). Serotyping of aEPEC and STEC was performed by standard procedures (Ewing, 1986). Both aEPEC isolates belonged to serotype O37 : H45, and the STEC serotype was ONT : H19. The aEPEC isolates produced intimin (Menezes *et al.*, 2009), but not BFP, as evidenced by immunoblotting (Nara *et al.*, 2010). Stx2e production was confirmed by cytotoxicity and neutralization assays on Vero cells (Mendes-Ledesma *et al.*, 2008). Table 1 summarizes the genotypic and phenotypic characteristics of aEPEC and STEC.

Discussion

Our results show the concomitant presence of EPEC and STEC in a healthy child who was considered as an asymptomatic carrier. The presence of both bacteria was demonstrated by different techniques, including DNA sequencing, and, to our knowledge, this is the first report of the presence of both DEC in the faecal microbiota of a healthy child.

Studies have shown an association between the presence of enteric pathogens and socioeconomic, health and weather conditions, as well as different risk factors, such as inadequate hygiene, childhood habits (nail-biting and thumb-sucking) and close contact with domestic animals (dogs and cats).

Epidemiological data on occurrence, prevalence and distribution of DEC have been performed in patients with diarrhoea; however, little information is available in healthy humans without diarrhoea (Urdahl *et al.*, 2012).

STEC strain O157 : H7 is frequently observed in outbreaks of food-borne disease in humans, and STEC non-O157 has been found in sporadic cases (Reilly, 1998; Caprioli *et al.*, 1997). In this study, a non-typeable STEC, ONT : H19, was found, and it is possible that this strain cannot express its virulence factors in a healthy intestine, mainly in a child displaying good immune condition.

Bonkoungou *et al.* (2012) showed co-infections of different DEC pathotypes in children without diarrhoea, suggesting that it may be difficult to define the exact etiology of diarrhoea in children, since these pathotypes can also be found in asymptomatic children. In Brazil, the presence of EPEC in children with (15.4 %) and without (17.3 %) diarrhoea has been reported (Nunes *et al.*, 2012). EPEC is very common in children with and without diarrhoea, but the aEPEC pathotype is suggested to be commonly found in infants. Our results show the predominance of EAEC (39.3 %) and EPEC (35.7 %).

In this study, we identified the presence of two different pathotypes (aEPEC and STEC) expressing their respective *eae* and *stx* genes in a normal fecal sample of a healthy child. In addition, the presence of aEPEC O37 : H45 is

Table 1. Characteristics of aEPEC and STEC isolated from an asymptomatic child

Isolate	PCR genes	Pathotype	Serotype*	Intimin	BFP	Stx
Ec-1	*eae*	aEPEC	O37 : H45	+	−	NT
Ec-2	*eae*	aEPEC	O37 : H45	+	−	NT
Ec-3	*stx2(e)*	STEC	ONT : H19	NT	NT	+

NT, not tested.
*ONT, non-typeable.

rarely observed in asymptomatic humans (Sakkejha *et al.*, 2013). In animals, STEC (subtype *stx2e*) NT : H19 is of epidemiological significance. Neither microorganism was able to produce diarrhoea in the child we studied, and this suggests other studies on the pathogenicity of DEC pathotypes in children without diarrhoea should be performed. This result suggests that both DEC can be found colonizing the intestinal ecosystem in healthy populations, and it also suggests more studies are needed to better understand their colonization or possible synergistic roles in asymptomatic populations.

The absence of data in the literature showing the presence of STEC harboring the *stx2e* gene in human intestinal microbiota makes it difficult to offer a consistent explanation of their presence in children without diarrhoea. On the other hand, the presence of both EPEC and STEC in a healthy child may represent their presence as transient bacteria, mainly STEC pathotypes that are known to cause specific diseases in animals, such as oedema in pigs and dysentery in calves.

The results suggest that STEC and EPEC can colonize the intestinal tract of healthy individuals at the same time. Thus, better understanding of how this asymptomatic colonization occurs may contribute to avoiding transmission of gastrointestinal diseases.

Acknowledgements

The authors thank Miss Marcia Harumi Fukugaiti for her technical support. This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 158799/2012-7), and by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grant no. 2013/17739-9). The Ethic Committee of the Institute of Biomedical Sciences of the University of Sao Paulo (no. 1058/CEP) approved this study. The authors have no disclosures or conflicts of interest to report.

References

Aranda, K. R. S., Faguendes-Neto, U. & Scaletsky, I. C. A. (2004). Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Clin Microbiol* **42**, 5849–5853.

Bonkoungou, I. J. O., Lienemann, T., Martikainen, O., Dembele, R., Sanou, A. S. T., Siitonen, A., Barro, N. & Haukka, K. (2012). Diarrhoeagenic *Escherichia coli* detected by 16-plex PCR in children with and without diarrhoea in Burkina Faso. *Clin Microbiol Infect* **18**, 901–906.

Caprioli, A., Tozzi, A. E., Rizzoni, G. & Karch, H. (1997). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerg Infect Dis* **3**, 578–579.

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M. & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **26**, 822–880.

De Moura, C., Fregolente, M. C., Martini, I. J., Domingos, D. F., da Silva, E. J., Ferraz, M. M., Gatti, M. S. & da Silva Leite, D. (2012). Prevalence of enteropathogens in normal feces from healthy children at an infant day care in Brazil. *J Infect Dev Ctries* **13**, 176–180.

Ewing, W. H. (1986). Edwards & Edwing's Identification of *Enterobacteriaceae*, 4th edn. New York: Elsevier.

Hernandes, R. T., Elias, W. P., Vieira, M. A. & Gomes, T. A. (2009). An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **297**, 137–49.

Karch, H., Tarr, P. I. & Bielaszewska, M. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol* **295**, 405–418.

Lanata, C. F., Fischer-Walker, C. L., Olascoaga, A. C., Torres, C. X., Aryee, M. J. & Black, R. E. (2013). Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF. Global causes of diarrhea disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *Plos One* **8**, e72788.

Malinem, E., Kassinem, A., Rinttila, T. & Palva, A. (2003). Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5′-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* **149**, 269–277.

Mendes-Ledesma, M. R., Rocha, L. B., Bueris, V., Krause, G., Beutin, L., Franzolin, M. R., Trabulsi, L. R., Elias, W. P. & Piazza, R. M. (2008). Production and characterization of rabbit polyclonal sera against Shiga toxins Stx1 and Stx2 for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* **52**, 484–491.

Menezes, M. A., Rocha, L. B., Koga, P. C., Fernandes, I., Nara, J. M., Magalhães, C. A., Abe, C. M., Ayala, C. O., Burgos, Y. K., Elias, W. P., Castro, A. F. & Piazza, R. M. (2009). Identification of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains by immunoserological detection of intimin. *J Appl Microbiol* **108**, 878–887.

Nara, J. M., Cianciarullo, A. M., Culler, H. F., Bueris, V., Horton, D. S., Menezes, M. A., Franzolin, M. R., Elias, W. P. & Piazza, R. M. (2010). Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of bundle-forming pilus expression. *J Appl Microbiol* **109**, 35–43.

Nunes, M. R. C. M., Magalhães, P. P., Macedo, A. S., Franco, R. T., Penna, F. J. & Mendes, E. M. (2012). Attaching and effacing *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli in children with acute diarrhea and controls in Teresina/PI, Brazil. Trans Royal Soc Trop Med Hygiene* **106**, 43–47.

Reilly, A. (1998). Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections: memorandum from a WHO meeting. *World Health Org Bullet* **76**, 245–255.

Sakkejha, H., Byrne, L., Lawson, A. J. & Jenkins, C. (2013). An update on the microbiology and epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* in England 2010–2012. *J Med Microbiol* **62**, 1531–1534.

Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Pierard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R. & other authors (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* **50**, 2951–2963.

Schmidt, H. (2001). Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res Microbiol* **152**, 687–695.

Urdahl, A. M., Solheim, H. T., Vold, L., Hasseltvedt, V. & Wasteson, Y. (2012). Shiga-toxin encoding genes (*stx* genes) in human faecal samples. *APMIS* **121**, 202–210.