

MARIA APARECIDA SCATAMBURLO MOREIRA

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS
EM *Escherichia coli* E EM *Enterobacter cloacae***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Doctor Scientiae".

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

RESUMO

MOREIRA, Maria Aparecida Scatamburlo, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2002. **Mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* e em *Enterobacter cloacae*.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Conselheiros: Marisa Vieira de Queiroz e Walter Vieira Guimarães.

A resistência aos antimicrobianos foi estudada em bactérias da microbiota indígena de frangos de corte. O objetivo geral foi determinar os mecanismos de resistência aos antimicrobianos em membros multirresistentes da família *Enterobacteriaceae*. Quatorze isolados de *Enterobacter cloacae* e oito de *Escherichia coli* tiveram seus perfis de resistência investigados. Foi observada ampla variação nos níveis de resistência entre isolados de uma mesma espécie, com base nas concentrações inibitórias mínimas (MIC) de antimicrobianos pertencentes a diferentes classes. A presença de sistemas de efluxo multidrogas foi evidenciada em ambas as espécies, pela diminuição da MIC nas células tratadas com carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) e pelas hibridizações com sondas derivadas de genes codificadores de algumas proteínas componentes de sistemas de efluxo multidrogas. O uso da sonda derivada de *mexXY* resultou em hibridização com DNA plasmidial, enquanto a sonda derivada de *mexEF* hibridizou com DNA cromossômico. Os sistemas de efluxo MexXY e MexEF são conhecidos em *Pseudomonas aeruginosa*.

Presença de seqüências homólogas às dos genes codificadores das proteínas AcrA e AcrB foi detectada por reação em cadeia de polimerase, PCR. Todos os isolados de *E. coli* apresentaram resultados positivos para *acrAB*, enquanto onze isolados de *E. cloacae* apresentaram amplificação de segmentos com os comprimentos esperados e três apresentaram resultados negativos, isto é, não houve amplificação. O sistema de efluxo AcrAB é conhecido em *Escherichia coli* e em *Salmonella typhimurium*. Resistência ao cloranfenicol, dependente de força próton motora, foi relacionada com presença de plasmídios em isolados de *E. coli*, resultado este obtido de cura e transformação de *E. coli* selvagem e de transformação de *E. coli* DH5 α com os plasmídios da *E. coli* original. Todos os isolados resistentes aos β -lactâmicos apresentaram atividade de β -lactamases, exceto um, que apresentou atividade de sistema de efluxo para o β -lactâmico cefaclor. Os resultados demonstram a diversidade de mecanismos de resistência aos antimicrobianos entre isolados da mesma espécie e da mesma fonte, além da presença de sistemas de efluxo de drogas em bactérias da microbiota indígena de frangos.

ABSTRACT

MOREIRA, Maria Aparecida Scatamburlo, D.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2002. **Mechanisms of resistance to antimicrobial agents in *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae***. Adviser: Célia Alencar de Moraes. Committee Members: Marisa Vieira de Queiroz and Walter Vieira Guimarães.

The resistance to antimicrobial agents in bacteria isolated from poultry carcasses was examined. The main objective was to identify resistance mechanisms in multiresistant members of the *Enterobacteriaceae* family. Fourteen isolates of *Enterobacter cloacae* and eight of *Escherichia coli* had their resistance profiles investigated. Wide ranges of Minimum Inhibitory Concentrations, MIC, for individual antimicrobial agents belonging to different classes were observed. In both species, the presence of drug efflux systems was determined by the lowering of MIC for cells treated with carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, CCCP. DNA hybridization with probes derived from *mexXY* and *mexEF* indicated the possible presence of similar genes in some of those isolates. Plasmid DNA hybridized with the *mexXY* probe and chromosomal DNA hybridized with the *mexEF* probe. MexXY and MexEF are multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa*. Amplification of DNA with primers derived from *acrAB* showed positive results for all of the *E.coli* isolates. AcrAB is a multidrug efflux system recognized in *E. coli* and in *Salmonella typhimurium*. Eleven of the *E. cloacae* isolates had DNA of the

expected lengths amplified and three did not show any sign of amplification with either the *acrA* or *acrB* primers. There was evidence of a chloranfenicol resistance mechanism dependent of the proton motive force that was related to the the presence of plasmids. The evidence was obtained by plasmid curing and transformation. *E. coli* DH5 α transformed with the referred plasmids also acquired resistance to the same level of the drug. All of the isolates resistant to β -lactam antibiotics presented β -lactamase activity, except for one that showed possible efflux system to cefaclor, as evidenced by the response to CCCP. These results demonstrate diversity in resistance mechanisms to antimicrobial agents among isolates of the same species from the same origin in nature. The presence of drug efflux systems was demonstrated in commensal bacteria of poultry.