
***Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA (EAEC):
FILOTIPAGEM E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS
EM UM ENTEROPATÓGENO EMERGENTE**

Adriana Hamond Regua-Mangia,¹ Rose Mary Pimentel Bezerra,¹ Carmen Macedo Esparis¹ e Lúcia Martins Teixeira²

RESUMO

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é um enteropatógeno emergente especialmente em países em desenvolvimento. Os mecanismos de virulência das EAEC não estão completamente esclarecidos e o papel dos vários fatores descritos ainda requer investigação. A enteropatogenicidade parece constituir um atributo de certos subgrupos dentro da categoria e a resistência a antimicrobianos tem sido identificada como uma característica relevante entre as EAEC. Estudos filogenéticos têm mostrado que populações de *E. coli* podem ser divididas em quatro grupos principais designados A, B1, B2 e D. O objetivo deste estudo foi o de determinar o grupo filogenético e a resistência a antimicrobianos em isolados de EAEC, obtidos de crianças com e sem diarreia, empregando a reação da polimerase em cadeia e a técnica de difusão em ágar. A filotipagem revelou a população bacteriana distribuída nos grupos filogenéticos A (65,8%), D (20,7%), B1 (9,7%) e B2 (3,6%). A resistência a antimicrobianos foi observada em 65,9% das EAEC e o fenótipo de multiresistência foi detectado, preferencialmente, nos isolados provenientes de crianças com diarreia e pertencentes aos grupos filogenéticos A e D. Os dados obtidos contribuem para o conhecimento dos aspectos genético-epidemiológicos destes enteropatógenos circulantes em nosso meio.

DESCRITORES: *Escherichia coli* enteroagregativa. Resistência a antimicrobianos. PCR. Filotipagem. Virulência.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é reconhecida como um enteropatógeno emergente em razão de seu crescente envolvimento com a doença

1 Departamento de Ciências Biológicas, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

2 Departamento de Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

Endereço para correspondência: Adriana Hamond Regua Mangia, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Departamento de Ciências Biológicas, Rua Leopoldo Bulhões, 1480, CEP 21041-210, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil. E-mail: regua@ensp.fiocruz.br

Recebido para publicação em: 20/10/2008. Revisto em: 6/3/2009. Aceito em: 20/3/2009.

diarreica aguda e persistente que acomete, especialmente, crianças de países em desenvolvimento (6, 10, 13). Os mecanismos envolvidos na enteropatogenicidade desses microrganismos ainda não foram esclarecidos e a virulência das EAEC parece estar associada a uma multiplicidade de fatores e restrita a subgrupos bacterianos carreadores de propriedades específicas (8, 12, 14, 15, 17). Além dos mecanismos diretamente relacionados à virulência, a resistência a antimicrobianos tem sido apontada como um dos fenômenos mais relevantes e que contribui para a elevação das taxas de morbimortalidade. Nas populações microbianas de *Escherichia coli*, uma característica importante que vem sendo descrita é a resistência a múltiplos antibióticos em isolados bacterianos de origem diversa (5, 8). Particularmente para as EAEC, a observação de que marcadores genéticos de virulência são co-transferidos com genes codificadores de resistência a antimicrobianos vem sugerir, cada vez mais, que esta propriedade pode desempenhar um papel importante ou mesmo contribuir para a virulência desses microrganismos (1, 7, 8, 12). Apesar da variabilidade fenotípica e genotípica comumente descrita no grupo das EAEC, investigações epidemiológicas sugerem que a patogenicidade seja um atributo de subpopulações dentro da categoria, as quais compartilham propriedades específicas (7, 12, 14, 15).

Estudos filogenéticos têm revelado que populações comensais e patogênicas de *E. coli*, isoladas de uma ampla variedade de hospedeiros e de origem geográfica diversa, podem ser subdivididas em quatro grupos filogenéticos principais: A, B1, B2 e D. Estes grupos parecem diferir em importantes aspectos relacionados à biologia de suas populações microbianas (8, 9, 18). Linhagens patogênicas de *E. coli* agentes de doenças extraintestinais (ExPEC) pertencem, em sua maioria, ao grupo B2 e, em menor escala, ao grupo D; ao passo que as comensais e agentes de doença diarreica são normalmente encontradas como membros dos grupos A, B1 e D (3, 8, 9).

Considerando a diversidade da categoria das EAEC e o seu reconhecimento como um enteropatógeno emergente, o objetivo deste estudo foi investigar características desses microrganismos por meio da determinação do grupo filogenético e do perfil de resistência a antimicrobianos, visando contribuir para o esclarecimento dos seus aspectos bioepidemiológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados bacterianos e métodos bacteriológicos

Neste estudo foram incluídos 82 isolados de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) provenientes de crianças de 0 a 3 anos, com (n = 65) e sem (n = 17) diarreia (13). A identificação da espécie foi baseada em características fisiológicas e os isolados foram mantidos a -20°C sob a forma de suspensão em caldo de tripticaseína de soja (Trypticase Soy Broth - TSB; BBL - Becton Dickinson, Cockeysville,

Maryland, USA), acrescida de 15% de glicerol (v/v). A cada teste os isolados eram recuperados do estoque e avaliados quanto a viabilidade e pureza mediante subcultivos em meios apropriados. Os isolados de *E. coli* foram caracterizados como EAEC, conforme reatividade com a sonda pCVD 432, por meio de ensaios de hibridização em colônia e expressão do padrão de aderência agregativo em células epiteliais em cultura.

Testes de susceptibilidade a antimicrobianos

A investigação da susceptibilidade a antimicrobianos foi realizada pela técnica de difusão em ágar seguindo recomendações do CLSI (4) e utilizando os discos impregnados com os seguintes antimicrobianos (SENSIFAR-CEFAR): ácido nalidíxico (NAL-30 µg), amicacina (AMI-30 µg), ampicilina (AMP-10 µg), ácido clavulânico+amoxicilina (AMC- 30 µg), cefotaxima (CTX- 30 µg), ceftazidima (CAZ-30 µg), ciprofloxacina (CIP-5 µg), fosfomicina (FOS-200 µg), gentamicina (GEN-10 µg), nitrofurantoína (NIT-300 µg), piperacilina+tazobactam (PPT-110 µg), sulfazotrim (SUT-25 µg) e trimetoprim (TRI-5 µg). Os isolados foram considerados multirresistentes quando se observava resistência a, pelo menos, dois dos antimicrobianos testados. Para o controle de qualidade dos testes foram incluídos os seguintes padrões: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923.

Reação de PCR-Triplex

A determinação do grupo filogenético foi realizada por meio de ensaios de amplificação simultânea (PCR-triplex) visando a detecção dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento TspE4.C2 (3). Para a reação de amplificação, foi utilizada uma alíquota de 200ng de DNA isolado e purificado pelo *kit* comercial *Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Biosciences)*. O volume final de reação foi de 20µl contendo 2µl de tampão (100mM Tris-HCl, pH 8,8, 500mM KCl, 1% Triton X-100), 20pmol de cada iniciador, 80µM de dNTP (20µM dATP, 20µM dCTP, 20µM dTTP e 20µM d GTP), 3mM de MgCl₂ e 2,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen do Brasil). A reação foi programada para 30 ciclos de 94°C - 30", 63°C - 30" e 72°C - 30", seguida de uma extensão final de 72°C - 7', após uma desnaturação inicial de 94°C - 5'. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen Brasil), na concentração de 1% em tampão TBE 0,5X (10X concentrado, Tris 1M, ácido bórico 1M, EDTA 0,01M, pH 8,0) a 100V, durante três horas. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizado em um transiluminador. A reprodutibilidade foi avaliada observando-se a repetição do padrão eletroforético com base em diferentes reações de amplificação e de culturas do mesmo isolado.

Análise estatística

A associação entre as características investigadas e os isolados de EAEC foi analisada e comparada mediante o emprego dos testes Qui-quadrado e exato de Fisher, segundo o programa EpiInfo, versão 3.5.1. Valores $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 82 isolados de EAEC incluídos no estudo foram caracterizados quanto ao grupo filogenético e ao perfil de resistência a antimicrobianos. O critério de agrupamento filogenético seguiu recomendações prévias, com base na presença/ausência dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento TspE4.C2 (3). Os resultados da filotipagem revelaram que as EAEC se encontram distribuídas nos quatro grupos filogenéticos (Tabela 1). Os isolados obtidos de crianças com diarreia foram encontrados principalmente nos grupos A (66,2 %) e D (24,6%); os provenientes de crianças sem diarreia, nos grupos A (64,7%) e B1 (17,6%) (Tabela 2). A análise estatística empregada não detectou uma associação significativa entre os grupos filogenéticos e a doença diarreica.

Tabela 1. Classificação filogenética dos isolados de EAEC incluídos no estudo

Grupo filogenético	Marcadores filogenéticos			Frequência N° (%)
	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4.C2	
A	-	+ ou -	-	54 (65.8%)
B1	-	+ ou -	+	8 (9.7%)
D	+	-	+ ou -	17 (20.7%)
B2	+	+	+ ou -	3 (3.6%)
Total de isolados				82 (100%)

Tabela 2. Distribuição dos grupos filogenéticos entre as EAEC isoladas de crianças com (caso) e sem (controle) diarreia

Caso/Controle N°	Grupos filogenéticos [n° (%)]				Total
	A n = 54	B1 n = 8	D n = 17	B2 n = 3	
Caso (65)	43 (66,2%)	5 (7,7%)	16 (24,6%)	1 (1,5%)	65 (100%)
Controle (17)	11 (64,7%)	3 (17,6%)	1 (5,9%)	2 (11%)	17 (100%)

Os resultados obtidos dos testes de difusão em ágar revelaram que 34,1% da população bacteriana foi sensível a todos os antimicrobianos testados. Todos os isolados de EAEC foram sensíveis a: amoxicilina, gentamicina e piperacilina+

tazobactam. O fenótipo da resistência foi detectado em 65,9% dos isolados de EAEC definindo 15 perfis distintos (II a XVI) (Tabela 3). Desses perfis, 4 (II ao V) corresponderam a padrões de resistência isolada para ampicilina, fosfomicina, ácido nalidíxico e sulfazotrim e 11, a padrões de multirresistência (VI ao XVI). No grupo dos isolados de EAEC obtidos de crianças com diarreia, a resistência foi detectada em 64,6% apresentando índices de 50,8% (SUT), 46,1% (AMP), 20% (NAL), 13,8% (CAZ), 12,3% (CTX), 9,2% (AMI), 4,6% (FOS) e 1,5% (NIT, TRI e CIP). A resistência intermediária foi detectada para ácido nalidíxico, amicacina, ampicilina, fosfomicina, nitrofurantoína, piperacilina+tazobactam, trimetoprim e ciprofloxacina. No grupo dos isolados provenientes de crianças sem diarreia, a resistência a antimicrobianos também foi observada exibindo percentuais de 47% (AMP), 41,2% (SUT), 17,6% (NAL) e 11,8% (CTX e CAZ). Foi encontrado o fenótipo de resistência intermediária a ácido nalidíxico, amicacina, fosfomicina, nitrofurantoína, piperacilina+tazobactam, trimetoprim e ciprofloxacina. A resistência múltipla para até seis antimicrobianos foi observada em 81,5% dos isolados de EAEC resistentes, definindo 11 perfis (VI a XVI) no grupo das crianças com diarreia e 3 perfis (VI, X e XI) no grupo controle (Tabela 3). O fenômeno da resistência a antimicrobianos em populações de EAEC, em especial o fenótipo da multirresistência e a elevada diversidade de seus padrões corroboram observações anteriores (1, 7, 8, 12). A literatura descreve que aspectos geográficos, populacionais e culturais parecem desempenhar um papel crucial na seleção e no estabelecimento destas características (5). Estudos epidemiológicos mostram que a resistência não parece ser mais frequente entre os isolados provenientes de crianças com diarreia quando comparada com os isolados obtidos de indivíduos assintomáticos (1, 12). Apesar de nossos resultados terem revelado um percentual de resistência maior entre os isolados obtidos de casos, não foi detectada uma associação significativa destes marcadores com a doença diarreica. Por outro lado, a elevada diversidade detectada nos padrões de resistência, alerta para o reconhecimento do seu potencial na disseminação destes marcadores, especialmente se considerarmos a característica das EAEC como um enteropatógeno comunitário e com elevada capacidade de intercâmbio genético, o que contribuirá para a emergência de subpopulações bacterianas virulentas.

A multirresistência foi detectada nos grupos A e B1 para dois a cinco marcadores, seguidos dos grupos D para dois a seis marcadores e B2 para dois marcadores (Figura 1). A resistência isolada foi observada apenas entre os isolados de EAEC classificados no grupo A e obtidos, preferencialmente, de crianças com diarreia (70%). Os grupos D e A incluíram isolados com a maior concentração de marcadores de resistência, nove e sete, respectivamente; nos grupos B1 e B2, foi observada resistência a até cinco antimicrobianos e, no grupo B1, a dois (Figura 1).

A filotipagem de populações de *E. coli* realizada por meio de ensaios de amplificação é reconhecida como uma metodologia molecular alternativa para estudos filogenéticos desses microrganismos possibilitando a identificação

de grupos ou linhagens patogênicas (3, 9, 18). Particularmente para populações de EAEC essa abordagem é ainda limitada e nossos dados revelaram que esses microrganismos são classificados, em sua grande maioria, como membros dos grupos filogenéticos nos quais normalmente se encontram os patótipos intestinais de *E. coli* (3, 15, 18). Adicionalmente, foi detectada a ocorrência do fenótipo de multirresistência, especialmente entre os isolados provenientes de crianças com diarreia, os quais, por sua vez, foram restritos a grupos filogenéticos específicos. Tal observação corrobora estudos anteriores e reforça a hipótese de que a patogenia de EAEC está restrita a certos subgrupos de populações bacterianas. O conjunto dos dados obtidos contribui para o esclarecimento de aspectos bio-genético-epidemiológicos desses microrganismos circulantes em nosso meio, os quais são reconhecidos como enteropatógenos emergentes, principalmente nos países em desenvolvimento.

Tabela 3. Perfis de resistência a antimicrobianos encontrados nos isolados de EAEC obtidos de crianças com e sem diarreia

Perfil de resistência	Antimicrobiano	N (%)		Nº de amostras
		Caso	Controle	
I	–	21 (75%)	7 (25%)	28
II	AMP	1 (33.4%)	2 (66.6%)	3
III	FOS	1 (100%)	(0)	1
IV	NAL	2 (100%)	(0)	2
V	SUT	3 (75%)	1 (25%)	4
VI	AMP e SUT	22 (81.5%)	5 (18.5%)	27
VII	AMI, AMP e SUT	1 (100%)	(0)	1
VIII	AMP, CIP e SUT	1 (100%)	(0)	1
IX	AMP, SUT e TRI	1 (100%)	(0)	1
X	AMP, NAL e SUT	1 (50%)	1 (50%)	2
XI	CAZ, CTX e NAL	2 (50%)	2 (50%)	4
XII	NAL, AMP, FOS e SUT	1 (100%)	(0)	1
XIII	NAL, AMI, CTX e CAZ	4 (100%)	(0)	4
XIV	AMP, CAZ, FOS, NAL e SUT	1 (100%)	(0)	1
XV	NAL, AMI, CTX, CAZ e SUT	1 (100%)	(0)	1
XVI	AMP, CAZ, CTX, NAL, NIT e SUT	1 (100%)	(0)	1

Legenda: ácido nalidíxico (NAL-30 µg), amicacina (AMI-30 µg), ampicilina (AMP-10 µg), ácido-clavulânico + amoxicilina (AMC- 30 µg), cefotaxima (CTX-30 µg), ceftazidima (CAZ-30 µg), ciprofloxacina (CIP-5 µg), fosfomicina (FOS-200 µg), gentamicina (GEN-10 µg), nitrofurantoina (NIT-300 µg), piperacilina + tazobactam (PPT-110 µg), sulfazotrim (SUT-25 µg) e trimetoprim (TRI-5 µg).

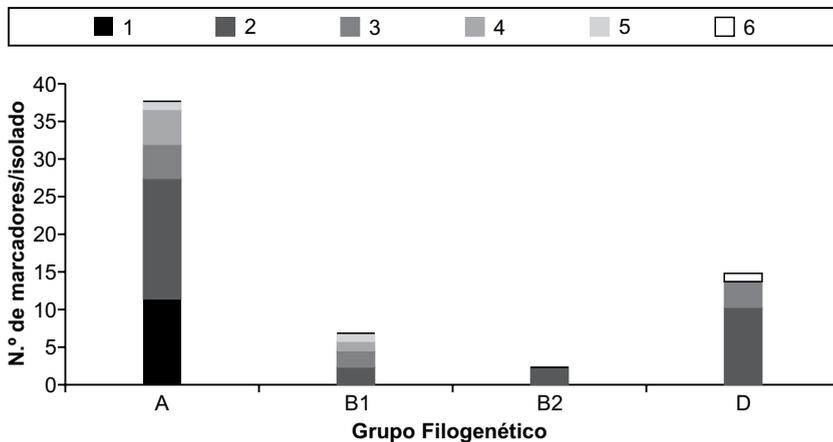


Figura 1. Distribuição do número de marcadores de resistência por isolado de EAEC conforme o grupo filogenético.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPERJ pelo apoio financeiro concedido através do Projeto de Pesquisa-APQ-1 E-26/170.644/05.

ABSTRACT

Enterοaggregative *Escherichia coli* (EAEC): phylotyping and antibiotics resistance in an emergent enteropathogen

Enterοaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is an emerging enteropathogen mainly in developing countries. The virulence mechanisms of EAEC are not completely understood and the role of various factors described still requires further investigation. Enteropathogenicity appears to be an attribute of certain subgroups within the category and resistance to antibiotics has been identified as a relevant characteristic among EAEC strains. Phylogenetic studies have shown that *E. coli* can be divided into four main groups designated A, B1, B2 and D. The purpose of this study was to determine the phylogenetic group and resistance to antibiotics in EAEC isolates obtained from children with diarrheal disease and control subjects by polymerase chain reaction and standard disk diffusion method. Phylotyping revealed a bacterial population distributed in phylogenetic groups A (65.8%), D (20.7%), B1 (9.7%) and B2 (3.6%). Antimicrobial resistance was observed in 65.9% of the bacterial population. Multidrug resistance phenotype was detected mainly among EAEC isolated from diarrheal children and belonging to phylogenetic groups A and

D. The data contribute to the knowledge of genetic epidemiological aspects of these enteropathogens circulating in our community.

KEY WORDS: Enteroaggregative *Escherichia coli*. Antibiotics resistance. PCR. Phylotyping. Virulence.

REFERÊNCIAS

1. Aslani MM, Ahrabi SS, Alikhani YM, Jafari F, Zali RM, Mani M. Molecular Detection and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal cases. *Saudi Med J* 29: 388-392, 2008.
2. Bernier C, Gounon P, Le Bouguenec C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infect Immun* 70: 4302-4311, 2002.
3. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66: 4555-4558, 2000.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute; Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. CLSI document M2-A3. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, Pa, 2006.
5. Erb A, Stürmer T, Marre R, Brenner, H. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26: 83-90, 2007.
6. Huang DB, Okhuysen PC, Jiang ZD, DuPont HL. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. *Am J Gastroenterol* 99: 383-389, 2004.
7. Jenkins C, van Ijperen C, Dudley EG, Chart H, Willshaw GA, Cheasty T, Smith HR, Nataro JP. Use of a microarray to assess the distribution of plasmid and chromosomal virulence genes in strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 253: 119-124, 2005.
8. Kahali S, Sarkar B, Rajendran K, Khanam J, Yamasaki S, Nandy RK, Bhattacharya SK, Ramamurthy T. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *J Clin Microbiol* 42: 4111-4120, 2004.
9. Moulin-Schouleur M, Répérant M, Laurent S, Brée A, Mignon-Grasteau S, Germon P, Rasschaert D, Schouler C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol* 45: 3366-3376, 2007.
10. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201, 1998.
11. Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* 157: 690-693, 1984.
12. Okeke IN, Lamikanra A, Czezulín J, Dubovsky F, Kaper JB, Nataro JP. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in southwest Nigeria. *J Infect Dis* 181: 252-260, 2000.
13. Regua-Mangia AH, Gomes TAT, Vieira MAM, Andrade JRC, Irino K, Teixeira LM. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *J Infection* 48: 161-167, 2004.
14. Regua-Mangia AH, Gomes TAT, Vieira MAM, Irino K, Teixeira LM. Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro City, Brazil. *J Med Microbiol* 58: 414-422, 2009.
15. Sarantuya J, Nishi J, Wakimoto N, Erdene S, Nataro JP, Sheikh J, Iwashita M, Manago K, Tokuda K, Yoshinaga M, Miyata K, Kawano Y. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. *J Clin Microbiol* 42: 133-139, 2004.
16. Suzart S, Guth BEC, Pedroso MZ, Okafor UM, Gomes TAT. Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence. *FEMS Microbiol Lett* 201: 163-168, 2001.
17. Uber AP, Trabulsi LR, Irino K, Beutin L, Ghilardi ACR, Gomes TAT, Liberatore AMA, Castro AFP, Elias WP. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. *FEMS Microbiol Lett* 256: 251-257, 2006.
18. Zhang L, Foxman B, Marrs C. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *J Clin Microbiol* 40: 3951-3955, 2002.