

LUCAS CECÍLIO VILAR

**ANÁLISE DA RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA EM
AMOSTRAS DE *Escherichia coli* UROPATOGÊNICAS
DO ST69 ISOLADAS NO RIO DE JANEIRO**



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
JULHO / 2021**

Trabalho realizado no Departamento de microbiologia médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Beatriz Meurer Moreira e coorientação da Dr^a. Ana Paula De Souza Da Silva

FICHA CATALOGRÁFICA

V697a Vilar, Lucas Cecílio
Análise da resistência e virulência em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas do ST69 isoladas no Rio de Janeiro / Lucas Cecílio Vilar. -- Rio de Janeiro, 2021.
89 f.

Orientadora: Beatriz Meurer Moreira.
Coorientadora: Ana Paula de Souza da-Silva.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2021.

1. *Escherichia coli*. 2. ST69. 3. Genoma. 4. Resistência a antimicrobianos. 5. Virulência. I. Moreira, Beatriz Meurer, orient. II. de Souza da Silva, Ana Paula, coorient. III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Lucas Cecílio Vilar**

DRE: 118060065

BANCA EXAMINADORA: Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto (Presidente)
 Dr. Leandro Stefano Sangenito
 Dr. Dennys Monteiro Girao
 Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza (Suplente)

Título da Monografia: **“Análise da resistência e virulência em amostras de
Escherichia coli uropatogênicas do ST69 isoladas no Rio de Janeiro”**

Local: Sala virtual <https://zoom.us/j/9995231087>

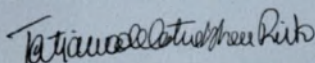
Data e hora de início: **09 de julho de 2021 às 13:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 09 de julho de 2021.

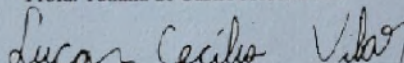
NOTA	Banca Examinadora:
10,0	Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto
10,0	Dr. Leandro Stefano Sangenito
10,0	Dr. Dennys Monteiro Girao
	Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza

Presidente da banca



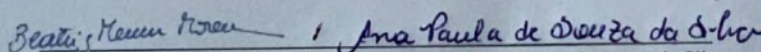
Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto

Aluno:



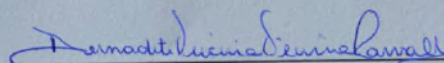
Lucas Cecílio Vilar

Orientador:



Profa. Beatriz Meurer Moreira / Coorientador: Dra. Ana Paula de Souza da Silva

Coordenador
de TCC



Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Fernando e Rita, que nunca mediram esforços para me ajudar a alcançar meus objetivos. Por sempre estarem ao meu lado nos momentos difíceis e por todo o apoio e incentivo a trilhar o caminho da educação.

À minha orientadora, Professora Dr^a Beatriz, por todo o conhecimento transmitido, incentivo e paciência. Por sempre estar disponível para tirar todas as minhas dúvidas e pelos valiosos conselhos. Por ter confiado em mim e ter me aceito no laboratório ainda no início da graduação.

À minha coorientadora, Dr^a Ana Paula, pela paciência, disponibilidade para sempre tirar todas as minhas dúvidas e por todas as sugestões que ajudaram a enriquecer o trabalho.

Ao Eduardo Moreia de Castro, pela ajuda na realização dos antibiogramas.

Aos Luís Guilherme de Araújo Longo e Dr. Luiz Phillippe Baptista, por terem me ensinado a utilizar as ferramentas de bioinformática.

Aos meus demais amigos(as) de laboratório, por terem me acolhido de maneira excepcional e por todo o conhecimento transmitido.

RESUMO

Lucas Cecílio Vilar

Orientadora: Beatriz Meurer Moreira

Escherichia coli é um microrganismo responsável por causar infecções intestinais e extraintestinais. Entre os clones causadores de infecções extraintestinais, destacam-se quatro que são considerados pandêmicos: ST69, ST73, ST95 e ST131, responsáveis principalmente por infecções no trato urinário (ITU) e infecções na corrente sanguínea (ICS). Esses clones apresentam fatores de virulência que permitem sua sobrevivência e adaptação nesses sítios do hospedeiro, além de possuírem genes que conferem resistência a antimicrobianos. ST69 foi primeiramente identificado como agente causador de ITU adquirida na comunidade nos Estados Unidos; no entanto, atualmente, já foi encontrado em todos os continentes e em diversos países. Embora o ST69 tenha uma grande importância médica, sendo um dos principais clones responsáveis por causar ITU e ICS, há poucos trabalhos que busquem caracterizar amostras desse ST circulantes no Brasil. O objetivo do presente estudo foi realizar uma análise temporal do perfil de resistência de amostras de *E. coli* pertencentes ao ST69 isoladas de indivíduos com ITU adquiridas na comunidade no estado do Rio de Janeiro obtidas em três períodos: 2005, 2015 e 2019, além de realizar uma análise genômica das amostras do período de 2005. Após a análise do perfil de resistência, vimos que as amostras do ano de 2019 foram significativamente mais suscetíveis a três antimicrobianos em relação à coleção 2005 ($p < 0,04$) e a cinco antimicrobianos em relação a coleção 2015 ($p < 0,005$). Realizamos a detecção do gene *fimH* nas amostras de 2019 e vimos que a frequência desse gene se manteve acima de 90% nas três coleções. Comparamos os genomas de 2005 com 40 genomas do ST69 disponíveis em um banco de dados e identificamos um gene de resistência e quatro genes de virulência conservados entre todos os genomas. A identificação desses genes pode contribuir para o desenvolvimento de tratamentos contra as amostras desse ST.

Palavras-Chave: *Escherichia coli*, ST69, genoma, resistência a antimicrobianos, virulência.

ABSTRACT

Lucas Cecílio Vilar

Orientadora: Beatriz Meurer Moreira

Escherichia coli is a microorganism responsible for intestinal and extraintestinal infections. Among extraintestinal clones, four are considered pandemic: ST69, ST73, ST95 e ST131, mainly responsible for urinary tract infections (UTI) and bloodstream infections (BSI). These clones present virulence factors that allow them to survive and adapt to host sites; additionally, they carry genes that confer antibiotic resistance. ST69 was first identified as causing community-acquired UTI in the United States; however, this clone has already been found in all continents and several countries. Although ST69 has been recognized as a clone of high medical importance and is one of the major clones responsible for UTI and ICS, few studies seek to characterize isolates belonging to this clone in Brazil. The aim of this study was to conduct a chronological analysis of the resistance profile of isolates belonging to ST69 obtained from individuals with community-acquired UTI in Rio de Janeiro state from three different periods: 2005, 2015, and 2019, in addition to run a genomic analysis of isolates from 2005. By the analysis of resistance profiles, we observed that isolates from 2019 were significantly more susceptible to three antibiotics when compared to isolates from 2005 ($p < 0.04$), and to five antibiotics when compared to isolates from 2015 ($p < 0.005$). We detected *fimH* gene in the 2019 isolates and observed that frequency of this gene was higher than 90% in all three collections. We compared the genomes of isolates from 2005 with 40 other ST69 genomes available on a public database and identified one resistance gene and four virulence genes conserved among all genomes. The identification of these genes may be helpful to the development of new treatment against isolates of this ST.

Key-words: *Escherichia coli*, ST69, genome, antimicrobial resistance, virulence.

RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS

Lucas Cecílio Vilar

Orientadora: Beatriz Meurer Moreira

Escherichia coli é uma bactéria encontrada no trato intestinal de pessoas saudáveis. Porém, esse microrganismo também pode ser responsável por diversos tipos de infecções, tanto no intestino quanto em outros lugares do corpo. ST69 é um tipo específico de *Escherichia coli* que causa infecções urinárias (IU) e infecções no sangue (IS). Bactérias do tipo ST69 possuem mecanismos que permitem a sua sobrevivência no corpo humano e a tornam resistentes a antibióticos. Embora o ST69 tenha uma grande importância médica, há poucos estudos sobre essas bactérias no Brasil. Este estudo foi feito para ver se bactérias do tipo ST69, que temos em nossos estoques e foram obtidas de pessoas com IU no Rio de Janeiro, têm ficado mais resistentes a antibióticos com o passar do tempo. Temos bactérias de três períodos: 2005, 2015 e 2019. Além disso, fizemos estudos sobre o código genético das bactérias do período de 2005. Vimos que as bactérias ficaram mais sensíveis quando comparamos as do ano de 2015 com as obtidas posteriormente. No estudo do código genético verificamos que as bactérias de 2005 têm muitas semelhanças com as estudadas por outros grupos de pesquisa. Esses segmentos do código genético que são parecidos podem ser usados em novas pesquisas para o descobrimento de novos antibióticos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição dos trabalhos encontrados envolvendo amostras <i>Escherichia coli</i> do ST69 no período de 2001 a 2020 por ano de publicação.....	14
Figura 2 – Distribuição geográfica dos 43 estudos epidemiológicos envolvendo o ST69.....	15
Figura 3 – Distribuição temporal e geográfica dos estudos envolvendo ST69 da revisão.....	16
Figura 4 – Distribuição da taxa das amostras do ST69 nas coleções entre os continentes	18
Figura 5 – Esquema representando a placa com os discos de antimicrobianos utilizados no teste de dupla difusão para detectar produção de ESBL	27
Figura 6 – Frequência do ST69 na coleção durante os três períodos.	30
Figura 7 – Frequência de não suscetibilidade entre as amostras do ST69 dos três períodos. .	36
Figura 8 – Genes de resistência encontrados nas amostras da coleção ITU-2005.	39
Figura 9 – Distribuição dos genes de virulência nas amostras da coleção ITU-2005.....	41
Figura 10 – Distribuição dos genes de resistência e das mutações encontradas nos 55 genomas analisados	45
Figura 11 – Distribuição dos genes de virulência encontrados nos 55 genomas analisados...	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição da fonte de isolamento das amostras de <i>Escherichia coli</i> do ST69 em relação à frequência nos 43 estudos analisados	17
Tabela 2 – Identificação das amostras de <i>Escherichia coli</i> do ST69 na coleção do estudo	24
Tabela 3 – Iniciadores, sequência e tamanho do amplicon para a tipagem do ST por PCR ...	25
Tabela 4 – Antimicrobianos utilizados no teste de susceptibilidade	26
Tabela 5 – Iniciadores utilizados para detecção do gene <i>fimH</i>	28
Tabela 6 – Distribuição das amostras do ST69 de acordo com o sexo dos indivíduos nas coleções ITU-2005, 2015 e 2019.....	31
Tabela 7 – Distribuição das amostras do ST69 por faixa etária dos indivíduos nas coleções ITU-2005, 2015 e 2019	31
Tabela 8 – Comparação do antibiograma realizado no estudo prévio em 2005 com o realizado no presente estudo para as mesmas amostras da coleção ITU-2005	33
Tabela 9 – Resultado do antibiograma das coleções de amostras do ST69 dos três períodos	34
Tabela 10 – Presença do gene <i>fimH</i> nas amostras de <i>Escherichia. coli</i> dos três períodos	37
Tabela 11 – Características gerais dos genomas das amostras da coleção ITU-2005	38
Tabela 12 – Escore de virulência e resistência nas amostras da coleção ITU-2005.....	40
Tabela 13 – Informações sobre o escore de resistência das coleções ITU-2005, Urina, Sangue e Ambiental.....	42
Tabela 14 – Informações sobre o escore de virulência das coleções ITU-2005, Urina, Sangue e ambiental.....	42
Tabela 15 – Comparação dos genes de resistência encontrados na coleção ITU-2005 com as coleções Urina, Sangue e Ambiental	46
Tabela 16 – Comparação dos genes de virulência encontrados na coleção ITU-2005 com as coleções Urina, Sangue e Ambiental	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	Amoxicilina-clavulanato
AMK	Amicacina
AMP	Ampicilina
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica de aves
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CC	Complexo clonal
CgA	Grupo clonal A
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNF1	Fator necrosante citotóxico 1
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
CXM	Cefuroxima
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreioagênica
DHFR	Dihidrofolato redutase
DHPS	Dihidropteroato sintetase
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EnPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica do endométrio
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ESBL	β -lactamase de espectro estendido
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ETP	Ertapenem
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
FEP	Cefepima
FOS	Fosfomicina
FOX	Cefoxitina
FV	Fatores de virulência
GEN	Gentamicina
HlyA	α -hemolisina

ICS	Infecção da corrente sanguínea
ITU	Infecção do trato urinário
ITU-AC	Infecção do trato urinário adquirida na comunidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MNEC	<i>Escherichia coli</i> causadora de meningite em neonatos
MPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica do tecido mamário
NIT	Nitrofurantoína
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI	Ilhas de patogenicidade
pAmpC	AmpC plasmidial
PBP	Proteínas de ligação à penicilina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RAPD	Amplificação aleatória de DNA polimórfico
RMD	Resistentes a múltiplas drogas
SEPEC	<i>Escherichia coli</i> causadora de sepse
SGC	Sequenciamento do genoma completo
ST	<i>Sequence type</i>
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora da Toxina Shiga
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TMP	Trimetoprim
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Características gerais do microrganismo <i>Escherichia coli</i>	1
1.2 Patotipos de <i>Escherichia coli</i>	2
1.2.1 Patotipos de <i>Escherichia coli</i> diarreio gênica	2
1.2.2 Patotipos de <i>Escherichia coli</i> extraintestinais	3
1.3 Fatores de virulência em <i>Escherichia coli</i> uropatogênica	4
1.3.1 Adesinas	4
1.3.2 Toxinas	6
1.3.3 Sistemas de aquisição de ferro	7
1.3.4 Evasão do sistema imune	7
1.4 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos.....	8
1.4.1 Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos	8
1.4.2 Mecanismos de resistência às quinolonas e fluoroquinolonas	9
1.4.3 Mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos.....	10
1.4.4 Mecanismos de resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim	11
1.5 Clones de <i>Escherichia coli</i>	11
1.5.1 <i>Escherichia coli</i> sequence type 69	13
1.5.1.1 Características gerais de <i>Escherichia coli</i> sequence type 69.....	13
1.5.1.2 Revisão da literatura sobre <i>Escherichia coli</i> sequence type 69.....	14
1.5.2 <i>Escherichia coli</i> sequence type 69 no Brasil.....	18
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Origem das amostras bacterianas e coleção do estudo	23
4.2 Tipificação por PCR multiplex	24
4.3 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos e teste de dupla difusão para identificação da produção de ESBL	25
4.4 Detecção do gene <i>fimH</i>	27
4.5 Análise dos genomas das amostras ITU-2005	28

4.6	Análise dos genomas de <i>Escherichia coli</i> baixados do banco de dados.....	29
4.7	Análises estatísticas	29
4.8	Aspectos éticos.....	29
5	RESULTADOS	30
5.1	Taxa de ST69 nas amostras da coleção ITU-2019.....	30
5.2	Características sociodemográficas da coleção ITU-2019	30
5.3	Perfil de não suscetibilidade das amostras das coleções ITU-2005 e ITU-2019.....	31
5.4	Pesquisa do gene <i>fimH</i> amostras ITU-2019.....	37
5.5	Análise do genoma das amostras ITU-2005	37
5.6	Análise dos genomas do banco de dados	42
5.7	Comparação entre os genomas das amostras ITU-2005 e do banco de dados.....	43
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO.....	60
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
9	ANEXOS	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais do microrganismo *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma espécie bacteriana pertencente ao gênero *Escherichia* da família *Enterobacteriaceae*. Este gênero é composto por três espécies diferentes: *E. albertii*, *E. coli*, *E. fergusonii* (Denamur *et al.*, 2020). Dentre essas espécies, *E. coli* apresenta a maior importância clínica por ser a causa de infecções intestinais e extraintestinais. *E. coli* habita o trato gastrointestinal de humanos e animais de forma comensal, e também é causa de infecções (Tenaillon *et al.*, 2010). Além disso, esse microrganismo também pode ser encontrado em ambientes aquáticos e no solo, por isso frequentemente é utilizado como indicador de poluição fecal na água (Tenaillon *et al.*, 2010).

Amostras de *E. coli* apresentam formato bacilar, são gram-negativas (através da identificação da coloração de Gram), não formam esporos, podendo ser móveis (com a presença de flagelos peritríquios) ou imóveis (Strockbine *et al.*, 2015). É um microrganismo anaeróbio facultativo, fermentador de glicose, sendo a maioria das amostras também capazes de fermentar lactose, oxidase-negativas e catalase-positivas (Strockbine *et al.*, 2015).

Uma maneira de caracterizar cepas de *E. coli* é através de seus antígenos de superfície. A caracterização feita exclusivamente através do antígeno O [porção mais externa do lipopolissacarídeo (LPS)] determina os sorogrupos, enquanto a caracterização através do antígeno O e do antígeno H (flagelar) determina os sorotipos (Nataro e Kaper, 1998).

Amostras de *E. coli* também são agrupadas de acordo com sua origem filogenética em grupos filogenéticos. Esse agrupamento surgiu através da observação da composição semelhante de isoenzimas observadas em amostras de humanos e outros animais que foram agrupadas nos filogrupos A, B1, B2, C, D e E por *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) (Selander *et al.*, 1987). Posteriormente, para simplificar essa caracterização que era custosa e laboriosa, Clermont e colaboradores (2000) propuseram uma identificação dos grupos filogenéticos baseado na presença dos genes *chuA*, *yjaA* e DNA TSPE4.C2 através de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa técnica identifica os filogrupos mais frequentes de *E. coli*: A, B1, B2 e D (Clermont, Bonacorsi e Bingen, 2000; Gordon *et al.*, 2008).

A partir dos anos 2000, o aumento dos dados disponíveis sobre genomas de diferentes cepas de *E. coli* isoladas de diversos hospedeiros possibilitou uma classificação em maior número de grupos filogenéticos (Jauregui *et al.*, 2008; Moissenet *et al.*, 2010; Clermont *et al.*, 2011; Tenaillon *et al.*, 2010). Clermont e colaboradores (2013) aprimoraram a técnica de PCR triplex desenvolvida em 2000 adicionando o gene *arpA* (que age como controle interno da

reação), o que possibilitou a identificação dos oito filogrupos: A, B1, B2, C, D, E, F e o Clado I de *Escherichia*, e a reclassificação das amostras anteriormente classificadas em novos filogrupos (Clermont *et al.*, 2013).

Mais frequentemente, amostras de *E. coli* agrupadas nos filogrupos B2, D, F e E são patogênicas sendo associadas as infecções extraintestinais (Bingen *et al.*, 1998; Picard *et al.*, 1999; Johnson e Stell, 2000; Clermont *et al.*, 2013). As amostras classificadas como A, B1, C e clado I são mais frequentemente comensais ou associadas a infecções intestinais (Picard *et al.*, 1999; Clermont, Bonacorsi e Bingen, 2000; Clermont *et al.*, 2013).

1.2 Patotipos de *Escherichia coli*

E. coli apresenta a capacidade de colonizar de forma assintomática o trato intestinal de pessoas saudáveis, em uma relação de comensalismo. No entanto, algumas amostras de *E. coli* podem causar infecções intestinais ou extraintestinais no hospedeiro (Kaper, Nataro e Mobley, 2004). Essas amostras possuem um conjunto de mecanismos de virulência que favorecem a sua patogenicidade em indivíduos saudáveis (Kaper, Nataro e Mobley, 2004). Algumas dessas combinações de fatores de virulência (FV) permitiram que as cepas de *E. coli* fossem classificadas em diferentes patotipos (Kaper, Nataro e Mobley, 2004).

As amostras dos patotipos, ou grupos patogênicos, de *E. coli* associadas às infecções intestinais são chamadas coletivamente de *E. coli* diarreio gênicas, também conhecidas como DEC (*diarrheagenic Escherichia coli*) (Nataro e Kaper, 1998). Os patotipos associados às infecções extraintestinais são chamados de *E. coli* extraintestinais (ExPEC) (*extraintestinal pathogenic Escherichia coli*) (Russo e Johnson, 2000).

1.2.1 Patotipos de *Escherichia coli* diarreio gênicos

Amostras de DEC podem ser divididas nos seguintes patotipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (produtora da toxina shiga) (EHEC/STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (Gomes *et al.*, 2016).

EPEC é caracterizada por produzir a lesão denominada *attaching and effacing*, por não apresentar genes da toxina shiga e pela ausência das enterotoxinas termolábeis e termoestáveis (Nataro e Kaper, 1998; Gomes *et al.*, 2016). Amostras de EPEC também podem ser classificadas em atípicas ou típicas, sendo estas carreadoras do plasmídeo EAF (pEAF) (Nataro e Kaper, 1998).

EHEC ou STEC apresentam a capacidade de produzir a toxina shiga e de desencadear um amplo espectro de doenças, que pode variar desde diarreias leves até casos graves de colite hemorrágica (Gomes *et al.*, 2016). Citotoxinas da família Shiga (codificadas em genes *stx*) são os principais FV produzidos por esse patotipo (Gomes *et al.*, 2016). A produção de algumas toxinas dessa família é induzida por situações de estresse, por isso a antibioticoterapia é contraindicada para infecções por EHEC (Lynch e Lesser, 2018).

EIEC apresenta a capacidade de invadir células intestinais, provocando uma infecção semelhante à causada por *Shigella* sp. (Kaper, Nataro e Mobley, 2004). Os principais sintomas da doença são: cólicas abdominais, febre e diarreia sanguinolenta com presença de muco (Belotserkovsky e Sansonetti, 2018). Além disso, amostras de EIEC se reproduzem no meio intracelular (Kaper, Nataro e Mobley, 2004).

EAEC apresenta um padrão de aderência em células *in vitro* denominado “adesão agregativa” (Navarro-Garcia e Elias, 2011). Esse tipo de aderência e a ausência de marcadores específicos (como a produção das toxinas termolábeis e/ou termoestáveis que estão presentes em outros grupos patogênicos) são os principais critérios de identificação de EAEC (Kaper, Nataro e Mobley, 2004; Gomes *et al.*, 2016). Os sintomas da infecção por EAEC incluem: diarreia aquosa com presença de muco, podendo ser sanguinolenta, e dores abdominais (Gomes *et al.*, 2016).

ETEC é caracterizada por produzir pelo menos um dos seguintes tipos de enterotoxinas: termolábeis e/ou termoestáveis e diversos fatores de colonização (Kaper, Nataro e Mobley, 2004; Denamur *et al.*, 2020). Além disso, ETEC causa doença em diversos animais da pecuária, sendo um grande problema para esse setor (Gomes *et al.*, 2016).

1.2.2 Patotipos de *Escherichia coli* extraintestinais

E. coli é o agente etiológico de diversas infecções extraintestinais, sendo o principal responsável por infecções no trato urinário (ITU) (Riley, 2014; Flores-Mireles *et al.*, 2015). Os patotipos extraintestinais responsáveis por causar doenças em humanos são: *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* causadora de meningite em neonatos (MNEC) e *E. coli* causadora de sepse (SEPEC) (Russo e Johnson, 2000). Os patotipos que causam infecções em outros animais são: *E. coli* patogênica aviária (APEC) (Stromberg *et al.*, 2017), *E. coli* patogênica do tecido mamário (MPEC) (Blum *et al.*, 2018) e *E. coli* patogênica do endométrio (EnPEC) (Sheldon *et al.*, 2010).

Diversas linhas de defesa do hospedeiro precisam ser superadas para que amostras UPEC consigam causar ITU, como a esfoliação das células uroepiteliais e o ataque das células

do sistema imune (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Infecções por UPEC iniciam-se mais frequentemente no trato urinário inferior (cistite), onde a bactéria pode se aderir e invadir as células locais. Caso o microrganismo consiga sobreviver ao sistema imune do hospedeiro, ele poderá migrar de forma ascendente e infectar o trato urinário superior (pielonefrite). Além disso, no sistema urinário superior o patógeno pode também ultrapassar a barreira epitelial renal e chegar na corrente sanguínea, acarretando bacteremia e ICS (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Alguns fatores de risco que favorecem a ocorrência de ITU são atividade sexual, faixa etária (sendo mais comum em idosos), posição anatômica da uretra próxima ao ânus (característica do sexo feminino) e procedimentos invasivos, como cateterismos (Foxman e Brown, 2003).

Outros patótipos de ExPEC também são responsáveis por causar infecções em humanos e em animais. MNEC é o agente etiológico mais comum de meningite causada por bactérias gram-negativas (Kim, 2016). Amostras SEPEC geralmente compartilham FV de outros tipos de ExPEC e possuem a capacidade de aderir e invadir células renais *in vitro* (Conceição *et al.*, 2012). APEC pode provocar infecções no trato respiratório, pericardite e esplenomegalia em frangos, sendo um problema para o setor avícola (Collingwood *et al.*, 2014). MPEC é a principal bactéria causadora de mastite em bovinos, uma infecção com importância econômica para o setor pecuário, gerando custos bilionários anuais (Blum *et al.*, 2018). EnPEC está associada com a doença inflamatória pélvica em bovinos e não apresenta a maioria dos FV associados à outras amostras DEC e ExPEC (Sheldon *et al.*, 2010).

1.3 Fatores de virulência em *Escherichia coli* uropatogênica

FV são mecanismos e estratégias presentes nos microrganismos que favorecem a sua patogenicidade no hospedeiro. Amostras de *E. coli* apresentam FV que podem ser divididos em dois grupos: os localizados na superfície bacteriana e os secretados pelo patógeno (Shah *et al.*, 2019). Os principais FV encontrados em UPEC são: adesinas, toxinas, sistemas de aquisição de ferro, polissacarídeos de superfície e mecanismos de evasão do sistema imune (Lüthje e Brauner, 2014; Subashchandrabose e Mobley, 2015; Parvez e Rahman, 2018).

1.3.1 Adesinas

Adesinas são responsáveis pela aderência das cepas de UPEC nos sítios do trato urinário, como a uretra. Esse FV permite que amostras de *E. coli* colonizem regiões que habitualmente não seriam capazes de habitar (Kaper, Nataro e Mobley, 2004). A adesão das amostras UPEC a células do trato urinário permite que linhas de defesa iniciais sejam

ultrapassadas, como o fluxo da urina. (Lüthje e Brauner, 2014; Parvez e Rahman, 2018). A expressão de diferentes adesinas são necessárias para amostras de UPEC colonizarem o hospedeiro, favorecendo também a permanência das amostras bacterianas no trato urinário (Parvez e Rahman, 2018). As adesinas podem ser classificadas quanto ao tipo de estrutura, podendo ser fimbriais ou não-fimbriais, e em relação a resistência à manose, podendo ser sensíveis à manose ou resistentes à manose (Lüthje e Brauner, 2014; Parvez e Rahman, 2018).

A fímbria do tipo 1 é um importante FV em UPEC, pois favorece a adesão do patógeno a diversas células do trato urinário (Parvez e Rahman, 2018), sendo constituída por uma parte adesiva, denominada FimH, que se liga a proteínas α -D-manosiladas, como as uroplaquinas (Zhou *et al.*, 2001; Lüthje e Brauner, 2014). Por causa dessa especificidade, a fímbria do tipo 1 é sensível à manose (Lüthje e Brauner, 2014; Parvez e Rahman, 2018). Além da capacidade de adesão às células do trato urinário, a fímbria do tipo 1 também é responsável por invasão celular (Mulvey *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 2000). O promotor do gene que codifica a fímbria do tipo 1 está localizado em uma região flanqueada por repetições invertidas, e a regulação da produção dessa fímbria ocorre por ação das proteínas recombinases FimB e FimE (que podem alterar a orientação do promotor) (Subashchandrabose e Mobley, 2015).

A fímbria P recebe essa denominação por ser associada aos casos de pielonefrite (Lüthje e Brauner, 2014). Essa fímbria é codificada por genes *pap* localizados em ilhas de patogenicidade (PAI) (Subashchandrabose e Mobley, 2015). A parte adesiva dessa fímbria, PapG, liga-se a porções α -Gal-(1,4)- β -Gal na membrana da célula hospedeira (Parvez e Rahman, 2018). São fímbrias resistentes à manose (Lüthje e Brauner, 2014; Subashchandrabose e Mobley, 2015). A fímbria P está relacionada também com a regulação da motilidade bacteriana (Subashchandrabose e Mobley, 2015). A regulação dos genes que codificam essa fímbria é mediada por competição entre as enzimas Lrp e desoxiadenosina (Dam)-metilase, e ocorre quando os genes da fímbria são expressos através da metilação da região 5'-GATC-3' localizada próxima ao gene *papB*. Genes da fímbria P não são expressos quando acontece a ligação da enzima Lrp na porção 5'-GATC-3', pois a metilação nessa região não é realizada (Hernday *et al.*, 2002; Subashchandrabose e Mobley, 2015). O gene *papB*, quando expresso, promove a transcrição do gene *papI*, que atua na ligação de Lrp em regiões mais distantes do gene *papB*, auxiliando na expressão dos genes da fímbria P (Hernday *et al.*, 2002; Subashchandrabose e Mobley, 2015).

A fímbria curli atua como adesina (Lüthje e Brauner, 2014) e participa na formação do biofilme (Floyd *et al.*, 2015; Carter *et al.*, 2016). Essa fímbria interage com diversas

moléculas do hospedeiro, como a fibronectina e o fibrinogênio (Olsén, Jonsson e Normark, 1989; Olsén *et al.*, 2002), podendo interagir também com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I (Olsén *et al.*, 1998; 2002).

A fímbria F1C possui a capacidade de ligar-se à glicosfingolipídeos no trato urinário (Bäckhed *et al.*, 2002). Fímbria S apresenta afinidade de ligação com os eritrócitos (Parkkinen *et al.*, 1986). Fímbricas da família AFA/Dr são constituídas tanto por adesinas fimbriais quanto não-fimbriais, sendo capazes de realizar a ligação com os eritrócitos e em células do trato urinário (Parvez e Rahman, 2018). A fímbria F9, juntamente com outras, são menos prevalentes, apresentando pouca relevância para a sobrevivência das amostras UPEC (Parvez e Rahman, 2018).

1.3.2 Toxinas

Toxinas são essenciais para a patogenicidade de UPEC. Essas moléculas alteram a integridade das células hospedeiras, favorecendo a penetração do microrganismo aos tecidos mais profundos, obtenção de nutrientes e eliminação de células de defesa (Lüthje e Brauner, 2014; Parvez e Rahman, 2018).

A endotoxina LPS é o principal componente da parede celular em bactérias gram negativas (Lüthje e Brauner, 2014) e promove resistência à fagocitose (Buckles *et al.*, 2009). O LPS é formado por três componentes: o lipídeo A hidrofóbico localizado na parte interior da molécula, o polissacarídeo *core* na região mediana e o antígeno O presente na parte mais externa do LPS (Wang e Quinn, 2010). O lipídeo A está relacionado com a toxicidade do LPS (Lüthje e Brauner, 2014).

A α -hemolisina (HlyA) é uma importante toxina formadora de poros secretada por amostras de UPEC (Wiles e Mulvey, 2013; Subashchandrabose e Mobley, 2015). HlyA recebeu esse nome devido sua ação lítica em eritrócitos, no entanto, também é capaz de agir em diversas células nucleadas (Cavalieri e Snyder, 1982; Gadeberg, Ørskov e Rhodes, 1983; Mobley *et al.*, 1990; Lüthje e Brauner, 2014). HlyA é ativada através de modificações pós-traducionais (Stanley, Koronakis e Hughes, 1998), sendo codificada por um operon composto por quatro genes, denominado *HlyCABD* (Wiles, Kulesus e Mulvey, 2008). O gene *hlyA* é responsável pela síntese da toxina e *hlyC* atua realizando a modificação pós-traducional de HlyA (Wiles e Mulvey, 2013). Os genes *hlyB* e *hlyC* são responsáveis pela exportação da toxina (Wiles e Mulvey, 2013).

O fator necrosante citotóxico 1 (CNF1) é uma toxina do tipo A-B (Boquet, 2001) importante para a patogênese de cepas UPEC. CNF1 apresenta a capacidade de ativar de

forma constitutiva enzimas da família Rho GTPases (Subashchandrabose e Mobley, 2015), provocando a formação de fibras de estresse e protrusões na membrana, favorecendo a invasão celular do patógeno (Bower, Eto e Mulvey, 2005). CNF1 também é capaz de impedir a divisão celular de células eucarióticas, gerando células multinucleadas (Caprioli *et al.*, 1984).

1.3.3 Sistemas de aquisição de ferro

Amostras de *E. coli* necessitam de ferro para o transporte e armazenamento do oxigênio, realização da síntese de DNA, transporte de elétrons e metabolismo de peróxidos (Parvez e Rahman, 2018). Devido à baixa disponibilidade do ferro no trato urinário, as bactérias precisam apresentar sistemas para absorver esse elemento e favorecer o sucesso da colonização no hospedeiro (Lüthje e Brauner, 2014; Parvez e Rahman, 2018).

Sideróforos são moléculas secretadas por amostras UPEC com a função de capturar íons ferro, e são reabsorvidas por receptores após a captura desse íon (Subashchandrabose e Mobley, 2015). Amostras de UPEC apresentam quatro tipos de sistemas de sideróforos, designados como: enterobactina com o receptor *FebA*, salmochelina com o receptor *IroN*, aerobactina com o receptor *IutA* e yersiniabactina com o receptor *FyuA* (Lüthje e Brauner, 2014).

1.3.4 Evasão do sistema imune

Biofilmes são comunidades bacterianas envolvidas por uma matriz extracelular. Neste microambiente, a bactéria pode permanecer protegida de condições adversas (como a ação de antimicrobianos e da resposta do sistema imune do hospedeiro), favorecendo sua colonização (Fux *et al.*, 2005). Fímbria curli, celulose e poli-n-acetilglicosamina são alguns componentes do biofilme encontrados em amostras de *E. coli* (Subashchandrabose e Mobley, 2015).

Outro importante mecanismo de evasão do sistema imune é o mimetismo molecular, que consiste na capacidade do patógeno expressar moléculas semelhantes às do seu hospedeiro. Algumas amostras de UPEC são capazes de produzir a cápsula K1, mimetizando o ácido polissialílico dos hospedeiros, permitindo ocultar antígenos de superfície para que não ocorra a resposta imunológica (Subashchandrabose e Mobley, 2015). A cápsula K2 encontrada em algumas amostras UPEC confere resistência ao sistema complemento (Buckles *et al.*, 2009).

1.4 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos por bactérias da ordem *Enterobacterales* tornou-se um crescente problema mundial. O aumento da disseminação dessas bactérias resistentes já foi relatado em diversas regiões, como América do Sul, América do norte, Ásia e Europa (Cantón *et al.*, 2008; Bonelli, Moreira e Picão, 2013; Xu *et al.*, 2015; Sanchez *et al.*, 2016). As amostras de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemas e cefalosporinas de 3ª geração, incluindo *E. coli*, foram incluídas como patógenos do grupo 1 de prioridade para o desenvolvimento de terapias antimicrobianas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2017).

Uma análise realizada por Tenney e colaboradores (2018) para identificar os fatores de risco para ITU por bactérias resistentes a múltiplas drogas (RMD) compilou os resultados de 25 estudos, incluindo um total de 31.284 pacientes. Após a análise, os autores identificaram como fatores de risco para a aquisição de patógenos RMD: a presença de cateter vesical, hospitalização prévia, uso prévio de antimicrobianos e residir em asilos (Tenney *et al.*, 2018).

1.4.1 Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos

β -lactâmicos estão entre os antimicrobianos mais prescritos para o tratamento de doenças infecciosas (Bush e Bradford, 2016). Essa classe de antimicrobianos atua inibindo a síntese da parede celular bacteriana, ao se ligar com as proteínas de ligação à penicilina (PBP), interrompendo a etapa de transpeptidação, acarretando no bloqueio da síntese de peptidoglicano, e resultando na morte bacteriana (Bush e Bradford, 2016). Existem quatro principais classes de β -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas (Bush e Bradford, 2016).

A resistência aos antimicrobianos da classe β -lactâmicos em bactérias gram-negativas está principalmente relacionada com a produção de enzimas β -lactamases (Bush, 2018). Essas enzimas possuem a capacidade de hidrolisar o anel β -lactâmico dos antimicrobianos dessa classe (Bush, 2018). O primeiro relato de uma enzima β -lactamase foi em 1940, encontrada em *E. coli* (Abraham e Chain, 1940).

As β -lactamases podem ser classificadas de duas maneiras. A primeira classificação, proposta por Ambler (1980), baseia-se na estrutura molecular e sequência de aminoácidos, enquanto a classificação proposta por Bush-Jacoby-Medeiros (1995) está relacionada com a especificidade do substrato e com a capacidade das enzimas de serem bloqueadas por determinados inibidores (Ambler, 1980; Bush, Jacoby e Medeiros, 1995).

As β -lactamases das classes A, C e D de Ambler são chamadas de serino- β -lactamases, devido à presença de serina em seu sítio ativo. Já as enzimas da classe B são chamadas de metallo- β -lactamases, pois necessitam de um íon de zinco em seu sítio ativo (Bush, 2018; Tooke *et al.*, 2019). As β -lactamases, segundo a classificação de Bush-Jacoby-Medeiros, podem ser divididas nos grupos funcionais 1, 2 e 3 (Bush e Jacoby, 2009; Bush, 2018). O Grupo 1 engloba as cefalosporinases (correspondem a classe C de Ambler) e não são inibidas por ácido clavulânico nem EDTA (Bush e Jacoby, 2010; Bush 2018). O Grupo 2 corresponde às serino- β -lactamases (classes A e D de Ambler), sendo o maior grupo dessas enzimas (Bush e Jacoby, 2010; Bush 2018). Nesse grupo, encontram-se enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas (Bush 2018). O Grupo 3 engloba as metallo- β -lactamases (Classe B de ambler), que são enzimas capazes de hidrolisar carbapenemas e não são inibidas por ácido clavulânico, porém são inibidas por EDTA e outros quelantes de íons (Bush e Jacoby, 2010; Bush 2018).

β -lactamases de espectro estendido (ESBL) pertencem principalmente à classe A de Ambler e Grupo 2 de Bush-Jacoby-Medeiros, com exceção das ESBL do tipo OXA que pertencem à classe D de Ambler (Bush, 2018; Tooke *et al.*, 2019). Essas enzimas apresentam a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. No entanto, não hidrolisam cefamicinas nem carbapenemas. Além disso, ESBL são bloqueadas por inibidores clássicos de β -lactamases, como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Paterson e Bonomo, 2005). Entre as principais famílias de ESBL, estão: do tipo TEM, SHV, CTX-M e OXA (Bush, 2018).

Carbapenemas constituem uma importante classe de β -lactâmicos, pois frequentemente são utilizados como última linha de tratamento para amostras de *Enterobacteriaceae* portadoras de ESBL (Duin e Doi, 2017). Carbapenemases pertencem às classes A, B e D de Ambler (Queenan e Bush, 2007) e muitas hidrolisam penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas e aztreonam, deixando limitadas as opções de tratamento (Haller *et al.*, 2018).

1.4.2 Mecanismos de resistência às quinolonas e fluoroquinolonas

As quinolonas inibem a síntese de DNA bacteriano, agindo nas enzimas DNA girase e topoisomerase IV. Durante o processo de síntese de DNA, as quinolonas são capazes de se ligarem no sítio ativo de clivagem do complexo enzima-DNA, induzindo uma quebra permanente da dupla fita de DNA, resultando na morte bacteriana (Aldred, Kerns e Osheroff, 2014). A resistência às quinolonas e fluoroquinolonas pode ser classificada em três tipos:

resistência na molécula alvo, resistência plasmidial e resistência cromossômica (Aldred, Kerns e Osheroff 2014; Correia *et al.*, 2017).

A resistência na molécula alvo ocorre através de mutações nos genes que codificam as enzimas DNA girase e topoisomerase IV, reduzindo a afinidade dos antimicrobianos por essas enzimas (Aldred, Kerns e Osheroff 2014, Correia *et al.*, 2017).

A resistência plasmidial acontece por três mecanismos distintos: ação codificada por genes da família *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e bombas de efluxo (Aldred, Kerns e Osheroff 2014).

As proteínas codificadas por genes *qnr* são divididas em seis grupos: QnrA, QnrB, QnrS, QnrC, QnrD e QnrVC (Correia *et al.*, 2017). Qnr pode conferir resistência por: (i) diminuição da quantidade de ligações de DNA girase e topoisomerase IV no DNA bacteriano, reduzindo o número de alvos disponíveis para a ação dos antimicrobianos, (ii) ligação das proteínas Qnr na DNA girase e topoisomerase IV, impedindo a entrada das fluoroquinolonas nos complexos de clivagem formados pelas enzimas (Aldred, Kerns e Osheroff 2014).

O gene *aac(6')-Ib-cr* codifica uma proteína variante de uma aminoglicosídeo acetiltransferase, apresentando duas modificações de aminoácidos específicas, W102R e D179Y (Robicsek *et al.*, 2006; Aldred, Kerns e Osheroff 2014). Essa enzima acetila ciprofloxacina (CIP) e norfloxacina (NOR), reduzindo a atividade desses antimicrobianos (Robicsek *et al.*, 2006; Aldred, Kerns e Osheroff 2014).

O terceiro mecanismo de resistência plasmidial às quinolonas é a produção das bombas de efluxo OqxAB e QepA (Hansen *et al.*, 2007; Yamane *et al.*, 2007; Cattoir, Poirel e Nordmann, 2008; Aldred, Kerns e Osheroff 2014).

A resistência cromossômica pode ocorrer por baixa expressão de porinas e por aumento da produção das bombas de efluxo (Ruiz, 2003). A membrana externa das bactérias gram-negativas age como uma barreira adicional para a entrada desses antimicrobianos (Aldred, Kerns e Osheroff 2014).

1.4.3 Mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos ligam-se ao ribossomo bacteriano, inibindo a síntese proteica do microrganismo, conseqüentemente, causando a morte bacteriana (Garneau-Tsodikova e Labby, 2016). A resistência aos aminoglicosídeos ocorre principalmente por enzimas capazes de modificar a estrutura do antimicrobiano tornando-os inativos, por exemplo, através de fosforilação (aminoglicosídeo fosforiltransferase [APH]), de acetilação (aminoglicosídeo acetiltransferase [AAC]), ou de adenilação (aminoglicosídeo nucleotidiltransferase [ANT]) (Smith e Baker, 2002; Poole, 2005).

Além disso, a parede celular bacteriana age como uma barreira natural impedindo a entrada do antimicrobiano na célula e as bombas de efluxo atuam expelindo os aminoglicosídeos para o meio extracelular (Garneau-Tsodikova e Labby, 2016). Outro mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos é por meio de mutações nos genes que codificam ou modificações enzimáticas que ocorrem na estrutura dos alvos ribossômicos (Garneau-Tsodikova e Labby, 2016).

1.4.4 Mecanismos de resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim

Trimetoprim (TMP) é um inibidor competitivo da enzima bacteriana dihidrofolato redutase (DHFR) (Cockerill e Edson, 1991). Sulfametoxazol pertence à classe das sulfonamidas, sendo um inibidor da enzima dihidropteroato sintase (DHPS) (Cockerill e Edson, 1991). Ambos os fármacos interrompem as vias de síntese do ácido folínico, impedindo a síntese do DNA bacteriano (Cockerill e Edson, 1991).

Dentre os mecanismos que ocasionam a resistência a TMP estão: a superexpressão da enzima DHFR, que ocorre por mutação no promotor do gene *dhfr* (Huovinen, 2001) e mutações no próprio gene *dhfr*, codificando uma enzima modificada (Dale *et al.*, 1997; Huovinen, 2001). A resistência às sulfonamidas pode ocorrer devido a mutações no gene *dhps* cromossômico ou pode ser mediada por plasmídeos, através da ação de três enzimas DHPS resistentes que são codificadas pelos genes *sulI*, *sulII* e *sulIII* (Sköld, 2000; Poirel *et al.*, 2018). Além disso, as bombas de efluxo e alterações na permeabilidade da membrana também podem conferir resistência tanto a TMP quanto às sulfonamidas (Huovinen, 2001).

1.5 Clones de *Escherichia coli*

Clones são microrganismos de um mesmo grupo sendo classificados como semelhantes por determinado método de tipificação (Riley, 2014). Os principais métodos para a tipagem de clones baseados em sequenciamento do DNA são o sequenciamento do genoma completo (SGC) e o *multilocus sequence typing* (MLST) (Riley, 2014; Manges *et al.*, 2019).

A técnica MLST baseia-se na análise de alelos dos genes do metabolismo central do microrganismo, chamados genes *housekeeping* (Maiden *et al.*, 1998; Maiden, 2006). Com base nas variações entre os alelos de cada gene analisado comparado com as sequências de referência depositadas em um banco de dados de acesso público, a amostra recebe uma designação numérica que passa a ser seu perfil alélico. Baseado nesse perfil, as amostras são classificadas em diferentes *sequence type* (ST) (Maiden *et al.*, 1998; Maiden, 2006). Para *E.*

coli são analisados sete genes *housekeeping*: *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA* (Wirth *et al.*, 2006).

Amostras de *E. coli* são classificadas em diferentes ST que estão incluídos nos complexos clonais (CC). ST que compartilham 5 ou mais alelos idênticos entre si são agrupados no mesmo CC (Wirth *et al.*, 2006).

Os CC são amplamente encontrados em animais, meio ambiente e alimentos. Um trabalho realizou uma meta-análise de estudos (n=217) que abordaram o SGC ou o MLST em amostras de infecções intestinais e extraintestinais executados entre 1995 e 2018 encontrou uma diversidade de clones de *E. coli* (Manges *et al.*, 2019). Neste estudo os autores identificaram vinte ST (ST131, ST69, ST10, ST405, ST38, ST95, ST648, ST73, ST410, ST393, ST354, ST12, ST127, ST167, ST58, ST88, ST617, ST23, ST117 e ST1193) associados com infecções extraintestinais (Manges *et al.*, 2019). Dentre esses ST, um grupo limitado de clones pandêmicos, ST69, ST73, ST95 e ST131, tem sido associado com maior frequência com infecções adquiridas na comunidade (especificamente, ITU) e com infecções relacionadas aos cuidados com a saúde (especialmente ICS) (Riley, 2014; Denamur *et al.*, 2020).

A técnica *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) é considerada muito útil para a tipagem bacteriana e consiste na utilização de enzimas de restrição para realizar cortes no genoma do microrganismo (Tenover *et al.*, 1995; Neoh *et al.*, 2019). Os genomas fragmentados migram em um gel de agarose dentro de um campo pulsado, gerando um perfil de bandas (Tenover *et al.*, 1995; Neoh *et al.*, 2019). Através desse método de tipagem, as amostras podem ser classificadas em: (i) geneticamente indistinguíveis, quando possuem um perfil de bandas indistinguível, (ii) intimamente relacionadas, se diferirem em duas ou três bandas, (iii) possivelmente relacionadas, se diferirem em quatro a seis bandas e (iv) não relacionadas, se diferirem em sete ou mais bandas (Tenover *et al.*, 1995). No entanto, como essa é uma técnica demorada e laboriosa, juntamente com o avanço da tecnologia, outras abordagens passaram a serem utilizadas para a tipificação de amostras, como as já citadas MLST, SGC e *random amplified polymorphic DNA* (RAPD).

A técnica RAPD também se baseia na análise de perfis de bandas e consiste na utilização de iniciadores arbitrários sem muita especificidade, provocando ampliações aleatórias no genoma do microrganismo. Após uma corrida de eletroforese, será gerado um perfil de bandas que serão consideradas o *fingerprint* da amostra (Madico, Akopyants e Berg, 1995). Amostras com *fingerprints* indistinguíveis são consideradas clonais (Madico, Akopyants e Berg, 1995).

1.5.1 *Escherichia coli* sequence type 69

1.5.1.1 Características gerais de *Escherichia coli* sequence type 69

Em 2001, Manges e colaboradores analisaram uma coleção composta de 386 amostras de *E. coli* obtidas de uma coorte de mulheres com ITU adquirida na comunidade (ITU-AC) de três estados Norte americanos: Califórnia, Michigan e Minnesota (Manges *et al.*, 2001). Através da amplificação de sequências consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC2-PCR) foi identificado nessa coleção um grupo clonal, denominado grupo clonal A (CgA). Dentre as 386 amostras, 46 (45%) resistentes a sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) pertenciam ao CgA. Em outro estudo, realizado para analisar o poder discriminatório de um protocolo de MLST comparado com outros métodos de tipagem (Tartof *et al.*, 2005), foram analisadas 45 amostras de *E. coli*, incluindo amostras isoladas no estudo de Manges e colaboradores (2001). As amostras antes pertencentes ao CgA foram classificadas como sendo do CC69 (Tartof *et al.*, 2005).

Amostras do CC69 pertencem ao grupo filogenético D e são identificadas principalmente em espécimes obtidos de ITU e ICS, sendo distribuídas em diversas regiões do mundo, como Austrália, Brasil, Canadá, Chile, Grécia e Estados Unidos (Manges *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2011; Riley, 2014). Cepas do ST69 geralmente são RMD, frequentemente incluindo resistência a SXT (Johnson *et al.*, 2005). No entanto, são raras as amostras do ST69 produtoras de ESBL (Riley, 2014). Amostras do ST69 geralmente carregam um único cassete de genes (*dfra17-aadA15*) que codificam dihidrofolato redutase e aminoglicosídeo adeniltransferase em um integron de classe 1 (Solberg, Ajiboye e Riley, 2006).

Amostras de *E. coli* do ST69 já foram isoladas de diversas fontes além de infecções humanas. Amostras desse ST produtoras de ESBL foram encontradas em cães domésticos na Finlândia (Grönthal *et al.*, 2018), uma resistente à colistina foi encontrada em queijo de leite não-pasteurizado no Egito (Hammad *et al.*, 2018), e algumas foram encontradas em esgoto urbano na Espanha (Colomer-Lluch *et al.*, 2013). Campos e colaboradores (2013) identificaram duas amostras do ST69 resistentes a tetraciclina em saladas comercializadas prontas para consumo em Portugal (Campos *et al.*, 2013). Amostras desse ST também já foram isoladas de camelos (Carvalho *et al.*, 2020).

Apesar de ser pouco comum amostras do ST69 produtoras de ESBL, estudos na China, Coreia do Sul e Japão identificaram amostras desse ST produtoras de *bla_{CTX-M-14}* (Kim *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2012; Matsumura *et al.*, 2012). Uma amostra produtora de *bla_{CTX-M-8}* isolada de espécime de urina foi encontrada no Brasil (Campos *et al.*, 2018).

Um estudo analisou a virulência *in vivo* de diversas amostras de *E. coli* uropatogênicas de diferentes ST no modelo de *Galleria mellonella*. Foi observado que as amostras pertencentes ao ST69, juntamente com as do ST127, foram as mais letais nesse modelo animal. Amostras do ST69 e ST127 tiveram, respectivamente, um LD50 mediano de $1,59 \times 10^4$ UFC/10 μ l e $1,17 \times 10^4$ UFC/10 μ l, um valor menor quando comparado com o LD50 de amostras dos ST73, 95 e 131 (Alghoribi *et al.*, 2014).

1.5.1.2 Revisão da literatura sobre *Escherichia coli* sequence type 69

A revisão bibliográfica sobre amostras do ST69 foi realizada através de pesquisa no buscador PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). O termo: “(*Escherichia coli* ST69) OR (*Escherichia coli* clonal group A)” foi utilizado para o levantamento dos artigos publicados. Um total de 101 trabalhos publicados no período de 2001 até 2020 foi encontrado utilizando esse termo. Além desse total, foram adicionados manualmente dois estudos em que o ST69 foi previamente caracterizado como CgA (Manges *et al.*, 2001 e Johnson *et al.*, 2005), totalizando 103 trabalhos. O número total dos estudos encontrados separados de acordo com o ano de publicação está mostrado na Figura 1.

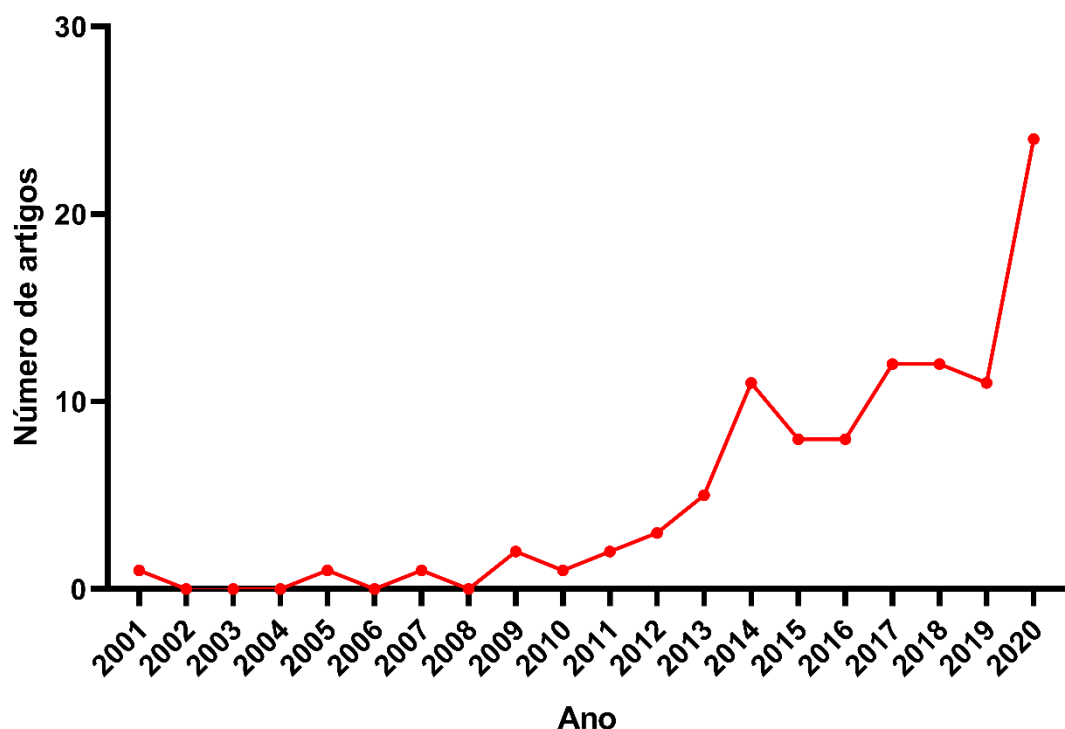


Figura 1 – Distribuição dos trabalhos encontrados envolvendo amostras *Escherichia coli* do ST69 no período de 2001 a 2020 por ano de publicação.

A análise inicial dos 103 artigos mostrou um aumento na quantidade de trabalhos envolvendo amostras de *E. coli* do ST69 ao longo dos anos, alcançando o número de 24 artigos publicados durante ano de 2020. Algumas hipóteses para esse aumento podem ser: (i) o crescimento na vigilância epidemiológica dos clones de *E. coli* responsáveis por causar infecções tanto em humanos quanto em outros animais e (ii) a redução no custo dos métodos de tipagem, como o MLST.

O critério utilizado para a inclusão dos artigos na revisão foi a seleção de artigos de epidemiologia que demonstrassem a prevalência do ST69 isolados de espécimes clínicos humanos em determinada região. Foram excluídos da revisão todos os artigos que não demonstrassem a prevalência desse ST, estudos sobre amostras ambientais e/ou animais não humanos, trabalhos de revisão e artigos para a avaliação de novas técnicas e/ou metodologias. Após a avaliação utilizando os critérios de seleção, dentre os 103 artigos iniciais, o número final de artigos inclusos na revisão foi 43. A lista completa com todos os 43 artigos inclusos na revisão está contida no Anexo 1.

Após a análise da revisão dos artigos, foi observado que amostras de *E. coli* do ST69 foram identificadas em todos os continentes, reforçando o caráter pandêmico desse ST. A Ásia apresentou o maior número de trabalhos realizados (n=15). O segundo continente com a maior quantidade de trabalhos Europa (n=13), seguido da América do Norte (n=7) e América do Sul (n=6). África e Oceania tiveram um estudo cada (Figura 2). Todos os seis estudos envolvendo o ST69 na América do Sul foram realizados no Brasil, sendo cinco realizados no Rio de Janeiro (Dias *et al.*, 2009a, 2009b; de Souza da-Silva *et al.*, 2017, 2020; Campos *et al.*, 2018) e um em Salvador (Berman *et al.*, 2014). A distribuição temporal e geográfica dos estudos analisados é mostrada na Figura 3.

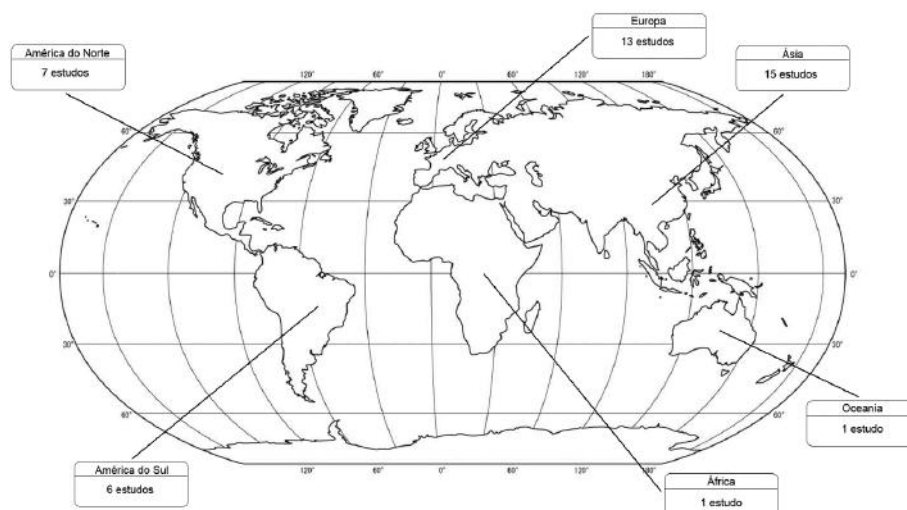


Figura 2 – Distribuição geográfica dos 43 estudos epidemiológicos envolvendo o ST69.

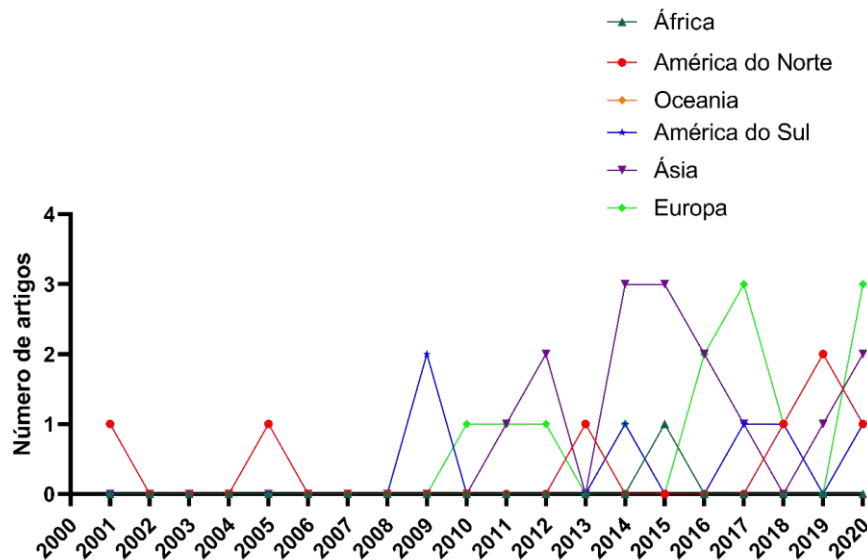


Figura 3 – Distribuição temporal e geográfica dos estudos envolvendo ST69 da revisão

Dentre os 43 artigos inclusos na revisão, amostras do ST69 foram as mais frequentes na coleção de 5 (12%) (Dias *et al.*, 2009b; Berman *et al.*, 2014; Nüesch-Inderbinen *et al.*, 2017; Karami, Wold e Adlerberth, 2017; de Souza da-Silva *et al.*, 2020). A Tabela 1 mostra os espécimes clínicos em que as amostras de *E. coli* do ST69 foram isoladas e a prevalência relacionada com cada espécime de isolamento. O espécime mais comum em que as amostras foram isoladas foi urina, em 18 estudos. Além disso, alguns estudos isolaram amostras do ST69 de urina juntamente com outros espécimes clínicos, como sangue, fezes e ferida. Um total de oito estudos isolaram amostras do ST69 de sangue e um estudo, de fezes.

Nos estudos em que amostras do ST69 foram isoladas de espécimes de urina, o valor encontrado para a mediana e moda da frequência foi dois. Nos estudos em que as amostras foram isoladas de sangue, a mediana da frequência foi três e a moda ficou igualmente distribuída entre três e quatro. Já no único trabalho em que amostras de *E. coli* foram isoladas exclusivamente de fezes, o ST69 foi o 6º mais frequente (Tabela 1).

A taxa de frequência das amostras de *E. coli* do ST69 variou geograficamente (Figura 4). A maior prevalência desse clone foi de 26% (n=49/192) no trabalho de Manges e colaboradores em 2001, realizado nos Estados Unidos. Nesse estudo, dentre as 192 amostras tipificadas, a maioria apresentou resistência a SXT (Manges *et al.*, 2001). E a menor prevalência do ST69 foi de 1% (n=7/581) em um estudo realizado no Japão que foram tipadas apenas amostras produtoras de ESBL (Matsumura *et al.*, 2012).

A maior taxa de amostras do ST69 encontrada na América do Sul foi de 15% (n=77) identificada em amostras de ITU-AC no Rio de Janeiro, Brasil (de Souza da-Silva *et al.*,

2020). Na Europa, a maior taxa de amostras desse ST foi de 25% (n=6) em um estudo realizado na Dinamarca em que foram analisadas apenas amostras produtoras de OXA-244 (Hammerum *et al.*, 2020). O estudo com maior taxa de amostras do ST69 na Ásia foi realizado na Indonésia, onde esse ST foi isolado de espécimes clínicos de sangue e compôs 14% (n=3) da coleção (Paramita *et al.*, 2020). No único estudo realizado na África incluído na nossa revisão, as amostras do ST69 compuseram 14% (n=5) das amostras tipificadas (Yahiaoui *et al.*, 2015). Nesse estudo, a coleção continha 150 amostras, porém foram tipadas apenas amostras RMD dos filogrupos B2 e D (n=35). Já o único artigo da Oceania incluso na nossa revisão, foi realizado na Austrália, as amostras do ST69 foram isoladas de espécimes de urina e constituíram 7% (n=5) da coleção (Li *et al.*, 2020).

Tabela 1 – Distribuição da fonte de isolamento das amostras de *Escherichia coli* do ST69 em relação à frequência nos 43 estudos analisados

Espécime clínico	Número de estudos ^a	Frequência das amostras nos estudos ^b	
		Mediana	Moda
Urina	18	2°	2°
Sangue	8	3°	3°/4°
Fezes	1	6°	6°
Urina + Sangue	3	5°	5°
Urina + Ferida	1	3°	3°
Urina + Fezes	1	1°	1°
Urina + Sangue + Fezes	1	2°	2°
Urina + Respiratório + Ferida	1	2°	2°

^a Estudos em que o espécime clínico não foi identificado não foram inclusos na tabela.

^b Três estudos não mostraram a prevalência do ST69 em comparação com outros ST, pois fizeram a busca apenas para ST69 e não foram inclusos no cálculo da frequência.

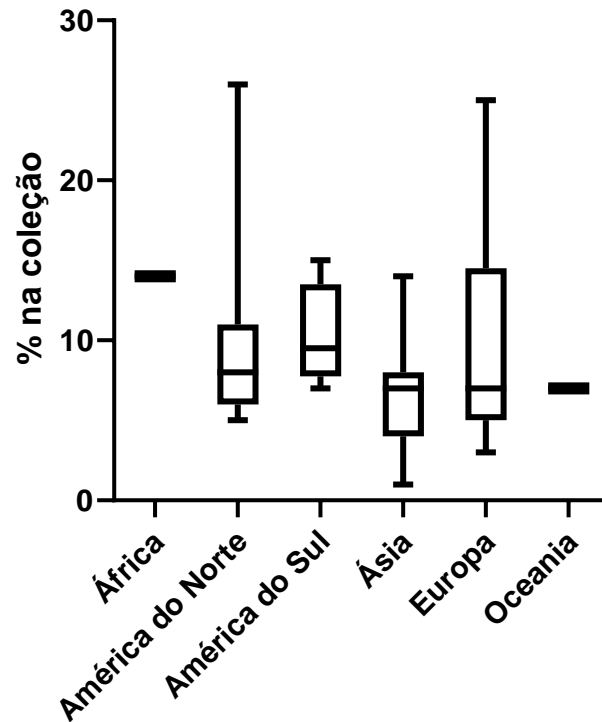


Figura 4 – Distribuição da taxa das amostras do ST69 nas coleções entre os continentes

1.5.2 *Escherichia coli* sequence type 69 no Brasil

O primeiro relato de amostras do CgA no Brasil ocorreu em 2005, quando Johnson e colaboradores analisaram 60 amostras de *E. coli* provenientes de espécimes de urina isoladas de um centro médico universitário em Curitiba (Johnson *et al.*, 2005). Dentre essas 60 amostras, três pertenciam ao CgA, sendo duas resistentes a SXT (Johnson *et al.*, 2005).

Também no ano de 2005, um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa analisou 344 espécimes de urina obtidas de mulheres que procuraram atendimento em dois hospitais no Rio de Janeiro durante os anos de 2005 e 2006 (Dias *et al.*, 2009b). Dentre a coleção, 186 casos foram confirmados como ITU sintomática. Um total de 118 amostras foram confirmadas como *E. coli*, sendo identificadas 15 amostras pertencentes ao CgA por ERIC2-PCR. Do total das amostras incluídas como CgA, 14 (93%) foram resistentes a SXT (Dias *et al.*, 2009b).

No ano de 2013, em um estudo prévio (de Souza da-Silva *et al.*, 2017) caracterizamos quanto à virulência 139 amostras de *E. coli* obtidas de mulheres do estudo realizado em 2005 (Dias *et al.*, 2009b), incluindo nesse momento 12 amostras isoladas de homens com ITU-AC. Dessas 139 amostras, 15 (11%) pertenciam ao ST69 (as mesmas 15 já identificadas na etapa anterior do estudo). Após a caracterização dos FV, nas amostras do ST69 foram identificados genes que codificam adesinas (*fimH*, *papA*, *papGII*, *papGIII*, *afa/draBC*, *sfa/focDE*),

sideróforos (*iutA*, *fyuA*) e invasinas (*traT*, *kpsMII*). Genes de virulência que codificam toxinas não foram encontrados (de Souza da-Silva *et al.*, 2017).

Em 2018, um grupo de pesquisadores realizou um estudo para caracterizar a estrutura populacional de amostras de *E. coli* coletadas de espécimes de urina de pacientes admitidos em quatro hospitais no Rio de Janeiro através do SGC (Campos *et al.*, 2018). Neste estudo, dois clones foram predominantes: ST131 (n=26; 24%), seguido do ST69 (n=9; 8%). Amostras pertencentes ao ST69 apresentaram alta taxa de resistência a SXT (mais de 50% das amostras) e foram suscetíveis a aminoglicosídeos. Entretanto, esse estudo mostrou o perfil de virulência e resistência para amostras restritas ao ambiente hospitalar (Campos *et al.*, 2018).

Em 2020, determinamos a prevalência da resistência aos antimicrobianos e as β -lactamases em uma coleção de amostras de UPEC obtidas na comunidade no Rio de Janeiro durante o ano de 2015 (de Souza da-Silva *et al.*, 2020). De um total de 499 amostras, 77 (15,4%) foram do ST69, sendo esse o mais frequente no estudo e apresentando alta taxa de resistência para CIP (25%). Esse valor foi muito superior em relação ao detectado em 2005, quando nenhuma amostra do ST69 foi resistente a CIP (Dias *et al.*, 2009b). Em 2015, ST131 foi o segundo clone mais frequente, com 45 (9%) amostras. Mostramos que as ITU-AC no Rio de Janeiro foram associadas a dois clones pandêmicos, ST69 e ST131 (de Souza da-Silva *et al.*, 2020).

2 JUSTIFICATIVA

As ITU estão entre as infecções bacterianas mais comuns em humanos, sendo *E. coli* o agente etiológico mais comum nessas infecções (Flores-Mireles *et al.*, 2015). O uso de antimicrobianos em ITU favorece a seleção de amostras UPEC resistentes (Asadi Karam, Habibi e Bouzari, 2019). Amostras de *E. coli* pertencentes ao ST69 correspondem a uma das principais linhagens causadoras de infecções extraintestinais, incluindo ITU e ICS (Riley, 2014; Manges *et al.*, 2019).

Em um estudo prévio realizado pelo nosso grupo, detectamos o perfil de genes de virulência em linhagens selecionadas de UPEC isoladas de indivíduos com ITU-AC, obtidas no ano de 2015 (de Souza da-Silva tese concluída 2018, artigo em processo de escrita). Dentre todos os genes de virulência pesquisados, foi observada uma baixa frequência desses genes nas amostras do ST69, sendo apenas três: *fimH* (91%), *fyuA* (60%) e *traT* (60%) presentes em mais de 50% das amostras (de Souza da-Silva tese concluída 2018, artigo em processo de escrita). A comparação da presença dos genes de virulência das amostras do ST69 de 2015 (n=77 amostras) com as do ST69 da coleção de 2005 (n=15) (de Souza da-Silva *et al.*, 2017) mostrou que a frequência dos genes *papGII* [n=15 (19%) para 2015; n=12 (91%) para 2005], *traT* [n=46 (60%) para 2015; n=14 (93%) para 2005] e para genes que codificam dois sideróforos (*iutA* e *fyuA*) era significativamente menor ($p < 0,03$) na coleção de 2015 (de Souza da-Silva tese concluída 2018, artigo em processo de escrita).

Estes achados evidenciam que as amostras do ST69 responsáveis por causar ITU-AC em indivíduos do Rio de Janeiro exibiam características distintas do perfil de virulência e do perfil de resistência. Nossa hipótese é que essas características possam apresentar uma relação inversa, como identificado nas amostras do ST69 de 2015 que apresentaram aumento na resistência à CIP, e diminuição da quantidade de genes de virulência (de Souza da-Silva tese concluída 2018, artigo em processo de escrita), sugerindo que possa existir uma relação entre esses dois fatores.

Além disso, vimos que, apesar do ST69 ser um dos principais clones de *E. coli* responsáveis por causar infecções extraintestinais, há poucos trabalhos na literatura que busquem caracterizar seus principais FV e genes de resistência, para uma melhor compreensão de sua patogênese nesses sítios extraintestinais.

Dessa forma, torna-se essencial entender os FV que permitem o ST69 obter sucesso em sua colonização e infecção nos sítios além do intestino e também realizar uma investigação entre a relação de FV e a resistência aos antimicrobianos nas amostras desse

clone. Uma compreensão desses aspectos é importante para o desenvolvimento de novas terapias e estratégias capazes de diminuir os impactos das ITU no Rio de Janeiro.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar uma análise temporal do perfil de resistência de amostras de *E. coli* pertencentes ao ST69 isoladas de indivíduos com ITU-AC residentes no estado do Rio de Janeiro obtidas em três períodos: 2005, 2015 e 2019 e realizar uma análise genômica das amostras de 2005.

3.2 Objetivos específicos

Determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos das amostras do ST69 da coleção de 2019.

Comparar o perfil de resistência das amostras do ST69 dos três períodos: 2005, 2015 e 2019.

Pesquisar a presença do gene *fimH* nas amostras do ST69 de 2019.

Realizar uma análise genômica das amostras do ST69 de 2005.

Comparar os genes de resistência e virulência das amostras do ST69 da coleção de 2005 com genomas disponíveis em bancos de dados de amostras desse mesmo ST.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Origem das amostras bacterianas e coleção do estudo

As amostras de *E. coli* foram obtidas de indivíduos com ITU-AC residentes no Rio de Janeiro, provenientes de três estudos desenvolvidos no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM). O primeiro estudo (Dias *et al.*, 2009b; de Souza da-Silva *et al.*, 2017) é composto por 139 amostras obtidas de pacientes atendidos no serviço de pronto-atendimento de dois hospitais no Rio de Janeiro durante os anos de 2005 e 2006. Essas amostras foram identificadas por métodos microbiológicos tradicionais e foram tipadas por MLST. Um total de 15 (11%) amostras correspondeu ao ST69 (Dias *et al.*, 2009b; de Souza da-Silva *et al.*, 2017). O segundo estudo (de Souza da-Silva *et al.*, 2020) foi composto por 499 amostras isoladas durante o ano de 2015. Amostras cultivadas em placas de Petri foram enviadas pelo setor de microbiologia ambulatorial da rede do laboratório Diagnósticos da América S. A. (DASA). Todas as 499 amostras foram submetidas a identificação através de espectrometria de massas por MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time of flight*). Dentre as 499 amostras da coleção, 77 (15%) foram identificadas como pertencentes ao ST69 através de MLST (de Souza da-Silva *et al.*, 2020). O terceiro estudo (Eduardo Moreira de Castro, Tese de Doutorado em andamento, dados não publicados) está sendo realizado com amostras obtidas no ano de 2019, sendo o desenho do estudo semelhante ao do segundo trabalho (de Souza da-Silva *et al.*, 2020). Foram enviadas pelo laboratório DASA 1000 placas de Petri com culturas bacterianas, e 993 amostras foram identificadas como *Escherichia coli*.

Para a identificação das amostras do presente estudo, cada grupo de amostras foi denominado pelo tipo de infecção (ITU) seguido do ano de isolamento, como mostrado na Tabela 2. Assim, a coleção do presente estudo é constituída por: (i) grupo ITU-2005, com 15 amostras de *E. coli* do ST69, com nenhuma resistente a CIP (Dias *et al.*, 2009b; de Souza da-Silva *et al.*, 2017); (ii) grupo ITU-2015, com 77 amostras do ST69, sendo 25 resistentes a CIP, e 52 amostras sensíveis a CIP (de Souza da-Silva, *et al.*, 2020); (iii) grupo ITU-2019, com 101 amostras do ST69. Para o terceiro grupo foram realizados os experimentos de suscetibilidade aos antimicrobianos e a tipificação clonal, como descritos adiante.

Tabela 2 – Identificação das amostras de *Escherichia coli* do ST69 na coleção do estudo

Identificação	Número de amostras	Origem e ano das amostras
ITU-2005	15	1º Estudo ^a , 2005
ITU-2015	77	2º Estudo ^b , 2015
ITU-2019	101	3º Estudo ^c , 2019
Total	193	NA ^d

^aDias *et al.*, 2009b; de Souza da-Silva *et al.*, 2017; ^bde Souza da-Silva *et al.*, 2020; ^cEduardo Moreira de Castro, Tese de Doutorado em andamento (dados não publicados). ^d: não se aplica.

4.2 Tipificação por PCR multiplex

As amostras ITU-2005 e ITU-2015 já foram tipificadas para a determinação do ST através de MLST (Dias *et al.*, 2009b; de Souza da-Silva *et al.*, 2020). As amostras ITU-2019 foram tipificadas para a determinação do ST através de PCR multiplex de acordo com o protocolo descrito por Doumith e colaboradores (2015). Este protocolo permite a identificação de quatro ST pandêmicos (69, 73, 95 e 131) responsáveis por infecções extraintestinais (Doumith *et al.*, 2015). Esta etapa foi realizada em paralelo com o projeto de Doutorado do aluno Eduardo Moreira de Castro.

As amostras ITU-2019 foram cultivadas em TSA por aproximadamente 18 horas. Após o crescimento, foi escolhida uma colônia com o auxílio de uma alça microbiológica, que foi suspensa em um microtubo contendo 200µl de água destilada autoclavada. O microtubo com a suspensão foi agitado com auxílio de um vórtex por 30 segundos para lise das células bacterianas e liberação do material genético.

A PCR foi realizada com volume final 10µl, composto por 5µl de MasterMix Green (2X), 2,4µl de água destilada, 0,2µl de cada iniciador a 0,2µM (Tabela 3) e 1µl de DNA da amostra. A condição de ciclagem foi: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, em seguida 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos (Doumith *et al.*, 2015). Os controles utilizados na reação foram: *E. coli* ATCC BAA-457 para ST69; D20 para ST131; D150 para ST73; e D127 para ST95 (amostras de *E. coli* D20, D150 e D127 são da coleção ITU-2015).

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% com tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5X. Para a corrida foi utilizado o marcador “100pb DNA ladder” (Invitrogen®). A condição de corrida foi 100 volts por aproximadamente 60 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio (solução estoque 10mg/mL) (Sigma®, St.

Louis, EUA). As imagens foram visualizadas sob a luz ultravioleta com o equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare®).

Tabela 3 – Iniciadores, sequência e tamanho do *amplicon* para a tipagem do ST por PCR

Iniciador	Sequência	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb^a)
ST69_for	ATCTGGAGGCAACAAGCATA	104
ST69_rev	AGAGAAAGGGCGTTCAGAAT	
ST73_for	TGGTTTTACCATTTTGTCGGA	490
ST73_rev	GGAAATCGTTGATGTTGGCT	
ST95_for	ACTAATCAGGATGGCGAGAC	200
ST95_rev	ATCACGCCATTAATCCAGT	
ST131_for	GACTGCATTTTCGTCGCCATA	310
ST131_rev	CCGGCGGCATCATAATGAAA	

Doumith *et al.*, 2015; ^a pb: pares de base.

4.3 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos e teste de dupla difusão para identificação da produção de ESBL

As amostras ITU-2005 e ITU-2015 já foram caracterizadas quanto ao perfil de resistência em estudos anteriores (Dias *et al.*, 2009b; de Souza da-Silva *et al.*, 2020). Para as amostras ITU-2019, foi realizado o antibiograma de acordo com a padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021). Os antimicrobianos utilizados para esse teste estão descritos na Tabela 4.

Apesar das amostras da coleção ITU-2005 já apresentarem o perfil de resistência descrito por Dias e colaboradores (2009b), no presente estudo foi realizado o teste de suscetibilidade novamente para essa coleção para a utilização dos agentes antimicrobianos padronizados de acordo com o CLSI 2021. Para a confirmação do resultado do antibiograma e do teste de disco aproximação das amostras da coleção ITU-2005, os resultados dos dois testes foram analisados tendo como referências o documento CLSI 2005 e o CLSI 2021.

Para a realização do teste, as amostras ITU-2005 e ITU-2019 foram cultivadas em ágar TSA pela técnica de esgotamento e incubadas na estufa por aproximadamente a 32°C por 18 horas. Após crescimento, uma alçada da amostra foi suspensa em solução salina a 0,85% para obtenção da turvação da escala 0,5 de MacFarland. Com o auxílio de um *swab*, a

suspensão foi semeada de maneira confluyente em placas com ágar Mueller-Hinton. Após a secagem da sementeira, discos contendo os antimicrobianos foram adicionados na superfície do meio de cultura, com o auxílio de uma pinça estéril. As culturas foram incubadas a 35°C por 16–18 horas. A leitura dos resultados foi realizada por medição dos tamanhos dos halos formados e as amostras foram classificadas como sensíveis, intermediárias ou resistentes de acordo com o CLSI (2021). No presente estudo, as amostras intermediárias e resistentes foram agrupadas como não suscetíveis. As amostras foram classificadas em RMD caso fossem não suscetíveis a pelo menos um antimicrobiano de, no mínimo, três categorias diferentes (Magiorakos *et al.*, 2012).

Para a detecção de produção de ESBL foi realizado o teste de dupla difusão (Jarlier *et al.*, 1988). No centro da placa com ágar Mueller Hinton foi adicionado o disco com amoxicilina-clavulanato (AMC) (30µg). Em seguida, os discos de ceftazidima (CAZ) (30µg), cefotaxima (CTX) (30µg), cefepima (FEP) (30µg) e aztreonam (ATM) (30µg) a uma distância de 25mm, de centro a centro, ao disco de AMC, como representado na Figura 5. A amostra foi considerada produtora de ESBL quando uma distorção nos halos de inibição foi visualizada.

Tabela 4 – Antimicrobianos utilizados no teste de susceptibilidade

Antimicrobiano	Classe
Amicacina (AMK) (30µg)	Aminoglicosídeo
Ampicilina (AMP) (10µg)	Penicilina
Cefuroxima (CXM) (30µg)	Cefalosporina de 2ª geração
Cefoxitina (FOX) (30µg)	Cefalosporina de 2ª geração
Ceftriaxona (CRO) (30µg)	Cefalosporina de 3ª geração
Ciprofloxacina (CIP) (5µg)	Fluoroquinolona
Ertapenem (ETP) (10µg)	Carbapenema
Fosfomicina (FOS) (200µg)	Fosfomicina
Gentamicina (GEN) (10µg)	Aminoglicosídeo
Nitrofurantoína (NIT) (300µg)	Nitrofurano
Sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) (25µg)	Inibidores da via dos folatos

4.4 Detecção do gene *fimH*

As amostras ITU-2005 e ITU-2015 já foram caracterizadas quanto a presença do gene *fimH* em trabalhos anteriores. As amostras ITU-2019 foram caracterizadas quanto à presença desse gene através de PCR simplex descrito no protocolo de Dias e colaboradores (2010). Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 5.

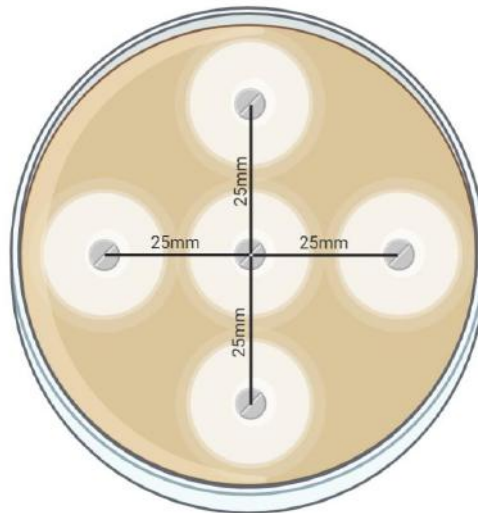


Figura 5 – Esquema representando a placa com os discos de antimicrobianos utilizados no teste de dupla difusão para detectar produção de ESBL

As amostras ITU-2019 foram cultivadas em TSA para o crescimento das colônias por aproximadamente 18 horas. Após o crescimento bacteriano, foi escolhida uma colônia e adicionada em suspensão de 200µl de água destilada autoclavada no microtubo. A suspensão foi submetida a agitação com auxílio de um vórtex por 30 segundos para lise das células bacterianas e liberação do material genético.

A PCR foi realizada com volume final de 10µl, composto por 5µl de MasterMix Green, 1µl do iniciador *fimH*-f (10pmol), 1µl do iniciador *fimH*-r (10pmol), 1µl de água e 2µl de DNA da amostra. As condições de ciclagem para a reação simplex foram: ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido de 33 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos e anelamento a 72°C por 1 minuto, e um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos.

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5X. A eletroforese foi sob 100 volts por aproximadamente 60 minutos. Foi utilizado “100 pb DNA ladder” (Invitrogen) como marcador de tamanho de DNA para a corrida eletroforética. O gel foi corado com brometo de etídio (solução estoque 10mg/mL) (Sigma®, St. Louis, EUA). A imagem foi visualizada sob

luz ultravioleta com o equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare®). Como controle positivo da reação foi utilizada a amostra D318.

Tabela 5 – Iniciadores utilizados para detecção do gene *fimH*

PCR	Iniciador	Sequência	Tamanho do amplicon (pb ^b)
Simplex	fimH-f ^a	CGAGTTATTACCCTGTTTGCTG	508
<i>fimH</i>	fimH-r ^a	ACGCCAATAATCGATTGCAC	

^aDias, Moreira e Riley, 2010; ^bpb: pares de base.

4.5 Análise dos genomas das amostras ITU-2005

O sequenciamento das amostras da coleção de 2005 foi realizado durante o estágio de pós-doutorado da pesquisadora do nosso grupo na UC Berkeley DNA Facility (Universidade da Califórnia, Berkeley) em 2016 (Viviane Santos de Sousa, dados não publicados). As sequências foram cedidas para que fosse realizado as análises do presente estudo.

A anotação dos genomas foi feita na plataforma *Pathosystems Resource Integration Center* (PATRIC) (<https://patricbrc.org>) (Brettin *et al.*, 2015; Davis *et al.*, 2020).

A análise genômica das amostras ITU-2005 foi realizada utilizando a plataforma *Center for Genomic Epidemiology* (<https://www.genomicepidemiology.org>). Para a pesquisa dos genes de resistência foi utilizado o *software* ResFinder 4.1 (Zankari *et al.*, 2017; Bortolaia *et al.*, 2020). A pesquisa dos genes de virulência foi feita através do *software* VirulenceFinder 2.0 (Joensen *et al.*, 2014; Malberg Tetzschner *et al.*, 2020). A determinação dos sorotipos foi realizada através do *software* SerotypeFinder 2.0 (Joensen *et al.*, 2015). A determinação do *fimH* foi feita através do *software* FimTyper 1.0 (Roer *et al.*, 2017a). Os parâmetros utilizados para todas as pesquisas foram identidade mínima de 90% e tamanho mínimo de cobertura de 60%. A determinação do número de locus CRISPR foi feito na plataforma PATRIC (Davis *et al.*, 2020).

O escore de virulência de cada amostra foi definido como a soma de todos os genes identificados, sendo os genes *pap* contados uma única vez (Moreno *et al.*, 2006). O escore de resistência foi calculado como a soma de todos os genes de resistência identificados.

4.6 Análise dos genomas de *Escherichia coli* baixados do banco de dados

Para a comparação dos genomas das amostras ITU-2005, foi feito o *download* de 40 genomas de amostras de *E. coli* do ST69 de diferentes espécimes (15 de urina, 15 de sangue e 10 ambientais) do banco de dados Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>) (Zhou *et al.*, 2020). Todas as amostras foram confirmadas como pertencentes ao ST69 através da análise na ferramenta MLST 2.0 (Larsen *et al.*, 2012).

Para a pesquisa dos genes de resistência foi utilizado o *software* ResFinder 4.1 (Zankari *et al.*, 2017; Bortolaia *et al.*, 2020). A pesquisa dos genes de virulência foi feita através do *software* VirulenceFinder 2.0 (Joensen *et al.*, 2014; Malberg Tetzschner *et al.*, 2020). A determinação do *fimH* foi feita através da ferramenta FimTyper 1.0 (Roer *et al.*, 2017a). Os parâmetros utilizados para todas as pesquisas foram, assim como para as amostras ITU-2005, identidade mínima de 90% e tamanho mínimo de cobertura de 60%. Para compararmos os genes de resistência e virulência entre os genomas, criamos 2 *heatmaps* utilizando o *software* GraphPad Prism versão 8.

4.7 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas, foi utilizado o *software* OpenEpi versão 3.0.1 (<https://www.openepi.com/>) (Dean, Sullivan e Soe, 2013). Para as comparações entre as variáveis, foi realizado o teste exato de Fisher sendo considerado um resultado estatisticamente significativo o valor de *p* inferior a 0,05.

4.8 Aspectos éticos

A realização desse trabalho contou com a aprovação do CEP sob os números 196/04 e 79238217.6.0000.5257.

5 RESULTADOS

5.1 Taxa de ST69 nas amostras da coleção ITU-2019

Como mostrado na Tabela 2, após a realização do PCR multiplex para a tipagem das amostras da coleção ITU-2019, dentre as 993 amostras identificadas como *E. coli*, 937 foram submetidas ao rastreamento dos ST (69, 73, 95 e 131) sendo identificadas 101 (11%) como pertencentes ao ST69. A comparação da frequência das amostras do ST69 nos três períodos está mostrada na Figura 6. No presente estudo foi observado uma diminuição na frequência do ST69 na coleção ITU-2019 (n=101; 11%) comparado com a coleção ITU-2015 (n=77; 15%), sendo esse resultado estatisticamente significativo ($p=0,01$).

Frequência do ST69 ao longo dos anos

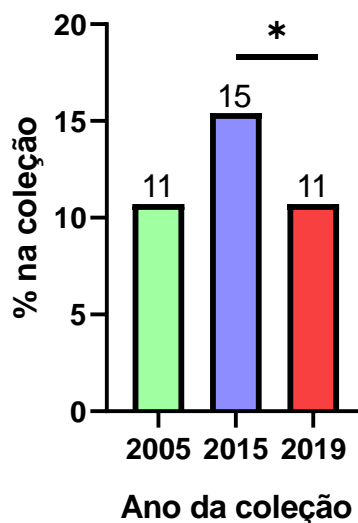


Figura 6 – Frequência do ST69 na coleção durante os três períodos.

5.2 Características sociodemográficas da coleção ITU-2019

Dentre as 101 amostras de *E. coli* do ST69 na coleção ITU-2019, 99 (98%) foram isoladas de espécimes de urina de mulheres e duas (2%) isoladas de espécimes de homens. A Tabela 6 contém a divisão por sexo entre as amostras dos três períodos. A idade média entre os pacientes da coleção ITU-2019 foi 56,4 anos. A idade mínima foi um ano e a máxima foi 91 anos. A Tabela 7 mostra a distribuição dos indivíduos em três categorias: < 18 anos, 18–59 anos e >59 anos. O grupo mais frequente na coleção ITU-2019 foi a faixa etária entre 18–59 anos (n=52; 51,5%) seguido dos pacientes com 60 anos ou mais (n=46; 45,5%). Um total de três (3%) pacientes era menor de 18 anos.

Houve um aumento no número de adultos (18–59 anos) com ITU-AC na coleção de 2019 em relação a 2015, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p=0,04$). Além disso, observamos também uma diminuição significativa ($p=0,02$) nos casos de ITU-AC em indivíduos menores de 18 anos na coleção de 2019 comparada com a coleção de 2015 (Tabela 7).

Tabela 6 – Distribuição das amostras do ST69 de acordo com o sexo dos indivíduos nas coleções ITU-2005, 2015 e 2019

Sexo	Coleção			<i>p</i>		
	Amostras (%)			<i>p</i> ^a	<i>p</i> ^b	<i>p</i> ^c
	ITU-2005 N=15	ITU-2015 N=77	ITU-2019 N=101			
Feminino	15 (100)	74 (96)	99 (98)	> 0,9	> 0,9	0,7
Masculino	0 (0)	3 (4)	2 (2)	> 0,9	> 0,9	0,7

p^a: 2005 vs 2015; *p*^b: 2005 vs 2019; *p*^c: 2015 vs 2019.

Tabela 7 – Distribuição das amostras do ST69 por faixa etária dos indivíduos nas coleções ITU-2005, 2015 e 2019

Faixa etária	Coleção			<i>p</i>
	Amostras (%)			<i>p</i> ^a
	ITU-2005 N=15	ITU-2015 N=77	ITU-2019 N=101	
< 18	N.A ^b	10 (13)	3 (3)	0,02
18–59	N.A	27 (35)	52 (51,5)	0,04
> 59	N.A	40 (52)	46 (45,5)	0,4

p^a 2015 vs 2019; N.A^b Não há informação da faixa etária para a coleção ITU-2005

5.3 Perfil de não suscetibilidade das amostras das coleções ITU-2005 e ITU-2019

O antibiograma realizado para as amostras ITU-2005 no presente estudo apresentou resultado diferente em relação ao perfil de resistência para as mesmas amostras obtidas em 2005 (Tabela 8). Algumas amostras tornaram-se mais suscetíveis a quatro antimicrobianos no antibiograma atual quando comparadas ao primeiro antibiograma realizado no estudo prévio (Dias *et al.*, 2009b), no entanto, essa diferença não foi significativa (Tabela 8). Embora os resultados dos perfis de suscetibilidade tenham diferido, o resultado do antibiograma atual foi

o selecionado para análises posteriores, pois foi analisado de acordo com o CLSI atualizado (2021) sendo também incluídos antimicrobianos não testados no antibiograma de 2005.

O resultado do antibiograma para as amostras ITU-2019 está descrito na Tabela 9. Dentre as 101 amostras, as maiores taxas de não suscetibilidade foram para AMP (n= 53; 52%), SXT (n= 42; 42%), CIP (n= 11; 11%) e AMC (n=10; 10%). Uma baixa frequência na não suscetibilidade foi observada para GEN, AMK e CTX, todos com 2% ou menos das amostras não suscetíveis para cada antimicrobiano. Todas as amostras foram suscetíveis para: ATM, FEP, FOX, CRO, CXM, ETP, FOS e NIT. Nenhuma amostra foi produtora de ESBL e 9 (9%) foram classificadas como RMD. O Quadro 1 mostra o perfil de não suscetibilidade das amostras ITU-2019.

Quando comparada com amostras da coleção de 2005, as amostras ITU-2019 foram significativamente mais suscetíveis à AMP, CXM e SXT ($p < 0,05$). Quando comparadas com a coleção de 2015 as amostras ITU-2019 foram sensíveis a AMP, CXM, CIP, GEN, NIT e SXT, sendo essa diferença significativa com $p < 0,05$ (Tabela 9) (Figura 7).

Quadro 1 – Perfil de não suscetibilidade das amostras ITU-2019

Número de amostras	Perfil de não suscetibilidade
33	Pan suscetíveis
23	AMP + SXT
12	AMP
8	SXT
5	AMC + AMP
4	AMC + AMP + SXT
4	AMP + CIP
3	CIP
2	AMP + CIP + SXT
2	AMP + GEN + SXT
2	CIP + SXT
1	AMK + AMP + SXT
1	AMC
1	CTX

Pan suscetíveis: amostras sensíveis a todos os antimicrobianos testados; AMP: ampicilina; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; AMC: amoxicilina-clavulanato; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; AMK: amicacina; CTX: cefotaxima.

Tabela 8 – Comparação do antibiograma realizado no estudo prévio em 2005 com o realizado no presente estudo para as mesmas amostras da coleção ITU-2005

Antimicrobianos	Coleção ITU-2005 N=15				<i>p</i>
	Antibiograma antigo		Antibiograma atual		
	Suscetíveis	Não suscetíveis	Suscetíveis	Não suscetíveis	
Amicacina	15 (100)	0	15 (100)	0	–
Amoxicilina-clavulanato	12 (80)	3 (20)	15 (100)	0	0,2
Ampicilina	1 (7)	14 (93)	2 (13)	13 (87)	> 0,9
Aztreonam	N.A ^a	N.A	15 (100)	0	–
Cefepima	N.A	N.A	15 (100)	0	–
Cefotaxima	15 (100)	0	15 (100)	0	–
Cefoxitina	13 (87)	2 (13)	15 (100)	0	0,4
Ceftazidima	15 (100)	0	15 (100)	0	–
Ceftriaxona	N.A	N.A	15 (100)	0	–
Cefuroxima	13 (87)	2 (13)	13 (87)	2 (13)	–
Ciprofloxacina	15 (100)	0	15 (100)	0	–
Ertapenem	15 (100)	0	15 (100)	0	–
Fosfomicina	14 (93)	1 (7)	15 (100)	0	> 0,9
Gentamicina	15 (100)	0	15 (100)	0	–
Nitrofurantoína	15 (100)	0	15 (100)	0	–
Sulfametoxazol-timetoprim	1 (7)	14 (93)	1 (7)	14 (93)	–
ESBL ^b		0		0	–
RMD ^c		5 (33)		1 (7)	0,2

^aN.A: antimicrobianos não testados no estudo prévio; ^bESBL: β-lactamase de espectro estendido; ^cRMD: resistente à múltiplas drogas

Tabela 9 – Resultado do antibiograma das coleções de amostras do ST69 dos três períodos

Antimicrobianos	Número de amostras (%)						<i>p</i>		
	ITU-2005 N=15		ITU-2015 N=77		ITU-2019 N=101		<i>p</i> ^a	<i>p</i> ^b	<i>p</i> ^c
	Suscetível	Não Suscetível	Suscetível	Não Suscetível	Suscetível	Não Suscetível			
AMK	15 (100)	0	77 (100)	0	100 (99)	1 (1)	–	> 0,9	> 0,9
AMC	15 (100)	0	70 (91)	7 (9)	91 (90)	10 (10)	0,5	0,4	> 0,9
AMP	2 (13)	13 (87)	15 (20)	62 (80)	48 (48)	53 (52)	0,8	0,02	<0,001
ATM	15 (100)	0	74 (96)	3 (4)	101 (100)	0	> 0,9	–	0,1
FEP	15 (100)	0	77 (100)	0	101 (100)	0	–	–	–
CTX	15 (100)	0	77 (100)	0	100 (99)	1 (1)	–	> 0,9	> 0,9
FOX	15 (100)	0	77 (100)	0	101 (100)	0	–	–	–
CAZ	15 (100)	0	77 (100)	0	101 (100)	0	–	–	–
CRO	15 (100)	0	77 (100)	0	101 (100)	0	–	–	–
CXM	13 (87)	2 (13)	63 (82)	14 (18)	101 (100)	0	0,9	0,03	<0,001
CIP	15 (100)	0	52 (68)	25 (32)	90 (89)	11 (11)	0,01	0,4	<0,001
ETP	15 (100)	0	77 (100)	0	101 (100)	0	–	–	–

FOS	15 (100)	0	77 (100)	0	101 (100)	0	–	–	–
GEN	15 (100)	0	70 (91)	7 (9)	99 (98)	2 (2)	0,5	> 0,9	0,07
NIT	15 (100)	0	70 (91)	7 (9)	101 (100)	0	0,5	–	0,005
SXT	1 (7)	14 (93)	16 (21)	61 (79)	59 (58)	42 (42)	0,3	<0,001	<0,001
ESBL		0		0		0	–	–	–
RMD		1 (7)		27 (35)		9 (9)	0,04	> 0,9	<0,001

AMK: amicacina; AMC: amoxicilina-clavulanato; AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; FEP: cefepima; CTX: cefotaxima; FOX: cefoxitina; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CXM: cefuroxima; CIP: ciprofloxacina; ETP: ertapenem; FOS: fosfomicina; GEN: gentamicina; NIT: nitrofurantoína; SXT: sulfametoxazol-timetoprim; ESBL: β -lactamase de espectro estendido; RMD: resistència à múltiplas drogas; p^a : 2005 vs 2015; p^b : 2005 vs 2019; p^c : 2015 vs 2019.

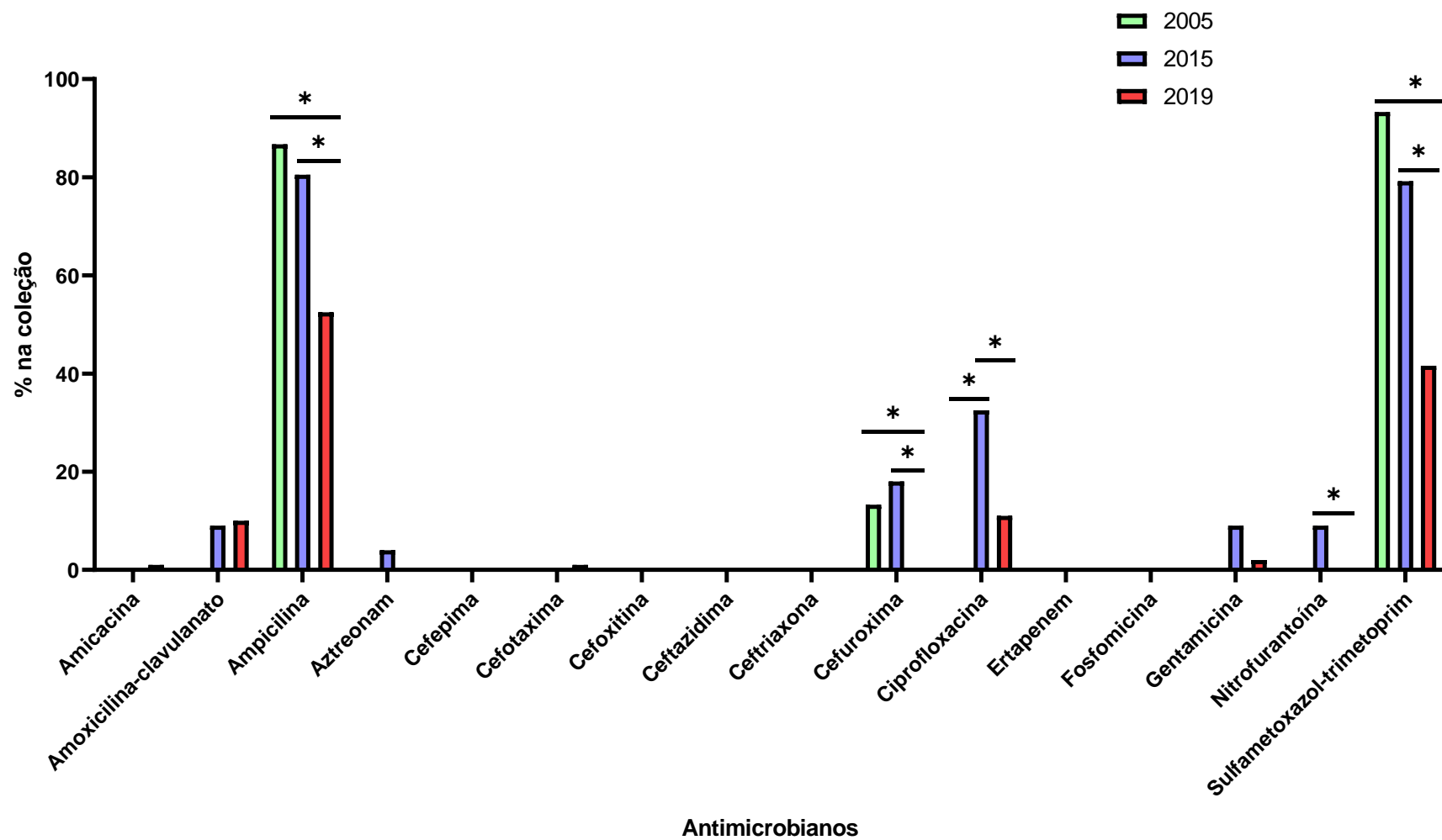


Figura 7 – Frequência de não suscetibilidade entre as amostras do ST69 dos três períodos. *p < 0,05

5.4 Pesquisa do gene *fimH* amostras ITU-2019

O gene *fimH* foi detectado em 95 (94%) amostras na coleção ITU-2019. A Tabela 10 mostra a frequência do *fimH* nas amostras do ST69 dos três períodos. A frequência desse gene nas coleções ITU-2005 e ITU-2015 foi de 100% e 91%, respectivamente.

Tabela 10 – Presença do gene *fimH* nas amostras de *Escherichia. coli* dos três períodos

Coleção	Amostras		p^a	p^b	p^c
	N(%)				
	Total	<i>fimH</i>			
ITU-2005	15	15 (100)			
ITU-2015	77	70 (91)	0,5	0,8	0,6
ITU-2019	101	95 (94)			

^a 2005 vs 2015; ^b 2005 vs 2019; ^c 2015 vs 2019.

5.5 Análise do genoma das amostras ITU-2005

Todas as amostras apresentaram o gene *fimH* alelo 27. O sorotipo O153:H2 foi o mais frequente (n=8; 53%), seguido dos sorotipos O11:H18 (n=4; 27%), O17/O44:H18 (n=2; 13%) e O15:H18 (n=1; 7%). O conteúdo G-C das amostras variou entre 50,6 e 50,7% e todas as amostras possuem dois locus CRISPR (Tabela 11).

Foram encontrados 17 genes de resistência entre as amostras da coleção ITU-2005 (Figura 8). Os genes *mdf(A)* e *sitABCD* foram os mais frequentes e presentes em todas as 15 amostras. *qacE* e *sulI* foram encontrados em 13 (87%) amostras; *aadA5*, *bla_{TEM-1B}* e *dfrA17* encontrados em 12 (80%) amostras; *aph(3'')*-*Ib*, *aph(6)-Id* e *sul2* encontrados em 11 (73%) amostras; *mph(A)* em 10 (67%); *tet(B)* em nove (60%); *catA1* encontrado em seis (40%) amostras; *tet(A)* em duas (13%) amostras e os genes *aadA1*, *dfrA1* e *mph(B)* encontrados em uma única amostra (Figura 8). O escore de resistência de cada amostra é mostrado na Tabela 12.

Foram identificados 34 genes de virulência entre as amostras da coleção ITU-2005 e foram divididos em cinco categorias: adesinas, toxinas, sideróforos, cápsula e miscelânea (Figura 9). Os genes de virulência mais frequentes foram: *air*, *lpfA*, *chua*, *sitA*, *kpsE*, *eilA*, *iss*, *ompT* e *terC* presentes em todas as 15 amostras. Os genes *fyuA*, *irp2* e *traT* foram encontrados em 14 (93%) amostras. Os genes *iha*, *sat*, *iucC* e *iutA* foram encontrados em 13 (87%) amostras. Os genes *papA_fsiA_F16*, *papC* e *kpsMII_K52* foram encontrados em 12 (80%)

amostras. O gene *senB* foi encontrado em 11 (73%) amostras. O escore de virulência de cada amostra está descrito na Tabela 12.

Tabela 11 – Características gerais dos genomas das amostras da coleção ITU-2005

Amostra	ST	sorotipo	<i>fimH</i>	tamanho do genoma (pb)	%G+C	Locus CRISPR
HMMC-015	69	O17/O44:H18	27	5,205,010	50.6	2
HMMC-018	69	O11:H18	27	5,268,974	50.6	2
HMMC-034	69	O153:H2	27	5,311,621	50.7	2
HMMC-082	69	O11:H18	27	5,239,790	50.6	2
HMMC-110	69	O153:H2	27	5,322,749	50.6	2
HMMC-151	69	O11:H18	27	5,345,197	50.6	2
HMMC-170	69	O153:H2	27	5,232,041	50.7	2
HMMC-199	69	O153:H2	27	5,163,767	50.7	2
HMMC-201	69	O15:H18	27	5,047,130	50.7	2
HMMC-221	69	O153:H2	27	5,164,539	50.7	2
HMMC-250	69	O153:H2	27	5,290,270	50.6	2
HMMC-347	69	O153:H2	27	5,207,765	50.7	2
HMMC-364	69	O11:H18	27	5,299,207	50.7	2
HMMC-366	828 ^a	O17/O44:H18	27	5,172,742	50.6	2
HMMC-414	69	O153:H2	27	5,336,719	50.6	2

^a *Single locus variant* do ST69

Genes de resistência

	<i>aadA1</i>	<i>aadA5</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>aph(6)-Id</i>	<i>bla_{TEM-1B}</i>	<i>catA1</i>	<i>dfxA1</i>	<i>dfxA17</i>	<i>mdf(A)</i>	<i>mph(A)</i>	<i>mph(B)</i>	<i>qacE</i>	<i>sitABCD</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>
HMMC-015	Verde	Branco	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde	Branco	Branco	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco
HMMC-018	Branco	Verde	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Verde	Verde	Verde	Branco	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco	Branco
HMMC-034	Branco	Branco	Verde	Verde	Branco	Branco	Branco	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde	Branco	Verde	Branco	Verde
HMMC-082	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde	Verde	Verde	Branco	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Verde
HMMC-110	Verde	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde
HMMC-151	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco	Branco	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Verde
HMMC-170	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Verde
HMMC-199	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Verde
HMMC-201	Branco	Branco	Verde	Verde	Branco	Branco	Branco	Verde	Branco	Branco	Branco	Branco	Verde	Branco	Verde	Verde	Branco
HMMC-221	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Verde
HMMC-250	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco	Branco	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco
HMMC-347	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde	Verde	Verde	Branco	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Verde
HMMC-364	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco	Branco	Verde	Verde	Verde	Branco	Verde	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco
HMMC-366	Verde	Branco	Branco	Branco	Branco	Verde	Branco	Verde	Branco	Branco	Branco	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde
HMMC-414	Verde	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Verde	Verde	Branco	Branco	Verde	Verde	Verde	Branco	Branco	Branco

Figura 8 – Genes de resistência encontrados nas amostras da coleção ITU-2005. Quadrados brancos indicam ausência, quadrados verdes indicam presença.

Tabela 12 – Escore de virulência e resistência nas amostras da coleção ITU-2005

Amostra	Escore de virulência	Escore de resistência
HMMC-015	18	12
HMMC-018	19	8
HMMC-034	20	9
HMMC-082	19	13
HMMC-110	23	8
HMMC-151	19	12
HMMC-170	19	13
HMMC-199	18	13
HMMC-201	14	7
HMMC-221	18	13
HMMC-250	19	10
HMMC-347	19	13
HMMC-364	19	11
HMMC-366	19	7
HMMC-414	19	6

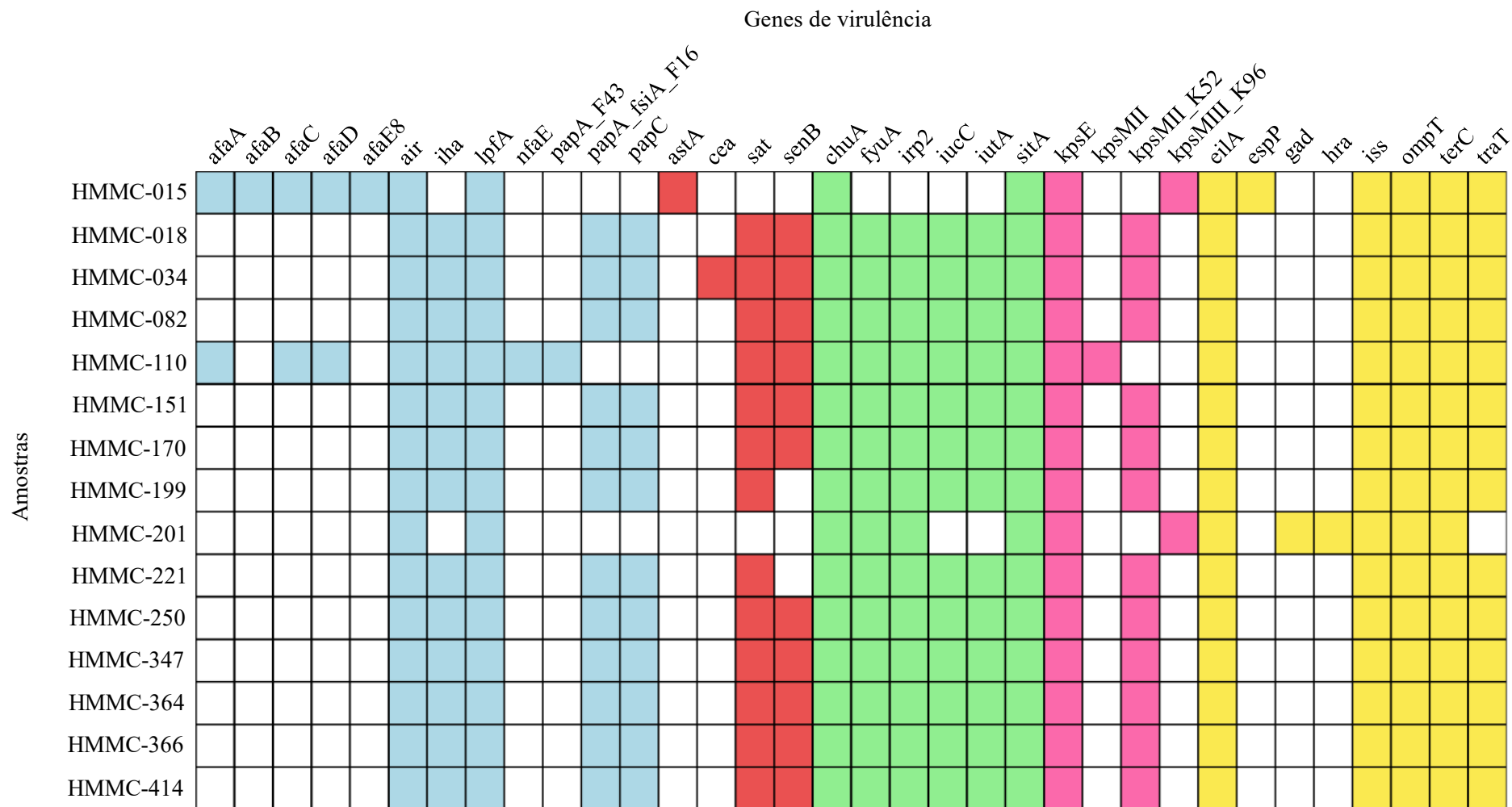


Figura 9 – Distribuição dos genes de virulência nas amostras da coleção ITU-2005. Quadrados coloridos indicam presença, quadrados brancos indicam ausência. Adesinas: azul; toxinas: vermelho; sideróforos: verde; cápsula: rosa; miscelânea: amarelo.

5.6 Análise dos genomas do banco de dados

Os 40 genomas recuperados do banco de dados Enterobase foram divididos em três coleções: Urina (n=15), Sangue (n=15) e Ambiental (n=10). Um percentual de 80% (n=8) das amostras da coleção Ambiental apresentou o *fimH27* e 20% (n=20) das amostras apresentaram o *fimH47*. O gene *fimH27* foi identificado em 14 (93%) amostras da coleção Sangue, e *fimH483* foi encontrado em apenas uma amostra dessa coleção. Todas as amostras da coleção Urina apresentaram o *fimH27* (Anexo 2). O perfil de resistência e virulência das amostras estão detalhados nos Anexos 3 e 4, respectivamente.

O escore de resistência das amostras da coleção Ambiental variou de 1 a 13 (Tabela 13). Os genes de resistência mais frequentes nessa coleção foram: *mdf(A)* presente em todas as amostras; *sitABCD* em 70% (n=7) das amostras; *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id* presentes em 6 (60%) amostras e *bla_{TEM-1B}* em 50% (n=5) das amostras. Já o escore de virulência dessa coleção variou entre 8 e 24 (Tabela 14). Os genes de virulência mais encontrados nas amostras da coleção Ambiental foram: *air*, *lpfA*, *chuA*, *kpsE*, *eilA*, e *terC* presentes em todas as amostras; *sitA*, *gad* e *iss* em 90% (n=9) das amostras e *ompT* e *traT* em 8 (80%) amostras.

Tabela 13 – Informações sobre o escore de resistência das coleções ITU-2005, Urina, Sangue e Ambiental

Coleção	Total de amostras	Valor mínimo	Valor máximo	Média	Desvio padrão
ITU-2005	15	6	13	10	2,6
Urina	15	2	13	8	3,91
Sangue	15	2	13	6,8	3,63
Ambiental	10	1	13	7,1	4,04

Tabela 14 – Informações sobre o escore de virulência das coleções ITU-2005, Urina, Sangue e ambiental

Coleção	Total de amostras	Valor mínimo	Valor máximo	Média	Desvio padrão
ITU-2005	15	14	23	18,8	1,78
Urina	15	11	26	17	4,45
Sangue	15	10	23	17,7	3,65
Ambiental	10	8	24	15	5,01

Na coleção Sangue, o escore de resistência entre as amostras variou de 2 a 13 (Tabela 13). Os genes de resistência mais frequente nas amostras dessa coleção foram: *mdf(A)* presente em todas as amostras; *sitABCD* encontrado em 12 (80%) amostras e *bla_{TEM-1B}*, encontrado em 60% (n=9) das amostras. O escore de virulência variou entre 10 e 23 (Tabela 14). Os genes mais identificados foram: *air*, *lpfA*, *chuA*, *sitA*, *kpsE*, *gad*, *iss*, *ompT* e *terC* encontrados em todas as 15 amostras; *eilA* identificado em 93% (n=14) das amostras e *fyuA*, *irp2* e *traT* encontrados em 80% (n=12) das amostras.

Na coleção Urina, o escore de resistência variou entre 2 e 13 (Tabela 13). Os genes mais frequentes nessa coleção foram: *mdf(A)* presente em todas as amostras; *sitABCD* encontrado em 87% (n=13) das amostras; *bla_{TEM-1b}* presente em 67% (n=10) das amostras e *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id* e *sul2* encontrados em 9 (60%) amostras. O escore de virulência variou entre 11 e 26 (Tabela 14). Genes de virulência mais frequentes entre as amostras foram: *air*, *lpfA*, *chuA*, *eilA*, *gad* e *terC*, presentes em todas as 15 amostras; *sitA*, *kpsE* e *iss* presentes em 93% (n=14) das amostras; *fyuA* e *irp2* identificados em 87% (n=13) das amostras e *ompT* e *traT*, encontrados em 12 (80%) amostras.

5.7 Comparação entre os genomas das amostras ITU-2005 e do banco de dados

Para a comparação dos genomas da coleção ITU-2005 com os baixados do banco de dados Enterobase foram construídos dois *heatmaps* com todos os genes de resistência, virulência e mutações que poderiam conferir resistência presentes nos genomas. As Tabelas 15 e 16 mostram, respectivamente, a comparação dos genes de resistência e virulência encontrados na coleção ITU-2005 em relação às coleções Urina, Sangue e Ambiental. A análise da comparação da resistência mostrou uma diferença significativa para os genes: *aadA5*, *aadA17*, *qacE*, *sull* e *tet(B)* (ITU-2005 vs coleção Ambiental, $p < 0,04$); *qacE* e *sull* (ITU-2005 vs coleção sangue, $p = 0,02$); e *tet(B)* (ITU-2005 vs coleção urina, $p < 0,05$) (tabela 15).

O gene *mdf(A)* foi encontrado em todos os 55 genomas analisados. Nas quatro coleções, entre os genes que codificam β -lactamases, *bla_{TEM-1B}* foi o mais encontrado. Nas coleções ITU-2005 e Urina, não foram identificados genes que codificam ESBL, no entanto, o gene *bla_{CMY-2}* (que codifica uma β -lactamase do tipo *ampC*) foi identificado na coleção Urina. Nas coleções Sangue e Ambiental foram encontrados genes codificadores de ESBL (Figura 10) (Anexo 3). Entre os genes que conferem resistência a TMP, *dfrA17* foi o mais frequente nas quatro coleções, sendo a frequência desse gene estatisticamente significativa na coleção ITU-2005 em relação a coleção Ambiental ($p = 0,03$). Em relação a resistência à sulfonamidas,

o gene *sul1* foi significativamente mais frequente na coleção ITU-2005 do que nas coleções Sangue ($p=0,02$) e Ambiental ($p=0,01$) (Tabela 15). O gene *sul2* também foi encontrado nas quatro coleções (Figura 10).

Entre os genes que codificam enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, *aadA5*, que confere resistência a estreptomicina e espectinomicina foi o mais frequentemente encontrado nas amostras da coleção ITU-2005 ($n=12$; 80%). Já na coleção Urina, os mais encontrados foram *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id* ($n=9$; 60%). Na coleção Sangue, três genes foram os mais encontrados: *aadA5*, *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id* ($n=6$; 40%). Na coleção Ambiental, os mais encontrados foram *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id* ($n=6$; 60%).

aadA5 foi significativamente mais frequente na coleção ITU-2005 do que na coleção Ambiental ($p=0,009$) (Tabela 15). O gene *qacE*, que promove resistência a compostos de amônio quaternário, foi significativamente mais frequente na coleção ITU-2005 do que nas coleções Sangue ($p=0,02$) e Ambiental ($p=0,01$) (Tabela 15). O gene *tet(B)* (que promove a resistência a tetraciclina) foi significativamente frequente na coleção ITU-2005 do que na coleção Urina ($p=0,02$) e Ambiental ($p=0,03$) (Tabela 15).

Na coleção ITU-2005, 10 amostras foram identificadas com o gene *mph(A)*, que confere resistência a macrolídeos, e uma única amostra com o gene *mph(B)*. Nas coleções Sangue e Urina, 40% ($n=6$) das amostras apresentaram o gene *mph(A)*. Na coleção Ambiental, quatro (40%) amostras apresentaram esse gene.

Na coleção ITU-2005 uma amostra apresentou a mutação S57T no gene *parC*. Essa mesma mutação também ocorreu em uma amostra da coleção Ambiental. A mutação S80I no gene *parC* foi identificada em duas (20%) amostras da coleção Ambiental, e em uma amostra da coleção Sangue e da coleção urina [1 (7%) para cada amostra das coleções, respectivamente]. Além disso, mutações no gene *parE* foram encontradas na coleção Urina.

Não foram encontradas mutações no gene *GyrA* na coleção ITU-2005. Na coleção Urina, seis (40%) amostras apresentaram a mutação S83L em *GyrA* ($p=0,01$) e uma amostra apresentou a mutação D87N nesse gene. Na coleção Ambiental, 2 (20%) amostras apresentaram a mutação S83L em *GyrA*, essa mesma mutação foi encontrada em 33% ($n=5$) das amostras na coleção Sangue ($p=0,04$).

Em relação aos genes de virulência, a frequência de 10 genes na coleção ITU-2005 foi significativamente maior em relação a coleção Ambiental: *iha* ($p=0,002$), *papA_fsiA_F16* ($p<0,001$), *papC* ($p=0,001$), *sat* ($p=0,002$), *senB* ($p=0,02$), *fyuA* ($p=0,04$), *irp2* ($p=0,04$), *iucC* ($p=0,01$), *iutA* ($p=0,01$) e *kpsMII_K52* ($p=0,001$). Os genes *air*, *lpfA*, *chuA* e *terC* foram encontrados em todos os 55 genomas. O gene *gad* foi significativamente menor na coleção

ITU-2005 do que nas outras 3 coleções: Urina ($p < 0,001$), Sangue ($p < 0,001$) e Ambiental ($p < 0,001$).

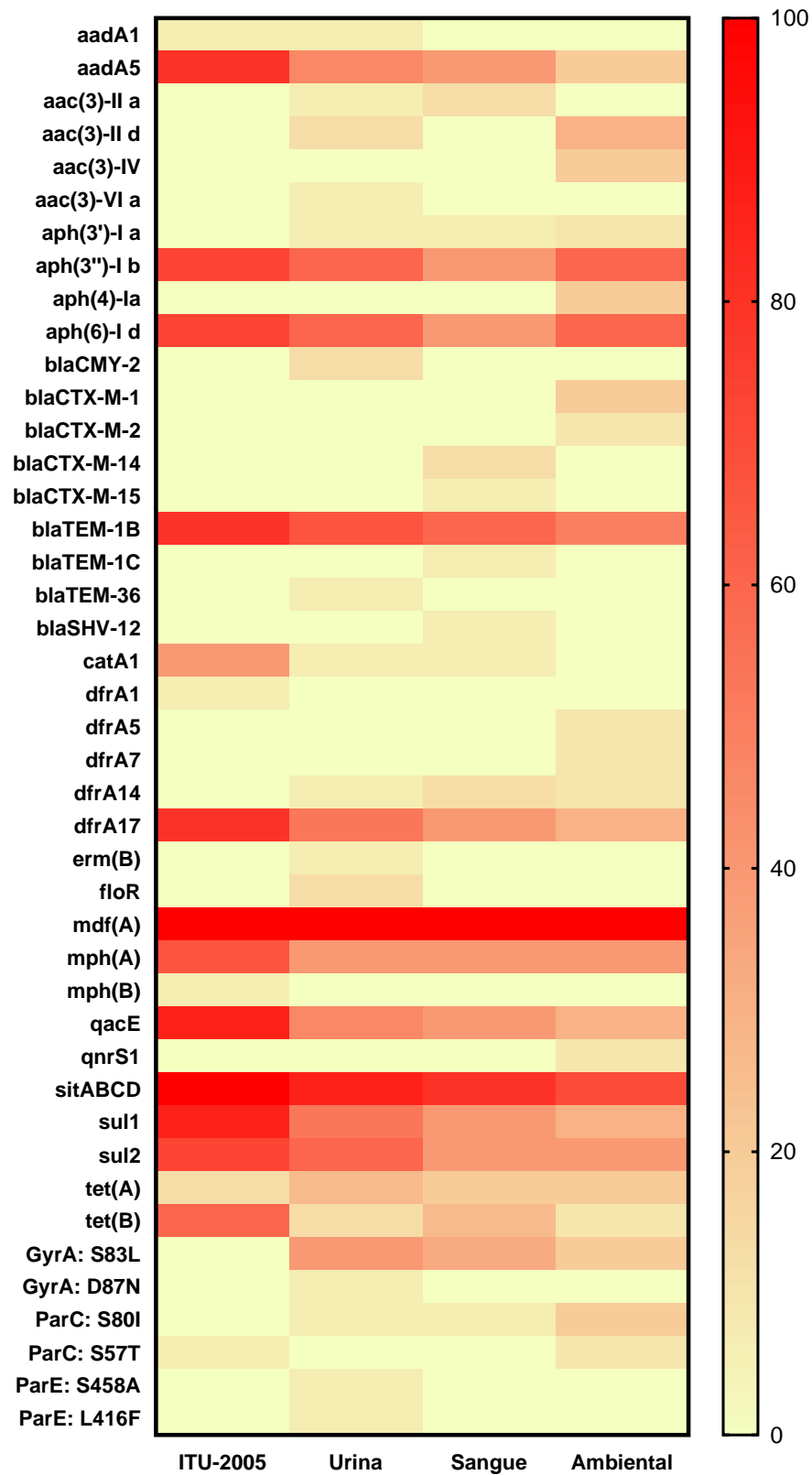


Figura 10 – Distribuição dos genes de resistência e das mutações encontradas nos 55 genomas analisados

Tabela 15 – Comparação dos genes de resistência encontrados na coleção ITU-2005 com as coleções Urina, Sangue e Ambiental

Gene	Coleção				P		
	Amostras (%)				<i>p</i> ^a	<i>p</i> ^b	<i>p</i> ^c
	ITU-2005 N = 15	Urina N = 15	Sangue N = 15	Ambiental N = 10			
<i>aadA1</i>	1 (7)	1 (7)	0	0	> 0,9	> 0,9	> 0,9
<i>aadA5</i>	12 (80)	7 (47)	6 (40)	2 (20)	0,1	0,06	0,009
<i>aph(3'')-Ib</i>	11 (73)	9 (60)	6 (40)	6 (60)	0,6	0,1	0,7
<i>aph(6)-Id</i>	11 (73)	9 (60)	6 (40)	6 (60)	0,6	0,1	0,7
<i>bla_{TEM-1B}</i>	12 (80)	10 (67)	9 (60)	5 (50)	0,6	0,4	0,2
<i>catA1</i>	6 (40)	1 (7)	1 (7)	0	0,08	0,08	0,06
<i>dfrA1</i>	1 (7)	0	0	0	> 0,9	> 0,9	> 0,9
<i>dfrA17</i>	12 (80)	8 (53)	6 (40)	3 (30)	0,2	0,06	0,03
<i>mdf(A)</i>	15 (100)	15 (100)	15 (100)	10 (100)	–	–	–
<i>mph(A)</i>	10 (67)	6 (40)	6 (40)	4 (40)	0,2	0,2	0,3
<i>mph(B)</i>	1 (7)	0	0	0	> 0,9	> 0,9	> 0,9
<i>qacE</i>	13 (87)	7 (47)	6 (40)	3 (30)	0,05	0,02	0,01
<i>sitABCD</i>	15 (100)	13 (87)	12 (80)	7 (70)	0,4	0,2	0,1
<i>sul1</i>	13 (87)	8 (53)	6 (40)	3 (30)	0,1	0,02	0,01
<i>sul2</i>	11 (73)	9 (60)	6 (40)	4 (40)	0,6	0,1	0,2
<i>tet(A)</i>	2 (13)	4 (27)	3 (20)	2 (20)	0,6	> 0,9	> 0,9
<i>tet(B)</i>	9 (60)	2 (13)	4 (27)	1 (10)	0,02	0,1	0,03

^a ITU-2005 vs Urina; ^b ITU-2005 vs Sangue; ^c ITU-2005 vs Ambiental

Genes do operon *afa* foram encontrados em duas amostras da coleção ITU-2005: HMMC-015 (*afaA*, *afaB*, *afaC*, *afaD* e *afaE8*) e HMMC-110 (*afaA*, *afaC*, *afaD*) (Figura 11). Na coleção Sangue, uma única amostra apresentou os genes desse operon (*afaA*, *afaB*, *afaC*, *afaD* e *afaE8*) (Anexo 4). Nas coleções Urina e Ambiental, não foram identificadas amostras carreadoras de genes *afa*.

Foram encontrados nove genes relacionados a produção de colicinas e/ou microcinas (*cea*, *cia*, *cma*, *cvaC*, *mcbA*, *mchB*, *mchC*, *mchF*, *mcmA*) entre as amostras das quatro

coleções. Na coleção ITU-2005, apenas o gene *cea* foi identificado e em uma única amostra (Figura 10). Entre as amostras da coleção Urina, foram encontrados os genes *cvaC* (n=1; 7%), *mcbA* (n=1; 7%) *mchB* (n=1; 7%), *mchC* (n=1; 7%), *mcmA* (n=1; 7%) e *mchF* (n=2; 13%) (Anexo 4). Na coleção Sangue, foram encontradas amostras carreadoras dos genes *mcbA* (n=3; 20%), *mchB* (n=1; 7%), *mchC* (n=1; 7%), *mcmA* (n=1; 7%) e *mchF* (n=1; 7%). Na coleção Ambiental, foram identificados os genes *cia* (n=2; 20%), *cmA* (n=1; 10%), *cvaC* (n=2; 20%) e *mchF* (n=2; 20%).

Entre as amostras isoladas de espécimes clínicos, a presença dos genes *chuA*, *fyuA*, *irp2*, *iucC*, *iutA* e *sitA* (que são relacionados com a captação de íons ferro) foi conservada. Todos esses genes foram identificados em mais de 50% das amostras das coleções ITU-2005, Urina e Sangue (Figura 11 e Tabela 16). Nas amostras das três coleções provenientes de espécimes clínicos (ITU-2005, Urina e Sangue), os genes que codificam toxinas mais frequentemente encontrados foram *sat* e *senB*. Em 54 (98%) genomas foi encontrado o gene *kpsE*, um dos responsáveis pela exportação do polissacarídeo (Rosenow *et al.*, 1995) (Tabela 16). Entre os genes *kpsM*, o gene *kpsMII_K52* foi o mais frequente nas coleções ITU-2005, Urina e Sangue (Figura 11 e Tabela 16). Nas quatro coleções, os genes *iss* e *traT* (que conferem resistência ao soro) foram altamente encontrados, sendo identificados em pelo menos 80% das amostras de cada coleção (Figura 11 e Tabela 16). O gene *eilA* foi encontrado em 54 (98%) dos 55 genomas analisados.

Tabela 16 – Comparação dos genes de virulência encontrados na coleção ITU-2005 com as coleções Urina, Sangue e Ambiental

Gene	Coleção				P		
	Amostras (%)				<i>p</i> ^a	<i>p</i> ^b	<i>p</i> ^c
	ITU-2005 N = 15	Urina N = 15	Sangue N = 15	Ambiental N = 10			
<i>afaA</i>	2 (13)	0	1 (7)	0	0,4	> 0,999	0,7
<i>afaB</i>	1 (7)	0	1 (7)	0	> 0,9	> 0,9	> 0,9
<i>afaC</i>	2 (13)	0	1 (7)	0	0,4	> 0,9	0,7
<i>afaD</i>	2 (13)	0	1 (7)	0	0,4	> 0,999	0,7
<i>afaE8</i>	1 (7)	0	1 (7)	0	> 0,9	> 0,9	> 0,9
<i>air</i>	15 (100)	15 (100)	15 (100)	10 (100)	–	–	–
<i>iha</i>	13 (87)	7 (47)	7 (47)	2 (20)	0,05	0,05	0,002

<i>lpfA</i>	15 (100)	15 (100)	15 (100)	10 (100)	–	–	–
<i>nfaE</i>	1 (7)	0	0	0	> 0,9	> 0,9	> 0,9
<i>papA_F43</i>	1 (7)	0 (0)	1 (7)	2 (20)	> 0,9	> 0,9	0,6
<i>papA_fsiA_F16</i>	12 (80)	7 (47)	7 (47)	0	0,1	0,1	<0,001
<i>papC</i>	12 (80)	9 (60)	7 (47)	1 (10)	0,4	0,1	0,001
<i>astA</i>	1 (7)	0	1 (7)	0	> 0,9	> 0,9	> 0,9
<i>cea</i>	1 (7)	0	0	0	> 0,9	> 0,9	> 0,9
<i>sat</i>	13 (87)	7 (47)	8 (53)	2 (20)	0,05	0,1	0,002
<i>senB</i>	11 (73)	9 (60)	8 (53)	2 (20)	0,6	0,4	0,02
<i>chuA</i>	15 (100)	15 (100)	15 (100)	10 (100)	–	–	–
<i>fyuA</i>	14 (93)	13 (87)	12 (80)	5 (50)	> 0,9	0,5	0,04
<i>irp2</i>	14 (93)	13 (87)	12 (80)	5 (50)	> 0,9	0,5	0,04
<i>iucC</i>	13 (87)	8 (53)	11 (73)	3 (30)	0,1	0,6	0,01
<i>iutA</i>	13 (87)	8 (53)	11 (73)	3 (30)	0,1	0,6	0,01
<i>sitA</i>	15 (100)	14 (93)	15 (100)	9 (90)	> 0,9	–	0,8
<i>kpsE</i>	15 (100)	14 (93)	15 (100)	10 (100)	> 0,9	–	–
<i>kpsMII</i>	1 (7)	1 (7)	0	1 (10)	> 0,9	> 0,9	> 0,9
<i>kpsMII_K52</i>	12 (80)	5 (33)	9 (60)	1 (10)	0,02	0,4	0,001
<i>kpsMIII_k96</i>	2 (13)	2 (13)	4 (27)	2 (20)	> 0,9	0,6	> 0,9
<i>eilA</i>	15 (100)	15 (100)	14 (93)	10 (100)	–	> 0,9	–
<i>espP</i>	1 (7)	0	0	0	> 0,9	> 0,9	> 0,9
<i>gad</i>	1 (7)	15 (100)	15 (100)	9 (90)	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>hra</i>	1 (7)	2 (13)	0	0	> 0,9	> 0,9	> 0,9
<i>iss</i>	15 (100)	14 (93)	15 (100)	9 (90)	> 0,9	–	0,8
<i>ompT</i>	15 (100)	12 (80)	15 (100)	8 (80)	0,2	–	0,3
<i>terC</i>	15 (100)	15 (100)	15 (100)	10 (100)	–	–	–
<i>traT</i>	14 (93)	12 (80)	12 (80)	8 (80)	0,5	0,5	0,6

^a ITU-2005 vs Urina; ^b ITU-2005 vs Sangue; ^c ITU-2005 vs Ambiental

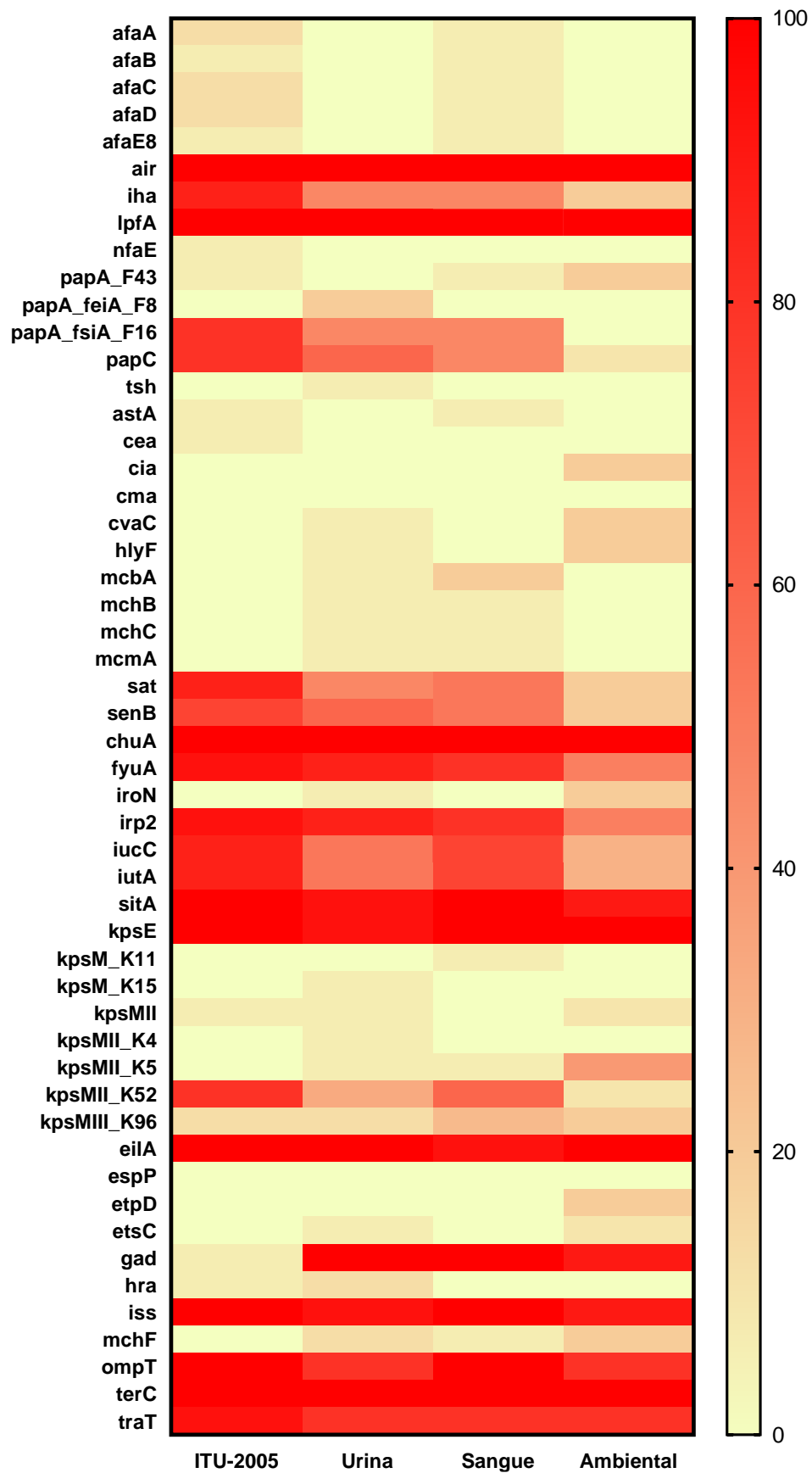


Figura 11 – Distribuição dos genes de virulência encontrados nos 55 genomas analisados

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho corresponde uma parte inicial de um estudo mais amplo do nosso grupo que visa investigar e caracterizar amostras de *E. coli* do ST69 responsáveis por causar ITU-AC em indivíduos residentes do Rio de Janeiro. Embora esse clone seja considerado pandêmico e um importante agente causador de infecções extraintestinais (Manges *et al.*, 2001; Riley, 2014), há poucos trabalhos sobre esse ST no Brasil (Dias *et al.*, 2009a, 2009b; Berman *et al.*, 2014; De Souza da-Silva *et al.*, 2017, 2020; Campos *et al.*, 2018). Dentre os seis trabalhos envolvendo amostras do ST69 no Brasil encontrados durante a pesquisa para a revisão bibliográfica, quatro foram realizados pelo nosso grupo (Dias *et al.*, 2009a, 2009b; De Souza da-Silva *et al.*, 2017, 2020).

Em nosso estudo, a frequência de amostras de *E. coli* do ST69 na coleção ITU-2019 foi de 11% (n=101 de 937 amostras), uma redução significativa em relação a coleção ITU-2015 ($p=0,01$). Em outras regiões do mundo, a taxa desse ST nas coleções é bastante variável. Manges e colaboradores (2001) identificaram 26% (n=49) das amostras da coleção que foram tipadas como pertencentes ao ST69 (Manges *et al.*, 2001). Dentre as 192 amostras tipadas, 102 (53%) apresentaram resistência a SXT (Manges *et al.*, 2001). Em um estudo realizado no Japão que incluiu somente amostras produtoras de ESBL, a frequência do ST69 na coleção foi de 1% (n=7, de 581 amostras da coleção) (Matsumura *et al.*, 2012).

Na coleção ITU-2005, amostras de *E. coli* do ST69 foram a segunda mais frequente, atrás somente do ST73 (de Souza da-Silva *et al.*, 2017). Na coleção ITU-2015 o ST69 foi o mais frequente do estudo (de Souza da-Silva *et al.*, 2020). Na coleção ITU-2019, o ST mais prevalente entre os quatro pesquisados (ST131, ST69, ST73 e ST95) foi o ST131, seguido do ST69. Apesar da redução na frequência do ST69, nossos resultados demonstram que esse ST é um dos principais clones responsáveis por causar ITU-AC no Rio de Janeiro. Esse achado está de acordo com estudos internacionais. Um trabalho realizado nos Estados Unidos avaliou a composição clonal de amostras de *E. coli* isoladas de ITU-AC de uma comunidade universitária em dois períodos: 1999–2000 e 2016–2017 (Yamaji *et al.*, 2018). Na primeira coleção, o ST69 foi o segundo mais frequente (n=26; 11,6%). Na segunda coleção, esse ST foi o quarto mais frequente (n=22; 9,4%) ($p=0,54$). Assim como no nosso estudo, a frequência do ST69 reduziu ao longo do tempo, no entanto, segundo os autores, esse clone continuou sendo uma das principais causas de ITU-AC nessa comunidade (Yamaji *et al.*, 2018).

Dentre os 17 estudos nos quais as amostras de *E. coli* foram isoladas apenas de espécimes de urina analisados na revisão bibliográfica (o trabalho de Manges e colaboradores (2001) não foi incluso no cálculo de frequência), ST69 foi o primeiro ou o segundo clone

mais frequente na coleção em mais da metade desses estudos (n=10; 59%). Quando analisamos os trabalhos que incluíram somente espécimes de urina, o ST69 foi o menos frequente no estudo de Fibke e colaboradores (2019), em que foi o quinto mais frequente na coleção (Fibke *et al.*, 2019). Esse estudo pesquisou a composição clonal de amostras de *E. coli* responsáveis por ITU em mulheres no Canadá. ST95 foi o clone mais frequente (n=71; 18%), e o ST69 surgiu como o quinto mais frequente na coleção (n=29; 8%) (Fibke *et al.*, 2019).

Na coleção ITU-2019 houve uma redução na frequência do ST69 entre os indivíduos com faixa etária menor de 18 anos em relação a coleção ITU-2015 ($p=0,02$). Para as amostras de 2019, essa faixa etária representou apenas 3% (n=3) da população total. Já na coleção de 2015 a representação foi de 13% (n=10) (Tabela 8).

Em um estudo realizado na Coréia do Sul que investigou a composição clonal de amostras de *E. coli* causadoras de ITU-AC em menores de 18 anos, ST69 foi o quarto mais frequente (n=5; 8%) (Yun *et al.*, 2015). Em estudo realizado na França para avaliar população de amostras produtoras de ESBL isoladas de crianças com ITU através de SGC, ST69 foi o terceiro mais frequente (n=16; 7%) (Birgy *et al.*, 2020). Nosso dado da baixa frequência do ST69 na população de menores de 18 anos na coleção ITU-2019 está de acordo com outros estudos internacionais.

Houve um aumento significativo na faixa etária de adultos (18–59 anos) na coleção de 2019 em relação a coleção de 2015 ($p=0,04$) (Tabela 8). No estudo suíço de Nüesch-Inderbinen e colaboradores, 100% (n=6) das amostras do ST69 foram isoladas de pacientes na faixa etária entre 18–59 anos (Nüesch-Inderbinen *et al.*, 2017).

Uma hipótese para a diminuição da frequência do ST69 na coleção ITU-2019 em relação a coleção ITU-2015 é a alteração observada na faixa etária das duas populações. Na coleção de 2019 houve uma redução significativa no número de indivíduos menores de 18 anos e um aumento significativo no número de adultos (18-59 anos).

No presente estudo, realizamos novamente o antibiograma para as amostras ITU-2005. Observamos uma redução na não suscetibilidade de algumas amostras para: AMC ($p=0,2$), AMP ($p>0,9$), FOX ($p=0,4$) e FOS ($p>0,9$), quando comparamos com o antibiograma realizado em 2005. Há duas hipóteses que podem explicar esse fenômeno: (i) como essas amostras estão sob processo de congelamento há mais de 10 anos, genes acessórios, como os de resistência, podem não ser mais expressos, resultando nessa alteração no perfil de não suscetibilidade observado; (ii) como a resistência aos quatro antimicrobianos podem ser

mediadas por plasmídeos (Silver, 2017; Bush, 2018), com o passar dos anos essas amostras podem ter perdido esse(s) plasmídeo(s) responsável(is) pela resistência.

Uma das principais características das amostras pertencentes ao ST69 é a elevada taxa de resistência a SXT (Riley, 2014; Johnson *et al.*, 2005). No nosso estudo observamos uma redução significativa da não suscetibilidade ao SXT nas amostras de 2019 (n=41; 42%) comparadas com as amostras de 2005 (n=14; 93%, $p<0,001$) e de 2015 (n= 61; 79%, $p<0,001$).

Em outros estudos a frequência da taxa de resistência a SXT se manteve acima de 50%. Na Espanha, um estudo que avaliou a prevalência dos ST69, ST131 e ST393 como agentes causadores de infecções extraintestinais, 14 (64%) amostras do ST69 apresentaram resistência a SXT (Blanco *et al.*, 2011). Na Arábia Saudita uma investigação de amostras UPEC em um hospital terciário demonstrou que 12 (80%) amostras do ST69 foram resistentes a SXT (Alghoribi *et al.*, 2015). Em outro estudo realizado no Brasil, utilizando amostras hospitalares de pacientes com ITU, mais de 50% das amostras do ST69 (n=9) apresentaram resistência a SXT (Campos *et al.*, 2018). No trabalho de Yamaji e colaboradores (2018), a resistência a SXT teve um ligeiro aumento entre os dois períodos analisados. Nas amostras de 1999–2000 a resistência a SXT foi de 65,4% (n=17) enquanto nas amostras de 2016–2017 a resistência foi de 68% (n=15) (Yamaji *et al.*, 2018).

Também houve uma diminuição significativa na não suscetibilidade a AMP nas amostras da coleção ITU-2019 (n=53; 52%) em relação a coleção ITU-2005 ($p=0,02$) e ITU-2015 ($p<0,001$). Esse resultado diferiu de alguns estudos internacionais. No estudo árabe de Alghoribi e colaboradores (2015), dentre as 15 amostras do ST69 na coleção, 14 (93,3%) apresentaram resistência a AMP (Alghoribi *et al.*, 2015). Na China, em um estudo que recuperou amostras de *E. coli* de fezes, dentre as nove amostras pertencentes ao ST69, todas apresentaram resistência a AMP (Chen *et al.*, 2014). No Canadá, um estudo avaliou a epidemiologia molecular de amostras de *E. coli* causando ICS, um total de 40 (71,4%) amostras do ST69 apresentou não suscetibilidade a AMP (Holland *et al.*, 2020). No estudo de Yamaji e colaboradores, a resistência a AMP apresentou um ligeiro aumento entre os dois períodos: dentre 1999–2000, 19 (73,1%) amostras do ST69 foram resistentes a AMP; e de 2016–2017 a resistência para esse antimicrobiano foi identificada em 17 (77,3%) amostras (Yamaji *et al.*, 2018).

A redução da não suscetibilidade a CIP (n=11; 11%) nas amostras de 2019 também foi significativa quando comparada com coleção de 2015 (n=25; 32%, $p<0,001$). Em estudos internacionais, a resistência a CIP nas amostras do ST69 é ausente ou muito reduzida. No

estudo de Yamaji e colaboradores (2018) a resistência a CIP ocorreu somente no período de 2016–2017 e em uma única amostra (4,5%) (Yamaji *et al.*, 2018). No trabalho de Algoribi e colaboradores, dentre as 15 amostras do ST69, apenas uma (6,6%) foi resistente a CIP (Algoribi *et al.*, 2015). No estudo canadense de Holland e colaboradores, dentre as 56 amostras do ST69, também somente uma (1,8%) foi não suscetível a CIP (Holland *et al.*, 2020). Em um trabalho realizado na Espanha e na França para investigar a composição clonal, FV e resistência aos antimicrobianos em amostras de *E. coli* causadoras de infecções extraintestinais, todas as amostras do ST69 (n=13) foram sensíveis a CIP (Flament-Simon *et al.*, 2020). No estudo realizado na Suíça dentre as 6 amostras de *E. coli* do ST69, somente uma (16,6%) apresentou resistência para esse antimicrobiano (Nüesch-Inderbinen *et al.*, 2017).

Outros antimicrobianos que apresentaram redução significativa para a não suscetibilidade na coleção ITU-2019 em relação a coleção ITU-2015 foram CXM ($p<0,001$) e NIT ($p=0,005$). No estudo de Algoribi e colaboradores, dentre as amostras de *E. coli* do ST69, quatro (26,6%) foram resistentes a CXM (Algoribi *et al.*, 2015). Assim como no presente estudo, em que a resistência para NIT foi ausente nas amostras de ITU-2019, outros trabalhos internacionais, também não evidenciaram amostras do ST69 resistentes a esse antimicrobiano (Banerjee *et al.*, 2013; Nüesch-Inderbinen *et al.*, 2017; Flament-Simon *et al.*, 2020).

Amostras de *E. coli* pertencentes ao ST69 frequentemente são associadas à resistência a múltiplas drogas (Riley, 2014). O número de amostras RMD na coleção ITU-2019 (n=9; 9%) também foi significativamente menor em relação a coleção ITU-2015 (n=27; 35%, $p<0,001$). A taxa de RMD na coleção ITU-2019 ficou abaixo do encontrado em estudos internacionais. No estudo de Nüesch-Inderbinen e colaboradores (2017), 67% (n=4) das amostras do ST69 foram RMD. (Nüesch-Inderbinen *et al.*, 2017). No trabalho de Flament-Simon e colaboradores (2020) dentre as 13 amostras de *E. coli* do ST69 da coleção, 6 (43%) apresentaram RMD (Flament-Simon *et al.*, 2020).

Como já mencionado, amostras de *E. coli* do ST69 produtoras de ESBL são incomuns. Nossos achados estão de acordo com esse dado, uma vez que nenhuma amostra do ST69 produtora de ESBL foi identificada nas coleções dos três períodos. No entanto, outros estudos já relataram amostras do ST69 produtoras de ESBL (Kim *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2012; Matsumura *et al.*, 2012; Nüesch-Inderbinen *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2018).

Apesar das amostras ITU-2019 apresentarem uma redução significativa para a não suscetibilidade a diversos antimicrobianos, o ST69 foi o segundo mais prevalente dentre as

937 amostras tipadas. Uma hipótese para esse resultado é que a resistência observada nos experimentos, muitas vezes pode ser diferente do comportamento como ocorre *in vivo*. Um exemplo é a formação de biofilmes, em que a comunidade bacteriana fica envolta de uma matriz extracelular, tornando-a resistente tanto a ação de antimicrobianos quanto do sistema imune do próprio hospedeiro (Fux *et al.*, 2005; Venkatesan, Perumal e Doble, 2015). No entanto, os testes para a observação da produção de biofilme são testes *in vitro*, e essa relação ainda precisa ser comprovada *in vivo*. Entre os principais mecanismos de resistência associados a biofilme estão: uma maior dificuldade na penetração do antimicrobiano na matriz extracelular, ligação de antimicrobianos carregados positivamente na matriz extracelular, expressão de bombas de efluxo e a presença de células *persistenter* (Dufour, Leung e Lévesque, 2010). Diversos estudos já demonstraram amostras UPEC com a capacidade de formar biofilme (Hagos *et al.*, 2019; Shah *et al.*, 2019; Behzadi, Urbán e Gajdács, 2020).

Um estudo recente realizado nos Estados Unidos demonstrou um novo mecanismo epigenético no qual amostras bacterianas em *swarming* podem tornar-se resistentes a antimicrobianos, denominado “necrosinalização” (Bhattacharyya, Walker e Harshey, 2020). Nesse mecanismo, a morte de uma subpopulação induz a expressão de bombas de efluxo, repressão de porinas e expressão de genes de catabolismo de espécies reativas de oxigênio na subpopulação sobrevivente, tornando-as resistentes e tolerantes a diversos antimicrobianos (Bhattacharyya, Walker e Harshey, 2020). Por ser um mecanismo recém-descoberto, até o momento não foram encontrados estudos que busquem relacionar essa “necrosinalização” com a possível seleção e prevalência de linhagens bacterianas que, inicialmente, apresentam uma alta taxa de suscetibilidade aos antimicrobianos. No entanto, é necessário avaliar se esse mecanismo exerce alguma influência no sucesso evolutivo de clones conhecidos pela alta suscetibilidade *in vitro*, como o caso do ST95, assim como na seleção de amostras com baixa resistência aos antimicrobianos, com no caso das amostras do ST69 da coleção ITU-2019.

As amostras do ST69 da coleção de 2015 apresentaram um aumento na não suscetibilidade a diversos antimicrobianos em relação as amostras da coleção de 2005: CIP ($p=0,01$), AMC ($p=0,5$), ATM ($p>0,9$), CXM ($p=0,9$), GEN ($p=0,5$), NIT ($p=0,5$). Além disso, a presença de amostras RMD na coleção ITU-2015 foi significativamente maior do que na coleção ITU-2005 ($p=0,04$). No entanto, amostras ITU-2015 apresentaram uma diminuição significativa em determinados genes de virulência em comparação com as amostras de 2005, sendo apenas três genes presentes em mais de 50% nas amostras da coleção ITU-2015 (de Souza da-Silva tese concluída 2018, artigo em processo de escrita).

Uma hipótese para esse fenômeno é a complexa relação entre resistência aos antimicrobianos e a virulência bacteriana. A resistência pode impactar diretamente no *fitness* bacteriano, principalmente em situações em que não há pressão seletiva (Ender *et al.*, 2004; Kanai *et al.*, 2004; Allen, Angst e Hall, 2019). Alguns estudos já demonstraram que a resistência aos antimicrobianos pode tanto estar associada com o aumento (Cepas e Soto, 2020; El-Baky, *et al.*, 2020), quanto com a diminuição (Björkman, Hughes e Andersson, 1998; Alonso, 2004; Horcajada *et al.*, 2005) da virulência bacteriana. Além disso, apesar da diminuição do *fitness* devido a presença de resistência, podem ocorrer mutações compensatórias no genoma bacteriano, podendo restaurar esse *fitness* (Björkman, Hughes e Andersson, 1998; Andersson e Hughes, 2010). Essa relação entre resistência e virulência depende de diversos fatores, como a espécie bacteriana, condições ambientais e os próprios mecanismos de resistência e virulência em questão (Cepas e Soto, 2020). Em amostras UPEC, resistência a quinolonas já foi associada com menor expressão da fímbria do tipo 1, fímbria P e *OmpA*, além da ausência dos genes *hlyA*, *cnf1* e *sat* (Cepas e Soto, 2020). Já a presença dos genes *bla_{CTX-M15}* e *bla_{OXA-2}* foi associada com a presença dos genes *colV*, *colE2-E9*, *colla-1b*, *hlyA*, *csgA* e *colM*, *colB*, *colE*, *crl*, respectivamente (Cepas e Soto, 2020). Esses dados reforçam a necessidade de realização de experimentos futuros, como a detecção de genes de virulência nas amostras ITU-2019 que, assim como nas amostras de 2005, tiveram uma baixa resistência aos antimicrobianos quando comparadas com as amostras ITU-2015 e a realização de testes fenotípicos de virulência para as amostras dos três períodos, visando investigar essa possível relação entre resistência e virulência nas amostras do ST69.

O gene *fimH* é um importante fator de virulência em amostras UPEC, responsável pela adesão e invasão celular do patógeno em células do hospedeiro (Mulvey *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 2000; Parvez e Rahman, 2018). Além disso, variações alélicas desse gene também são utilizadas para a classificação de alguns clones de *E. coli* em sublinhagens (Price *et al.*, 2013). O subclone H30-R do ST131 é caracterizado pela resistência a fluoroquinolonas, já o subclone H30-Rx é caracterizado pela produção de CTX-M-15 (Price *et al.*, 2013). Até o presente momento, não foram encontrados estudos que busquem identificar sublinhagens para amostras para o ST69, assim como ocorre para o ST131. No presente estudo, vimos que o gene *fimH* está presente em 94% (n=95) das amostras da coleção ITU-2019, mantendo-se acima de 90% nas coleções dos três períodos: 100% e 91% nas coleções 2005 e 2015, respectivamente.

Outra hipótese para a diferença do perfil de resistência encontrada entre as amostras do ST69 dos diferentes períodos pode ser a presença de diferentes sublinhagens desse ST

causadoras de ITU-AC circulantes no Rio de Janeiro. Dada essa hipótese, fica evidente a necessidade de realizar futuros experimentos, como a tipagem dessas três coleções por PFGE e/ou RAPD, para investigar a possibilidade da existência de sublinhagens desse ST circulantes.

No presente estudo, também analisamos os genomas das 15 amostras de *E. coli* do ST69 da coleção ITU-2005 e comparamos com outros 40 genomas de amostras desse mesmo ST disponíveis no banco de dados Enterobase. Dentre os 55 genomas analisados, 52 (94,5%) apresentaram o *fimH* alelo 27, sugerindo que esse alelo seja altamente conservado nesse ST. Duas amostras da coleção Ambiental apresentaram o *fimH* alelo 47 e uma amostra da coleção Sangue, o *fimH*483.

O gene *mdf(A)* foi encontrado em todos os 55 genomas analisados. Esse gene codifica uma bomba de efluxo capaz de atuar em uma grande variedade de moléculas, incluindo antimicrobianos de diferentes classes, por isso, a superexpressão desse gene pode promover o fenótipo RMD (Edgar e Bibi, 1997; Nishino e Yamaguchi, 2001; Wang *et al.*, 2014; Yardeni, Zomot e Bibi, 2018). O gene *blaTEM-1b* foi o único gene *bla* identificado na coleção ITU-2005 (n=12; 80%) e o mais frequente entre os codificadores de β -lactamases nas outras três coleções: Urina (n=10; 67%), Sangue (n=9; 60%) e Ambiental (n=5; 50%). Em um estudo realizado na Dinamarca, entre seis amostras de *E. coli* pertencentes ao ST69 na coleção, apenas em uma (17%) o gene *blaTEM-1b* identificado (Hammerum *et al.*, 2020).

Em 13 (87%) amostras da coleção ITU-2005 foram encontrados pelo menos um gene *dfrA* e, em todas as amostras dessa coleção, foi encontrado pelo menos um gene *sul*. Na coleção Urina, nove (60%) amostras apresentaram pelo menos um gene *dfrA* e 11 (73%) amostras, pelo menos um gene *sul*. Na coleção Sangue, 53% (n=8) das amostras apresentaram pelo menos um gene *dfrA* e 60% (n=9) pelo menos um gene *sul*. Na coleção Ambiental, cinco (50%) amostras apresentaram pelo menos um gene *dfrA* e um gene *sul*. A presença de genes *sul* na coleção ITU-2005 foi significativamente maior do que na coleção Sangue ($p=0,01$) e Ambiental ($p=0,009$). Dois genes que conferem resistência a tetraciclina foram encontrados nas quatro coleções, *tet(A)* e *tet(B)*. A frequência do gene *tet(A)* variou de 13% a 27% entre as coleções, e *tet(B)* foi significativamente mais frequente na coleção ITU-2005 do que nas coleções Urina ($p=0,02$) e Ambiental ($p=0,03$).

Na coleção ITU-2005, foi identificada uma amostra com mutação no gene *parC* (S57T), no entanto, essa amostra não apresentou resistência fenotípica para CIP no antibiograma realizado (Tabela 8). Já nas coleções Urina ($p=0,01$) e Sangue ($p=0,04$), uma quantidade maior das amostras apresentou a mutação S83L no gene *gyrA*.

Genes que codificam para duas adesinas, *air* e *lpfA*, foram encontrados em todos os 55 genomas analisados. Já os genes *pap* foram mais frequentes nas coleções ITU-2005, Urina e Sangue do que na coleção ambiental. Esse resultado reforça a importância desses genes para a patogênese bacteriana, principalmente na adesão de células do trato urinário (Parvez e Rahman, 2018).

Entre os genes que codificam toxinas encontrados na coleção ITU-2005, *sat* foi o mais frequente (n=13; 87%). No estudo de Flament-Simon e colaboradores (2020), nove (69%) das amostras pertencentes ao ST69 da coleção também foram identificadas com esse gene (Flament-Simon *et al.*, 2020). Em um estudo realizado no Irã que caracterizou padrões de suscetibilidade aos antimicrobianos e genes de virulência de cinco ST diferentes de *E. coli* (69, 73, 95, 127 e 131), esse gene foi encontrado em 25% (n=6) das amostras pertencentes aos ST69 (Hojabri *et al.*, 2019).

Em nenhum dos 55 genomas analisados encontramos os genes que codificam as toxinas *hlyA* e *cnf1*, características de amostras UPEC (Lüthje e Brauner, 2014; Parvez e Rahman, 2018). Outros trabalhos também demonstraram a ausência desses genes em amostras do ST69 (Gibreel *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2018., Flament-Simon *et al.*, 2020). No estudo iraniano de Hojabri e colaboradores (2019) nenhuma amostra pertencente ao ST69 apresentou o gene *cnf1*, no entanto, o gene *hlyA* foi detectado em quatro (17%) amostras desse mesmo ST (Hojabri *et al.*, 2019). No estudo de Alghoribi e colaboradores, nenhuma amostra do ST69 apresentou o gene *hlyA* e uma amostra (7%) desse ST apresentou o gene *cnf1* (Alghoribi *et al.*, 2015). Essa baixa frequência desses dois genes pode ser um indício de que ambos não estão muito disseminados entre amostras do ST69.

A cápsula bacteriana é uma importante estrutura presente em algumas amostras de *E. coli*. É responsável por permitir que o microrganismo evada do sistema imune através de mimetismo molecular e resistência ao complemento (Subashchandrabose e Mobley, 2015; Buckles *et al.*, 2009). Todas as amostras das coleções de espécimes clínicos apresentaram o gene *kpsE*, um dos genes responsáveis pela exportação do polissacarídeo que irá formar a cápsula (Rosenow *et al.*, 1995). Um total de 90% (n=9) das amostras da coleção Ambiental também apresentou esse gene. O gene *kpsM* foi encontrado em 49 (89%) dos 55 genomas analisados, sendo o *kpsMII_K52* o mais frequente nas coleções ITU-2005 (n=12; 80%), Urina (n=5; 33%) e Sangue (n=9; 60%). No estudo de Campos e colaboradores, seis (67%) amostras de *E. coli* pertencentes ao ST69 apresentaram gene *kpsM* (Campos *et al.*, 2018).

Sistemas de aquisição de ferro são essenciais para a patogênese de amostras UPEC, uma vez que esse íon é importante para o metabolismo bacteriano e, ao mesmo tempo,

escasso no trato urinário. Os genes *chuA*, *fyuA*, *irp2*, *iucC*, *iutA* e *sitA* relacionados com a captação de íons ferro foram encontrados em mais de 85% das amostras da coleção ITU-2005 e, com exceção de *chuA* e *sitA*, foram significativamente menos frequentes na coleção Ambiental. Na coleção Urina, todos os seis genes estiveram presentes em mais de 50% das amostras. Na coleção Sangue, todos foram encontrados em mais de 70% das amostras. A presença de sideróforos também foi amplamente frequente em amostras *E. coli* do ST69 de diversos estudos (Gibreel *et al.*, 2012; Alghoribi, *et al.*, 2015; Campos *et al.*, 2018; Flament-Simon *et al.*, 2020). Esses resultados reforçam importância da presença desses genes para amostras de *E. coli*.

Inesperadamente, na coleção ITU-2005 houve uma redução significativa no gene *gad* em relação as outras três coleções: Urina ($p<0,001$), Sangue ($p<0,001$) e Ambiental ($p<0,001$). Esse gene codifica uma glutamato descarboxilase e faz parte de um sistema que permite a sobrevivência de amostras de *E. coli* em ambientes extremamente ácidos (Kanda *et al.*, 2020).

O gene *terC* é localizado no operon *ter* sendo disseminado entre as espécies bacterianas (Turkovicova *et al.*, 2016). Concordando com esses dados, o gene *terC* foi encontrado em todos os genomas analisados e está associado com a resistência a íons de telúrio (Turkovicova *et al.*, 2016). Os genes de resistência ao soro, *iss* e *traT*, foram amplamente encontrados nas quatro coleções: ITU-2005 (n=15; 100%) (n=14; 93%), Urina (n=14; 93%) (n=12; 80%), Sangue (n=15; 100%) (n=12; 80%) e Ambiental (n=9; 90%) (n=8; 80%). Outros estudos apresentaram dados semelhantes para o gene *traT* (Alghoribi, 2015; Campos *et al.*, 2018; Hojabri *et al.*, 2019), implicando que esse possa ser disseminado nas amostras do ST69. Em relação ao gene *iss*, estudos apontaram uma baixa frequência desse gene entre as amostras do ST69 (Blanco *et al.*, 2011; Hojabri *et al.*, 2019; Flament-Simon *et al.*, 2020).

O gene *ompT*, que codifica uma protease da membrana externa (Grodberg e Dunn, 1988), foi amplamente encontrado nas amostras das quatro coleções: ITU-2005 (100%), Sangue (100%), Urina (n=12; 80%) e Ambiental (n=8; 80%). Dados semelhantes foram encontrados nos estudos de Campos e colaboradores, em que todas as amostras do ST69 (n=9) apresentaram esse gene e de Flament-Simon e colaboradores, em que 12 (92%) das amostras desse ST apresentaram o gene *ompT* (Campos *et al.*, 2018; Flament-Simon *et al.*, 2020). No entanto, em outro estudo internacional, a frequência de amostras do ST69 carreadoras desse gene foi de 17% (n=4) (Hojabri *et al.*, 2019).

Mesmo após a análise dos genes de virulência nos genomas das amostras ITU-2005, ainda é necessária a realização de testes fenotípicos, para avaliar a expressão desses genes e o comportamento dessas amostras em diversas situações, como na produção de biofilmes. Em experimentos futuros, também serão analisadas a virulência genotípica e fenotípica das amostras das coleções ITU-2015 e ITU-2019.

7 CONCLUSÃO

Amostras de *E. coli* do ST69 (n=101; 11%) identificadas na coleção ITU-2019 foram o segundo grupo de ST mais frequente na coleção 2019, dentre quatro ST (69, 73, 95 e 131) pesquisados.

Amostras do ST69 da coleção ITU-2019 apresentaram uma redução significativa na não suscetibilidade a diversos antimicrobianos, em relação as coleções de ITU-2005 e ITU-2015.

O gene *fimH* manteve-se em uma alta frequência na coleção 2019, assim como nas coleções anteriores.

A análise do genoma das amostras da coleção ITU-2005 em comparação com genomas de amostras do ST69 recuperados do banco de dados Enterobase, mostrou a presença de genes de resistência e virulência conservados em todas as amostras do ST69.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, E. P. e Chain, E. (1940). An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature*, 146, 837–837.
- Aldred, K.J., Kerns, R.J. e Osheroff, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*, 53, 1565–1574.
- Alghoribi, M. F., Gibreel, T. M., Dodgson, A. R., Beatson, S. A. e Upton, M. (2014). *Galleria mellonella* Infection Model Demonstrates High Lethality of ST69 and ST127 Uropathogenic *E. coli*. *PLoS ONE*, 9, e101547.
- Alghoribi, M. F., Gibreel, T. M., Farnham, G., Al Johani, S. M., Balkhy, H. H. e Upton, M. (2015). Antibiotic-resistant ST38, ST131 and ST405 strains are the leading uropathogenic *Escherichia coli* clones in Riyadh, Saudi Arabia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70, 2757–2762.
- Allen, R. C., Angst, D. C. e Hall, A. R. (2019). Resistance Gene Carriage Predicts Growth of Natural and Clinical *Escherichia coli* Isolates in the Absence of Antibiotics. *Appl Environ Microbiol* 85:e02111-18.
- Alonso, A. (2004). Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 432–434.
- Ambler, R. P. (1980). The Structure of beta-Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289, 321–331.
- Andersson, D. I. e Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*, 8, 260–271.
- Asadi Karam, M. R., Habibi, M. e Bouzari, S. (2019). Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Immunology*, 108, 56–67.
- Bäckhed, F., Alsén, B., Roche, N., Ångström, J., von Euler, A., Breimer, M. E., Westerlund-Wikstrom, B., Teneberg, S e Richter-Dahlfors, A. (2002). Identification of Target Tissue Glycosphingolipid Receptors for Uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and Its Role in Mucosal Inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 18198–18205.
- Bajpai, T., Pandey, M., Varma, M. e Bhatambare, G. S. (2017). Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Beta-Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna journal of medicine*, 7, 12–16.
- Banerjee, R., Johnston, B., Lohse, C., Chattopadhyay, S., Tchesnokova, V., Sokurenko, E. V. e Johnson, J. R. (2013). The Clonal Distribution and Diversity of Extraintestinal *Escherichia coli* Isolates Vary According to Patient Characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 5912–5917.
- Behzadi, P., Urbán, E. e Gajdács, M. (2020). Association between Biofilm-Production and Antibiotic Resistance in Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): An *In Vitro* Study. *Diseases*, 8, 17–28.
- Belotserkovsky, I. e Sansonetti, P. J. (2018). *Shigella* and Enteroinvasive *Escherichia Coli*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*.
- Berman, H., Barberino, M. G., Moreira, E. D., Riley, L. e Reis, J. N. (2014). Distribution of Strain Type and Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* Isolates Causing Meningitis in a Large Urban Setting in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 1418–1422.
- Bert, F., Johnson, J. R., Ouattara, B., Leflon-Guibout, V., Johnston, B., Marcon, E., Valla, D., Moreau, R. e Nicolas-Chanoine, M.-H. (2010). Genetic Diversity and Virulence Profiles of *Escherichia coli* Isolates Causing Spontaneous Bacterial Peritonitis and Bacteremia in Patients with Cirrhosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 2709–2714.
- Betts, J. W., Phee, L. M., Woodford, N. e Wareham, D. W. (2014). Activity of colistin in combination with tigecycline or rifampicin against multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33, 1565–1572.
- Bhattacharyya, S., Walker, D. M. e Harshey, R. M. (2020). Dead cells release a “necrosignal” that activates antibiotic survival pathways in bacterial swarms. *Nature Communications*, 11.
- Birgy, A., Madhi, F., Jung, C., Levy, C., Cointe, A., Bidet, P., Hobson, C. A., Bechet, S., Sobral, E., Vuthien, H., Ferroni, A., Abergane, S., Cuzon, G., Beraud, L., Gajdos, V., Launay, E., Pinquier, D., Haas, H., Desmarest, M.,

- Dommergues, M. A., Cohen, R. e Bonacorsi, S. (2019). Diversity and trends in population structure of ESBL-producing Enterobacteriaceae in febrile urinary tract infections in children in France from 2014 to 2017. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
- Bingen, E., Picard, B., Brahimi, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J. e Denamur, E. (1998). Phylogenetic Analysis of *Escherichia coli* Strains Causing Neonatal Meningitis Suggests Horizontal Gene Transfer from a Predominant Pool of Highly Virulent B2 Group Strains. *The Journal of Infectious Diseases*, 177, 642–650.
- Björkman, J., Hughes, D. e Andersson, D. I. (1998). Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 3949–3953.
- Blanco, J., Mora, A., Mamani, R., Lopez, C., Blanco, M., Dahbi, G., Herrera, A., Blanco, J. E., Alonso, M. P., García-Garrote, F., Chaves, F., Orellana, M. A., Martínez-Martínez, L., Calvo, J., Prats, G., Larrosa, M. N., González-López, J. J., López-Cerero, L., Rodríguez-Baño, J. e Pascual, A. (2011). National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 2011–2021.
- Blum, S. E., Goldstone, R. J., Connolly, J. P. R., Répérant-Ferter, M., Germon, P., Inglis, N. F., Krifucks, O., Mathur, S., Manson, E., Mclean, K., Rainard, P., Roe, A. J., Leitner, G. e Smith, D. G. E. (2018). Postgenomics Characterization of an Essential Genetic Determinant of Mammary Pathogenic *Escherichia coli*. *mBio*, 9, e00423-18.
- Bonelli, R. R., Moreira, B. M. e Picão, R. C. (2014). Antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug Resistance Updates*, 17, 24–36.
- Bortolaia, V., Kaas, R. F., Ruppe, E., Roberts, M.C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. R., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., Malhotra-Kumar, S., Westh, H., Pinholt, M., Anjum, M. F., Duggett, N. A., Kempf, I., Nyka'senoja, S., Olkkola, S., Wiczorek, K., Amaro, A., Clemente, L., Mossong, J., Losch, S., Ragimbeau, C., Lund, O. e Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
- Boquet, P. (2001). The Cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon*, 39, 1673–1680.
- Bower, J. M., Eto, D. S. e Mulvey, M. A. (2005). Covert Operations of Uropathogenic *Escherichia coli* within the Urinary Tract. *Traffic*, 6, 18–31.
- Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G. D., Shukla, M., Thomason, J. A., Stevens, R., Vonstein, V., Wattam, R. e Xia, F. (2015). RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*, 5, 8365.
- Buckles, E. L., Wang, X., Lane, M. C., Lockatell, C. V., Johnson, D. E., Rasko, D. A., Mobley, H. L. T. e Donnenberg, M. S. (2009). Role of the K2 Capsule in *Escherichia coli* Urinary Tract Infection and Serum Resistance. *The Journal of Infectious Diseases*, 199, 1689–1697.
- Bush, K., Jacoby, G. A. e Medeiros, A. A. (1995). A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 1211–1233.
- Bush, K. e Jacoby, G. A. (2010). Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 969–976.
- Bush, K. e Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6, a025247.
- Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62:e01076-18.
- Cai, J. C., Zhang, R., Hu, Y. Y., Zhou, H. W. e Chen, G.-X. (2014). Emergence of *Escherichia coli* Sequence Type 131 Isolates Producing KPC-2 Carbapenemase in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 1146–1152.

- Campos, J., Mourão, J., Pestana, N., Peixe, L., Novais, C. e Antunes, P. (2013). Microbiological quality of ready-to-eat salads: An underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 464–470.
- Campos, A. C. C., Andrade, N. L., Ferdous, M., Chlebowicz, M. A., Santos, C. C., Correal, J. C. D., Foe, J. R. L. T., Rosa, A. C. P., Damasco, P. V., Friedrich, A. W. e Rossen, J. W. A. (2018). Comprehensive Molecular Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Urine Samples of Hospitalized Patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 9:243.
- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F. e Coque, T. M. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 144–153.
- Caprioli, A., Donelli, G., Falbo, V., Possenti, R., Roda, L. G., Roscetti, G. e Ruggeri, F. M. (1984). A cell division Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F, Hasman H. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Jul;58(7):3895-903.-active protein from *E. coli*. *Biochemical and biophysical research communications*, 118, 587–593.
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F. e Hasman H. (2014). *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 3895 – 3903.
- Carter, M. Q., Louie, J. W., Feng, D., Zhong, W. e Brandl, M. T. (2016). Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157:H7 for initial attachment and biofilm formation. *Food Microbiology*, 57, 81–89.
- Carvalho, I., Tejedor-Junco, M. T., González-Martín, M., Corbera, J. A., Silva, V., Igrejas, G., Torres, C. e Poeta, P. (2020). *Escherichia coli* Producing Extended-Spectrum β -lactamases (ESBL) from Domestic Camels in the Canary Islands: A One Health Approach. *Animals*, 10:1295.
- Cattoir, V., Poirel, L. e Nordmann, P. (2008). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Pump QepA2 in an *Escherichia coli* Isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 3801–3804.
- Cavaleri, S. J. e Snyder, I. S. (1982). Cytotoxic Activity of Partially Purified *Escherichia Coli* Alpha Haemolysin. *Journal of Medical Microbiology*, 15, 11–21.
- Cepas, V. e Soto, S. M. (2020). Relationship between Virulence and Resistance among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*, 9, 719.
- Chen, Y., Chen, X., Zheng, S., Yu, F., Kong, H., Yang, Q., Cui, D., Chen, N., Lou, B., Li, X., Tian, L., Yang, X., Xie, G., Dong, Y., Qin, Z., Han, D., Wang, Y., Zhang, W., Tang, Y.-W. e Li, L. (2014). Serotypes, genotypes and antimicrobial resistance patterns of human diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates circulating in southeastern China. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 52–58.
- Christensen, G. D., Simpson W. A., Yonger J. J., Baddor L. M., Barrett F. F., Melton D. M. e Beachey E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*, 22, 996–1006.
- Ciesielczuk, H., Betts, J., Phee, L., Doumith, M., Hope, R., Woodford, N. e Wareham, D. W. (2015). Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. *Virulence*, 6, 145–151.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., e Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4555–4558.
- Clermont, O., Olier, M., Hoede, C., Diancourt, L., Brisse, S., Keroudean, M., Glodt, J., Picard, B., Oswald, E. e Denamur, E. (2011). Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 654–662.
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E. e Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylotyping method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5, 58–65.

- Cockerill, F. R. e Edson, R. S. (1991). Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Mayo Clinic Proceedings*, 66, 1260–1269.
- Collingwood, C., Kemmett, K., Williams, N. e Wigley, P. (2014). Is the Concept of Avian Pathogenic *Escherichia coli* as a Single Pathotype Fundamentally Flawed? *Frontiers in Veterinary Science*, 1.
- Conceição, R. A., Ludovico, M. S., Andrade, C. G. T. J. e Yano, T. (2012). Human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) is able to adhere to and invade kidney epithelial cells in culture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45, 417–424.
- Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J. L. e Igrejas, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand?. *Journal of Medical Microbiology*, 66, 551–559.
- Dale, G. E., Broger, C., D'Arcy, A., Hartman, P. G., DeHoogt, R., Jolidon, S., Kompis, I., Labhardt, A. M., Langen, H., Locher, H., Page, M. G. P., Then, D. S. R. L., Wipf, B. e Oefner, C. (1997). A Single Amino Acid Substitution in *Staphylococcus aureus* Dihydrofolate Reductase Determines Trimethoprim Resistance. *J. Mol. Biol.* 266, 23–30.
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 490–495.
- Davis, J. J., Wattam, A. R., Aziz, R. K., Brettin, T., Butler, R., Butler, R. M., Chlenski, P., Conrad, N., Dickerman, A., Dietrich, E. M., Gabbard, J. L., Gerdes, S., Guard, A., Kenyon, R. W., Machi, D., Mao, C., Murphy-Olson, D., Nguyen, M., Nordberg, E. K., Olsen, G. J., Olson, R. D., Overbeek, J. C., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G. D., Shukla, M., Thomas, C., VanOeffelen, M., Vonstein, V., Warren, A. S., Xia, F., Xie, D., Yoo, H. e Stevens R. (2020). The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. *Nucleic Acids Res*, 48, 606-612.
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S. e Gordon, D. (2020). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*.
- de Souza da-Silva, A. P., De Sousa, V. S., Martins, N., da Silva Dias, R. C., Bonelli, R. R., Riley, L. W. e Moreira, B. M. (2017). *Escherichia coli* sequence type 73 as a cause of community acquired urinary tract infection in men and women in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88, 69–74.
- de Souza da-Silva, A. P., De Sousa, V. S., Longo, L. G. A., Caldera, S., Baltazar, I. C. L., Bonelli, R. R., Santoro-Lopes, G., Riley, L. W., Moreira, B. M (2020). Prevalence of fluoroquinolone-resistant and broad-spectrum cephalosporin-resistant community-acquired urinary tract infections in Rio de Janeiro: Impact of *Escherichia coli* genotypes ST69 and ST131. *Infection, Genetics and Evolution*, 85.
- Dias, R. C., Marangoni, D. V., Riley, L. W. e Moreira, B. M. (2009a). Identification of uropathogenic *Escherichia coli* clonal group A (CgA) in hospitalised patients. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 787–789.
- Dias, R. C. S., Marangoni, D. V., Smith, S. P., Alves, E. M., Pellegrino, F. L. P. C., Riley, L. W. e Moreira, B. M. (2009b). Clonal Composition of *Escherichia coli* Causing Community-Acquired Urinary Tract Infections in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Microbial Drug Resistance*, 15, 303–308.
- Dias, R. C. S; Moreira, B.M. e Riley, L.W. (2010). Use of fimH Single-Nucleotide Polymorphisms for Strain Typing of Clinical Isolates of *Escherichia coli* for Epidemiologic Investigation. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 483-488.
- Doumith, M., Day, M., Ciesielczuk, H., Hope, R., Underwood, A., Reynolds, R., Wain, J., Livermore, D. M. e Woodford, N. (2014). Rapid Identification of Major *Escherichia coli* Sequence Types Causing Urinary Tract and Bloodstream Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 53, 160–166.
- Dufour, D., Leung, V. e Lévesque, C. M. (2010). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22, 2–16.
- Duin, V. D. e Doi, Y. (2017). The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence*, 8, 460–469.
- Edgar, R. e Bibi, E. (1997). MdfA, an *Escherichia coli* Multidrug Resistance Protein with an Extraordinarily Broad Spectrum of Drug Recognition. *Journal of Bacteriology*, 179, 2274–2280.

- El-Baky, R. M. A., Ibrahim, R. A., Mohamed, D. S., Ahmed, E. F. e Hashem, Z. S. (2020). Prevalence of Virulence Genes and Their Association with Antimicrobial Resistance Among Pathogenic *E. coli* Isolated from Egyptian Patients with Different Clinical Infections. *Infection and Drug Resistance*, 13, 1221–1236
- Ender, M., McCallum, N., Adhikari, R. e Berger-Bachi, B. (2004). Fitness Cost of SCCmec and Methicillin Resistance Levels in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 2295–2297.
- Flament-Simon, S.-C., Nicolas-Chanoine, M.-H., García, V., Duprilot, M., Mayer, N., Alonso, M. P., García-Meniño, I., Blanco, J. E., Blanco, M. e Blanco, J. (2020). Clonal Structure, Virulence Factor-encoding Genes and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli*, Causing Urinary Tract Infections and Other Extraintestinal Infections in Humans in Spain and France during 2016. *Antibiotics*, 9, 161–178.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M. e Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 269–284
- Floyd, K. A., Moore, J. L., Eberly, A. R., Good, J. A. D., Shaffer, C. L., Zaver, H., Almqvist, F., Skaar, E. P., Caprioli, R. M. e Hadjifrangiskou, M. (2015). Adhesive Fiber Stratification in Uropathogenic *Escherichia coli* Biofilms Unveils Oxygen-Mediated Control of Type 1 Pili. *PLOS Pathogens*, 11, e1004697.
- Foxman, B. e Brown, P. (2003). Epidemiology of urinary tract infections Transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infectious Disease Clinics of North America*, 17, 227–241.
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S. e Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13, 34–40.
- Gadeberg, O. V., Ørskov, I. e Rhodes, J. M. (1983). Cytotoxic Effect of an Alpha-Hemolytic *Escherichia coli* Strain on Human Blood Monocytes and Granulocytes *in vitro*. *Infection and Immunity*, 41, 358–364.
- Garneau-Tsodikova, S. e Labby, K. J. (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *MedChemComm*, 7, 11–27.
- Gayathri, D., Eramma, N. K. e Devaraja, T. N. (2012). New Delhi metallo beta- Lactamase-1; Incidence and threats. *Int J Biol Med Res.* 3, 1870–1874.
- Ghuysen, J. M. (1991). Serine β -Lactamases and Penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol*, 45, 37–67.
- Gibreel, T. M., Dodgson, A. R., Cheesbrough, J., Fox, A. J., Bolton, F. J. e Upton, M. (2011). Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 346–356.
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. e Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3–30.
- Gordon, D. M., Clermont, O., Tolley, H. e Denamur, E. (2008). Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*, 10, 2484–2496.
- Goswami, C., Fox, S., Holden, M., Connor, M., Leanord, A. e Evans, T. J. (2018). Genetic analysis of invasive *Escherichia coli* in Scotland reveals determinants of healthcare-associated versus community-acquired infections. *Microbial Genomics*, 4, e000190.
- Grönthal, T., Österblad, M., Eklund, M., Jalava, J., Nykäsenoja, S., Pekkanen, K. e Rantala, M. (2018). Sharing more than friendship – transmission of NDM-5 ST167 and CTX-M-9 ST69 *Escherichia coli* between dogs and humans in a family, Finland, 2015. *Eurosurveillance*, 23.
- Hagos, D. G., Mezgebo, T. A., Berhane, S. e Medhanyie, A. A. (2019). Biofilm and hemagglutinin formation: a Hallmark for drug resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *BMC Research Notes*, 12:358.
- Haller, L., Chen, H., Ng, C., Le, T. H., Koh, T. H., Barkham, T., Sobsey, M. e Gin, K. Y.H. (2018). Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase- producing bacteria from hospital effluents in Singapore. *Science of The Total Environment*, 615, 1119–1125.

- Hammad, A. M., Hoffmann, M., Gonzalez-Escalona, N., Abbas, N. H., Yao, K. Koenig, S., Allué-Guardia, A. e Eppinger, M. (2019). Genomic features of colistin resistant *Escherichia coli* ST69 strain harboring mcr-1 on IncHI2 plasmid from raw milk cheese in Egypt. *Infection, Genetics and Evolution*, 73, 126–131.
- Hammerum, A. M., Porsbo, L. J., Hansen, F., Roer, L., Kaya, H., Henius, A., Møller, K. L., Justesen, U. S., Søres, L., Røder, B. L., Thomsen, P. K., Wang, M., Søndergaard, T. S., Holzknecht, B. J., Østergaard, C., Kjerulf, A., Kristensen, B. e Hasman H. (2020). Surveillance of OXA-244-producing *Escherichia coli* and epidemiologic investigation of cases, Denmark, January 2016 to August 2019. *Euro Surveill*, 25:1900742.
- Hansen, L. H., Jensen, L. B., Sørensen, H. I. e Sørensen, S. J. (2007). Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 145–147.
- Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A. e Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15, 305–311.
- Henderson, I. R. e Nataro, J. P. (2001). Virulence Functions of Autotransporter Proteins. *Infection and Immunity*, 69, 1231 – 1243.
- Hernday, A., Krabbe, M., Braaten, B. e Low, D. (2002). Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 16470–16476.
- Hertz, F. B., Nielsen, J. B., Schønning, K., Littauer, P., Knudsen, J. D., Løbner-Olesen, A. e Frimodt-Møller, N. (2016). “Population structure of Drug-Susceptible, -Resistant and ESBL-producing *Escherichia coli* from Community-Acquired Urinary Tract Infections.”. *BMC Microbiology*, 16.
- Ho, P. L., Yeung, M. K., Lo, W. U., Tse, H., Li, Z., Lai, E. L., Chow, K. H., To, K. K. e Yam, W. C. (2012). Predominance of pHK01-like incompatibility group FII plasmids encoding CTX-M-14 among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Hong Kong, 1996–2008. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73, 182–186.
- Hojabri, Z., Mirmohammadkhani, M., Darabi, N., Arab, M. e Pajand, O. (2019). Characterization of antibiotic-susceptibility patterns and virulence genes of five major sequence types of *Escherichia coli* isolates cultured from extraintestinal specimens: a 1-year surveillance study from Iran. *Infection and Drug Resistance*, 12, 893–903.
- Holland, M. S., Nobrega, D., Peirano, G., Naugler, C., Church, D. L. e Pitout, J. D. D. (2020). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing blood stream infections in a centralized Canadian region: a population-based surveillance study. *Clinical Microbiology and Infection*, 26, 1554.e1-1554.e8.
- Horcajada, J. P., Soto, S., Gajewski, A., Smithson, A., Jimenez de Anta, M. T., Mensa, J., Vila, J. e Johnson, J. R. (2005). Quinolone-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Strains from Phylogenetic Group B2 Have Fewer Virulence Factors than Their Susceptible Counterparts. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 2962–2964.
- Huang S-H, Wass C, Fu Q, Prasadarao NV, Stins M, Kim KS. (1995). *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells *in vitro* and *in vivo*: molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*. *Infect Immun*;63:4470–5.
- Huovinen, P. (2001). Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 1608–1614.
- Jaureguy, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., Picard, B., Nassif, X. e Brisse, S. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*, 9, 560.
- Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., e Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum betalactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10, 867–878.
- Joensen, K. G., Tetzschner, A. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M. e Scheutz F. (2015) Rapid and Easy *In Silico* Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol*, 53, 2410-2426.

- Joensen, K. G., Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R.S., Nielsen, E.M. e Aarestrup, F.M. (2014). Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 1501 – 1510.
- Johnson J.R, Brown J.J. (1996) A novel multiply-primed polymerase chain reaction assay for identification of variant papG genes encoding the Gal(al-4)Gal binding PapG adhesins of *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, 173, 920–926.
- Johnson, J. R. e Stell, A. L. (2000). Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 261–272.
- Johnson, J. R., Murray, A. C., Kuskowski, M. A., Schubert, S., Prère, M.-F., Picard, B., Colodner, R. e Raz, R. (2005). Distribution and Characteristics of *Escherichia coli* Clonal Group A. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 141–145.
- Johnson, J. R., Menard, M., Johnston, B., Kuskowski, M. A., Nichol, K. e Zhanel, G. G. (2009). Epidemic Clonal Groups of *Escherichia coli* as a Cause of Antimicrobial-Resistant Urinary Tract Infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 2733–2739.
- Johnson, J. R., Menard, M. E., Lauderdale, T. L., Kosmidis, C., Gordon, D., Collignon, P., Maslow, J. N., Andradević, A. T., Kuskowski, M. A. e Trans-Global Initiative for Antimicrobial Resistance Analysis Investigators (2011). Global Distribution and Epidemiologic Associations of *Escherichia coli* Clonal Group A, 1998–2007. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 2001–2009.
- Kanai, K., Shibayama, K., Suzuki, S., Wachino, J. e Arakawa, Y. (2004). Growth Competition of Macrolide-Resistant and -Susceptible *Helicobacter pylori* Strains. *Microbiology and Immunology*, 48, 977–980.
- Kanda, T., Abiko, G., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H., Iwai, N. e Wachi, M. (2020). RNase E-dependent degradation of *tnaA* mRNA encoding tryptophanase is prerequisite for the induction of acid resistance in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 10:7128
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. e Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 123–140.
- Karami, N., Wold, A. E. e Adlerberth, I. (2016). Antibiotic resistance is linked to carriage of *papC* and *iutA* virulence genes and phylogenetic group D background in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* from infants and young children. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36, 721–729.
- Kim, J., Bae, I. K., Jeong, S. H., Chang, C. L., Lee, C. H. e Lee, K. (2011). Characterization of IncF plasmids carrying the *blaCTX-M-14* gene in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 1263–1268.
- Kim, K. S. (2016). Human Meningitis-Associated *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, 7, 1–15.
- Kim, S., Sung, J. Y., Cho, H. H., Kwon, K. C. e Koo, S. H. (2016). Characteristics of the Molecular Epidemiology of CTX-M-Producing *Escherichia coli* Isolated from a Tertiary Hospital in Daejeon, Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1643–1649.
- Köhler, C. D. e Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 642–647.
- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M. e Lund, O. (2012). Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria. *J. Clin. Microbiol*, 50, 1355–1361.
- Le Bouguenec C., Archambaud M, Labigne A. (1992). Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 30, 1189–1193.
- Li, D., Reid, C. J., Kudinha, T., Jarocki, V. M. e Djordjevic, S. P. (2020). Genomic analysis of trimethoprim-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* and recurrent urinary tract infections. *Microb Genom*, 6.
- Litwin, M. S., Saigal, C. S., Yano, E. M., Avila, C., Geschwind, S. A., Hanley, J. M., Joyce, G. F., Madison, R., Pace, J., Polich, S. M. e Wang, M. (2005). Urologic diseases in america project: analytical methods and principal findings. *The journal of urology*, 173, 933–937.

- Lynch, J. P. Lesser, C. F. (2018). Host-Pathogen Interactions: What the EHEC Are We Learning from Host Genome-Wide Screens? *mBio*, 9, e01837-18.
- Lüthje, P. e Brauner, A. (2014). Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. *Advances in Microbial Physiology*, 65, 337–372.
- Madico, G., Akopyants, N. S. e Berg, D. E. (1995). Arbitrarily Primed PCR DNA Fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 Strains by Using Templates from Boiled Cultures. *Journal of clinical microbiology*, 33, 1534 – 1536.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T. e Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 268–281.
- Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. e Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 3140–3145.
- Maiden, M. C. J. (2006). Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 60, 561–588.
- Malberg Tetzschner, A. M., Johnson, J. R., Johnston, B. D., Lund, O. e Scheutz, F. (2020). *In silico* Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *Journal of Clinical Microbiology*, 58: e01269-20.
- Manges, A. R., Johnson, J. R., Foxman, B., O’Bryan, T. T., Fullerton, K. E. e Riley, L. W. (2001). Widespread Distribution of Urinary Tract Infections Caused by a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Clonal Group. *New England Journal of Medicine*, 345, 1007–1013.
- Manges, A. R., Perdreau-Remington, F., Solberg, O. e Riley, L. W. (2006). Multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal groups causing community-acquired bloodstream infections. *Journal of Infection*, 53, 25–29.
- Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D. e Pitout, J. D. D. (2019). Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. *Clinical Microbiology Reviews*, 32, e00135-18.
- Martinez, J. J., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Pinkner J. e Hultgren, S. (2000). Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO Journal*, 19, 2803–2812.
- Matsumura, Y., Yamamoto, M., Nagao, M., Hotta, G., Matsushima, A., Ito, Y., Takakura, S. e Ichiyama, S. (2012). Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 2612–2620.
- Mazumder, R., Abdullah, A., Ahmed, D. e Hussain, A. (2020). High Prevalence of blaCTX-M-15 Gene among Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates Causing Extraintestinal Infections in Bangladesh. *Antibiotics*, 9, 796 – 807.
- Miajlovic, H., Aogáin, M. M., Collins, C. J., Rogers, T. R. e Smith, S. G. J. (2016). Characterization of *Escherichia coli* bloodstream isolates associated with mortality. *Journal of Medical Microbiology*, 65, 71–79.
- Miao, Z., Li, S., Wang, L., Song, W. e Zhou, Y. (2017). Antimicrobial Resistance and Molecular Epidemiology of ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Outpatients in Town Hospitals of Shandong Province, China. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Mitsumori K., Terai A., Yamamoto S., Yoshida O. (1998). Identification of S, F1C and three PapG fimbrial adhesins in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 21:261–8.
- Mobley, H. L. T., Green, D. M., Trifillis, A. L., Johnson, D. E., Chippendale, G. R., Lockatell, C. V., Jones, B. D. e Warren J. W. (1990). Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infection and Immunity*, 58, 1281 – 1289.

- Moissenet, D., Salauze, B., Clermont, O., Bingen, E., Arlet, G., Denamur, E., Mérens, A., Mitanchez, D. e Vu-Thien, H. (2010). Meningitis Caused by *Escherichia coli* Producing TEM-52 Extended-Spectrum β -Lactamase within an Extensive Outbreak in a Neonatal Ward: Epidemiological Investigation and Characterization of the Strain. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 2459–2463.
- Moreno, E., Prats, G., Sabaté, M., Pérez, T., Johnson, J. R. e Andreu, A. (2006). Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 204–211.
- Mostafavi, S. K. S., Najar-Peerayeh, S., Mobarez, A. M. e Parizi, M. K. (2019). Characterization of uropathogenic *E. coli* O25b-B2-ST131, O15:K52:H1, and CGA: Neutrophils apoptosis, serum bactericidal assay, biofilm formation, and virulence typing. *Journal of Cellular Physiology*, 234, 18272–18282.
- Mulvey, M. A. (1998). Induction and Evasion of Host Defenses by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 282, 1494–1497.
- Nataro, J. P. e Kaper J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 142–201
- Navarro-Garcia, F. e Elias, W. P. (2011). Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. *Gut Microbes*, 2, 13–24.
- Neoh, H., Tan, X.-E., Sapri, H. F. e Tan, T. L. (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infection, Genetics and Evolution*, 74, 103935.
- Nishino, K. e Yamaguchi, A. (2001). Analysis of a Complete Library of Putative Drug Transporter Genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183, 5803–5812.
- Nüesch-Inderbinnen, M. T., Baschera, M., Zurfluh, K., Hächler, H., Nüesch, H. e Stephan, R. (2017). Clonal Diversity, Virulence Potential and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Causing Community Acquired Urinary Tract Infection in Switzerland. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Olsén, A., Jonsson, A. e Normark, S. (1989). Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*, 338, 652–655.
- Olsén, A., Wick, M. J., Mörgelein, M. e Bjorck, L. (1998). Curli, Fibrous Surface Proteins of *Escherichia coli*, Interact with Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. *Infection and Immunity*, 66, 944–949.
- Olsén, A., Herwald, H., Wikstrom, M., Persson, K., Mattsson, E., Bjorck, L. (2002). Identification of Two Protein-binding and Functional Regions of Curli, a Surface Organelle and Virulence Determinant of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 34568–34572.
- OMS (2017). Organização Mundial da Saúde. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Disponível em: <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>. Acesso em: 10/07/2020
- Paramita, R. I., Nelwan, E. J., Fadilah, F., Renesteen, E., Puspadari, N. e Erlina, L. (2020). Genome-based characterization of *Escherichia coli* causing bloodstream infection through next-generation sequencing. *PLoS One*, 15:e0244358.
- Parkkinen, J., Rogers, G. N., Korhonen, T., Dahr, W. e Finne, J. (1986). Identification of the O-linked sialyloligosaccharides of glycophorin A as the erythrocyte receptors for S-fimbriated *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 54, 37–42.
- Parvez, A. S. e Rahman, D. (2018). Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli*. *Microbiology of Urinary Tract Infections - Microbial Agents and Predisposing Factors*.
- Paterson, D. L. e Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 657–686.
- Peirano, G., Mulvey, G. L., Armstrong, G. D. e Pitout, J. D. D. (2013). Virulence potential and adherence properties of *Escherichia coli* that produce CTX-M and NDM β -lactamases. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 525–530.
- Pérez-Pérez, F.J., Hanson, N.D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2153–2162.

- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J. e Denamur, E. (1999). The Link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection. *Infection and Immunity*, 67, 546–553.
- Pitout, J.D. (2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 10, 1165–1176.
- Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P. e Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectrum*, 6:ARBA-0026-2017.
- Poole, K. (2005). Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 479–487
- Queenan, A. M. e Bush, K. (2007). Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 440–458.
- Raetz, C. R. H. (1990). Biochemistry of Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 59, 129–170.
- Rice, L. B. (2012). Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. *Mayo Clinic Proceedings*, 87, 198–208.
- Rietschel, E. T., Brade, H., Holst, O., Brade, L., Müller-Loennies, S., Mamat, U., Zahringer, U., Beckmann, F., Seydel, U., Brandenburg, K., Ulmer, A. J., Mattern, T., Heine, H., Schletter, J., Loppnow, H., Schonbeck, U., Flad, H. D., Hauschildt, S., Schade, U. F., Di Padova, F., Kusumoto, S. e Schumann, R. R. (1996). Bacterial Endotoxin: Chemical Constitution, Biological Recognition, Host Response, and Immunological Detoxification. *Pathology of Septic Shock*, 39–81.
- Riley, L. W. (2014). Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 380–390.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Hye Park, C., Bush, K. e Hooper, D. C. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12, 83–88.
- Roer, L., Tchesnokova, V., Allesoe, R., Muradova, M., Chattopadhyay, S., Ahrenfeldt, J., Thomsen, M. C. F., Lund, O., Hansen, F., Hammerum, A. M., Sokurenko, E. e Hasman, H. (2017a). Development of a web tool for *Escherichia coli* subtyping based on *fimh* alleles. *J Clin Microbiol*, 55, 2538–2543.
- Roer, L., Hansen, F., Thomsen, M. C. F., Knudsen, J. D., Hansen, D. S., Wang, M., Samulioniene, J., Justesen, U. S., Røder, B. L., Schumacher, H., Østergaard, C., Andersen, L. P., Dzajic, E., Søndergaard, T. S., Stegger, M., Hammerum, A. M. e Hasman, H. (2017b). WGS-based surveillance of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from bloodstream infections in Denmark. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72, 1922–1929.
- Rosenow, C., Esumeh, F., Roberts, I. S. e Jann, K. (1995). Characterization and localization of the KpsE protein of *Escherichia coli* K5, which is involved in polysaccharide export. *Journal of Bacteriology*, 177, 1137–1143.
- Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 1109–1117.
- Russo, T. A. e Johnson, J. R. (2000). Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 1753–1754.
- Sanchez, G. V., Babiker, A., Master, R. N., Luu, T., Mathur, A. e Bordon, J. (2016). Antibiotic Resistance among Urinary Isolates from Female Outpatients in the United States in 2003 and 2012. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60, 2680–2683.
- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E. e Heesemann, J. (1998). Prevalence of the “High-Pathogenicity Island” of *Yersinia* Species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun* 66:480-485.
- Shah, C., Baral, R., Bartaula, B. e Shrestha, L. B. (2019). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC Microbiology*, 19.

- Sheldon, I. M., Rycroft, A. N., Dogan, B., Craven, M., Bromfield, J. J., Chandler, A., Roberts, M. H., Price, S. B., Gilbert, R. O. e Simpson, K. W. (2010). Specific Strains of *Escherichia coli* Are Pathogenic for the Endometrium of Cattle and Cause Pelvic Inflammatory Disease in Cattle and Mice. *PLoS ONE*, 5, e9192.
- Shruthi, N., Kumar, R. e Kumar, R. (2012). Phenotypic Study of Virulence Factors in *Escherichia Coli* Isolated From Antenatal Cases, Catheterized Patients, and Faecal Flora. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 6, 1699-1703.
- Selander, R. K., Musser, J. M., Caugant, D. A., Gilmour, M. N. e Whittam, T. S. (1987). Population genetics of pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 3, 1–7.
- Silver, L. L. (2017). Fosfomycin: Mechanism and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7, a025262.
- Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 3, 155–160.
- Smith, C. A. e Baker, E. N. (2002). Aminoglycoside Antibiotic Resistance by Enzymatic Deactivation. *Current Drug Target - Infectious Disorders*, 2, 143–160.
- Solberg, O. D., Ajiboye, R. M. e Riley, L. W. (2006). Origin of Class 1 and 2 Integrons and Gene Cassettes in a Population-Based Sample of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 1347–1351.
- Spurbeck, R. R., Stapleton, A. E., Johnson, J. R., Walk, S. T., Hooton, T. M. e Mobley, H. L. T. (2011). Fimbrial Profiles Predict Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains: Contribution of Ygi and Yad Fimbriae. *Infection and Immunity*, 79, 4753–4763.
- Stanley, P., Koronakis, V. e Hughes, C. (1998). Acylation of *Escherichia coli* Hemolysin: A Unique Protein Lipidation Mechanism Underlying Toxin Function. *Microbiology and Molecular Reviews*, 62, 309–333.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I. e Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115, 891–899.
- Strockbine, N. A., Bopp, C. A., Fields, P. I., Kaper, J. B. e Nataro, J. P. (2015). *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In *Manual of Clinical Microbiology*, 11th Edition. Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., Carroll, K. C., Landry, M. L., Funke, G., Richter, S. S. e Warnock, D. W., eds. (American Society of Microbiology), pp. 685–713
- Stromberg, Z. R., Johnson, J. R., Fairbrother, J. M., Kilbourne, J., Van Goor, A., Curtiss, R. e Mellata, M. (2017). Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. *PLOS ONE*, 12, e0180599.
- Subashchandrabose, S. e Mobley, H. L. T. (2015). Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 3.
- Sundqvist, M., Granholm, S., Naseer, U., Rydén, P., Brolund, A., Sundsfjord, A., Kahlmeter, G. e Johansson, A. (2014). Within-Population Distribution of Trimethoprim Resistance in *Escherichia coli* before and after a Community-Wide Intervention on Trimethoprim Use. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 7492–7500.
- Tarleton, N. J., Moritz, C., Adams-Sapper, S. e Riley, L. W. (2019). Genotypic analysis of uropathogenic *Escherichia coli* to understand factors that impact the prevalence of β -lactam-resistant urinary tract infections in a community. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 19, 173–180.
- Tartof, S. Y., Solberg, O. D., Manges, A. R. e Riley, L. W. (2005). Analysis of a Uropathogenic *Escherichia coli* Clonal Group by Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5860–5864.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B. e Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 207–217.
- Tenney, J., Hudson, N., Alnifaidy, H., Li, J. T. C. e Fung, K. H. (2018). Risk factors for acquiring multidrug-resistant organisms in urinary tract infections: A systematic literature review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26, 678–684.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. e Swaminathan, B. (1995). Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of clinical microbiology*, 33, 2233 – 2239.

- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G. e Maffei, M. E. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y. e Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*. 431, 3472–3500.
- Trabulsi, L. R., Keller, R. e Gomes, T. A. T. (2002). Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 508–513.
- Turkovicova, L., Smidak, R., Jung, G., Turna, J., Lubec, G. e Aradska, J. (2016). Proteomic analysis of the TerC interactome: Novel links to tellurite resistance and pathogenicity. *Journal of Proteomics*, 136, 167–173.
- Van Loon, K., Voor in't holt, A. F. e Vos, M. C. (2017). A Systematic Review and Meta-analyses of the Clinical Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62.
- Venkatesan, N., Perumal, G. e Doble, M. (2015). Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiology*, 10, 1743–1750.
- Vizcarra, A. I., Hosseini, V., Kollmannsberger, P., Meier, S., Weber, S. S., Arnoldini, M., Ackermann, M. e Vogel, V. (2016). How type 1 fimbriae help *Escherichia coli* to evade extracellular antibiotics. *Scientific Reports*, 6.
- Wang, X. e Quinn, P. J. (2010). Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in Lipid Research*, 49, 97–107.
- Wang, X., Chen, J., Kang, Y., Jiang, N., An, S. e Gao, Z. (2012). Prevalence and characterization of plasmid-mediated blaESBL with their genetic environment in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in patients with pneumonia. *Chin. Med. J.* 125, 894–900.
- Wang, D., Liang, H., Chen, J., Mou, Y. e Qi, Y. (2014). Structural and Environmental Features of Novel *MdfA* Variant and *MdfA* Genes in Recombinant Regions of *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance*, 20, 392–398.
- Wang, S., Zhao, S.-Y., Xiao, S.-Z., Gu, F.-F., Liu, Q.-Z., Tang, J., Guo, X.-K., Ni, Y.-X. e Han, L.-Z. (2016). Antimicrobial Resistance and Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Causing Bloodstream Infections in Three Hospitals in Shanghai, China. *PLOS ONE*, 11, e0147740.
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R. e Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, 85, 11–19.
- Wiles, T. J. e Mulvey, M. A. (2013). The RTX pore-forming toxin α -hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: progress and perspectives. *Future Microbiology*, 8, 73–84.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C. J., Ochman, H. e Achtman, M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60, 1136–1151.
- Xu, Y., Gu, B., Huang, M., Liu, H., Xu, T., Xia, W. e Wang, T. (2015). Epidemiology of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) during 2000-2012 in Asia. *Journal of Thoracic Disease*, 7, 376–385.
- Yahiaoui, M., Robin, F., Bakour, R., Hamidi, M., Bonnet, R. e Messai, Y. (2015). Antibiotic Resistance, Virulence, and Genetic Background of Community-Acquired Uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 21, 516–526.
- Yamaji, R., Rubin, J., Thys, E., Friedman, C. R. e Riley, L. W. (2018). Persistent Pandemic Lineages of Uropathogenic *Escherichia coli* in a College Community from 1999 to 2017. *Journal of Clinical Microbiology*, 56, e01834–17.
- Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 12:85–90.
- Yamane, K., Wachino, J. I., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T. e Arakawa, Y. (2007). New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, QepA, Found in an *Escherichia coli* Clinical Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 3354–3360.

- Yardeni, E. H., Zomot, E. e Bibi, E. (2018). The fascinating but mysterious mechanistic aspects of multidrug transport by MdfA from *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 169, 455–460.
- Yun, K. W., Kim, D. S., Kim, W. e Lim, I. S. (2015). Molecular typing of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Korean children with urinary tract infection. *Korean Journal of Pediatrics*, 58, 20–27.
- Zankari, E., Allesøe, R., Joensen, K. G., Cavaco, L. M., Lund, O. e Aarestrup, F. M. (2017). PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72, 2764–2768.
- Zhang, J., Zheng, B., Zhao, L., Wei, Z., Ji, J., Li, L. e Xiao, Y. (2014). Nationwide high prevalence of CTX-M and an increase of CTX-M-55 in *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset infections in Chinese county hospitals. *BMC Infectious Diseases*, 14.
- Zhao, W. H. e Hu, Z. Q. (2012). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39, 79–101.
- Zhao, S.Y., Wang, Y.C., Xiao, S.Z., Jiang, X.F., Guo, X.K., Ni, Y.X. e Han, L.-Z. (2015). Drug susceptibility and molecular epidemiology of *Escherichia coli* in bloodstream infections in Shanghai, China, 2011–2013. *Infectious Diseases*, 47, 310–318.
- Zhou, G., Mo, W., J., Sebbel, P., Min, G., Neubert, T., A., Glockshuber, R., Wu, X., R., Sun, T., T. e Kong, X., P. (2001). Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from *in vitro* FimH binding. *Journal of Cell Science*, 114, 4095–4103.
- Zhou, Z., Alikhan, N. F., Mohamed, K., the Agama Study Group, Achtman, M. (2020). The EnteroBase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny and *Escherichia* core genomic diversity. *Genome Res.* 30, 138–152.

9 ANEXOS

Anexo 1 – Artigos incluídos na revisão bibliográfica

Ano	País do estudo	Número de amostras do ST69 (%) / total de amostras	Prevalência do ST69 no estudo	Espécime de isolamento	Observações	Referência
2001	Estados Unidos	49 (26) / 192	N.A ^a	Urina	Do total de 386 amostras da coleção, 192 foram tipadas. A maioria das amostras tipadas eram resistentes a SXT	Manges <i>et al.</i> , 2001
2005	Estados Unidos	66 (6) / 1102	N.A	Sangue Urina Outros não especificados	N.A	Johnson <i>et al.</i> , 2005
2009	Brasil	3 (7) / 42	N.A	Sangue Urina	N.A	Dias <i>et al.</i> , 2009
2009	Brasil	15 (13) / 118	1º	Urina	N.A	Dias <i>et al.</i> , 2009
2010	França	3 (3) / 110	5º	N.I ^b	N.A	Bert <i>et al.</i> , 2010
2011	Espanha	22 (4) / 500	2º	N.I	Entre os 3 ST pesquisados (ST69, ST131 e ST393), o ST69 foi o segundo mais prevalente	Blanco <i>et al.</i> , 2011
2011	Coréia do Sul	3 (9) / 35	3º	Ferida Urina	Dentre as 138 amostras do estudo, foi feito o MLST apenas para amostras produtoras de CTX-M14	Kim <i>et al.</i> , 2011
2012	Inglaterra	27 (9) / 300	3º	Urina	N.A	Gibreel <i>et al.</i> , 2012

2012	Japão	7 (1) / 581	3°	N.I.	Inclusas no estudo apenas amostras produtoras de ESBL	Matsumura <i>et al.</i> , 2012
2012	China	5 (3) / 167	4°	Sangue	Inclusas no estudo apenas amostras produtoras de ESBL	Ho <i>et al.</i> , 2012
2013	Estados Unidos	15 (5) / 299	5°	Sangue Urina Outro não especificado	N.A	Banerjee <i>et al.</i> , 2013
2014	China	9 (3) / 340	6°	Fezes	Dentre 347 amostras da coleção, 340 foram tipadas por MLST. O autor informou que 7 amostras morreram	Chen <i>et al.</i> , 2014
2014	Suécia	35 (6) / 548	2°	Urina	N.A	Sundqvist <i>et al.</i> , 2014
2014	Brasil	3 (8) / 36	1°	N.I	N.A	Berman <i>et al.</i> , 2014
2014	China	1 (5) / 22	5°	N.I	Inclusas no estudo apenas amostras resistentes ou com susceptibilidade reduzida a carbapenemas	Cai <i>et al.</i> , 2014

2014	China	14 (7) / 213	2º	N.I	De um total de 550 amostras da coleção, foi feita a tipagem molecular apenas para as 213 amostras produtoras ESBL	Zhang <i>et al.</i> , 2014
2015	Coréia do sul	5 (8) / 64	4º	Urina	Inclusas no estudo apenas amostras de pacientes com menos de 18 anos	Yun <i>et al.</i> , 2015
2015	China	12 (9) / 128	2º	Sangue	N.A	Zhao <i>et al.</i> , 2015
2015	Argélia	5 (14) / 35	2º	Urina	No estudo foram inclusas 150 amostras. Porém, foi realizado MLST apenas para as amostras RMD dos filogrupos B2 e D (n=35);	Yahiaoui <i>et al.</i> , 2015
2015	Arábia Saudita	15 (7) / 202	4ª	Urina	N.A	Alghoribi <i>et al.</i> , 2015
2016	Irlanda	3 (15) / 20	3º	Sangue	Foram inclusas no estudo apenas amostras de ICS de pacientes que vieram a óbito	Miajlovic <i>et al.</i> , 2016
2016	Dinamarca	27 (10) / 286	2º	Urina	N.A	Hertz <i>et al.</i> , 2016
2016	China	5 (6) / 90	3º	Sangue	N.A	Wang <i>et al.</i> , 2016

2016	Coréia do Sul	6 (8) / 80	4°	Urina	Foram inclusas no estudo apenas amostras produtoras de ESBL CTX-M	Kim <i>et al.</i> , 2016
2017	Brasil	15 (11) / 139	2°	Urina	A coleção é a mesma do estudo de dias <i>et al.</i> , 2009, com adição de 9 amostras de espécimes de mulheres e 12 amostras de espécimes de homens	De Souza da-Silva <i>et al.</i> , 2017
2017	Suíça	6 (14) / 44	1°	Urina	N.A	Nüesch-Inderbinnen <i>et al.</i> , 2017
2017	Suécia	27 (6) / 477	1°	Fezes Urina	Dentre os 3 clones pesquisados, ST69, 131 e 393, o ST69 foi o mais frequente	Karami, Wold e Adlerberth, 2017
2017	China	15 (8) / 201	3°	N.I.	Foram isoladas 320 amostras de <i>E. coli</i> no total. Porém, foi feito MLST apenas para as 201 produtoras de ESBL;	Miao <i>et al.</i> , 2017
2017	Dinamarca	20 (4) / 518	4°	Sangue	Foi feito MLST apenas para amostras produtoras de ESBL, carbapenemases e/ou pAmpC (518/552);	Roer <i>et al.</i> , 2017b
2018	Estados Unidos	48 (11) / 441	4°	Urina	N.A	Yamaji <i>et al.</i> , 2018
2018	Brasil	9 (8) / 108	2°	Urina	N.A	Campos <i>et al.</i> , 2018

2018	Escócia	26 (16) / 162	2º	Sangue	N.A	Goswami <i>et al.</i> , 2018
2019	Irã	24 (7) / 335	2º	Urina Respiratório Ferida	N.A	Hojabri <i>et al.</i> , 2019
2019	Estados Unidos	31 (11) / 273	2º	Urina	N.A	Tarltona <i>et al.</i> , 2019
2019	Canadá	29 (8) / 385	5º	Urina	N.A	Fibke <i>et al.</i> , 2019
2020	Canadá	56 (8) / 682	3º	Sangue	N.A	Holland <i>et al.</i> , 2020
2020	Brasil	75 (15) / 499	1º	Urina	N.A	De Souza da- Silva <i>et al.</i> , 2020
2020	Espanha	13 (7) / 196	3º	N.I	N.A	Flament-Simon <i>et al.</i> , 2020
2020	Indonésia	3 (14) / 22	2º	Sangue	N.A	Paramita <i>et al.</i> , 2020
2020	Dinamarca	6 (25) / 24	2º	Urina Sangue Fezes	Foram analisadas apenas amostras produtoras de OXA-244	Hammerum <i>et al.</i> , 2020

2020	França	16 (7) / 218	3°	Urina	Foram analisadas apenas amostras produtoras de ESBL causando infecção febril no trato urinário em crianças	Birgy <i>et al.</i> , 2020
2020	Bangladesh	5 (4) / 128	3°	N.I	N.A	Mazumder <i>et al.</i> , 2020
2020	Austrália	5 (7) / 67	2°	Urina	Foram analisadas apenas amostras resistentes a trimetoprim e/ou amostras de ITU recorrentes	Li <i>et al.</i> , 2020

^a Não se aplica;

^b Não foi informado de que espécimes clínicos foram isoladas as amostras do ST69.

Anexo 2 – Informações dos 40 genomas baixados do banco de dados

Identificação da amostra	Número de acesso	Espécime de isolamento	<i>fimH</i>
KGu020	DRR063399	Ambiental	<i>fimH27</i>
KMi011	DRR063363	Ambiental	<i>fimH27</i>
E2026_9	SRR5075686	Ambiental	<i>fimH27</i>
D.14	SRR5279327	Ambiental	<i>fimH47</i>
EK7.18	SRX6792834	Ambiental	<i>fimH27</i>
TC1910River3	traces-0PFgvYy	Ambiental	<i>fimH27</i>
PNUSAE048738	SRR11116076	Ambiental	<i>fimH47</i>
S31-5	SRR8738073	Ambiental	<i>fimH27</i>
K DD Zu-13	SRR8738127	Ambiental	<i>fimH27</i>
Cw Lw Down-1	SRR8738140	Ambiental	<i>fimH27</i>
MER-5	SRR5936476	Sangue	<i>fimH27</i>
MER-22	SRR5936500	Sangue	<i>fimH27</i>
TCE03	DRR102628	Sangue	<i>fimH27</i>
KME07	DRR102602	Sangue	<i>fimH27</i>
GASRECE218	SRR6505330	Sangue	<i>fimH27</i>
HVH 223 (4-2976528)	SRR958455	Sangue	<i>fimH27</i>
HVH 215 (4-3008371)	SRR784756	Sangue	<i>fimH27</i>
HVH 130 (4-7036876)	SRR958244	Sangue	<i>fimH27</i>
HICF136	SRR3051036	Sangue	<i>fimH27</i>
HICF247	SRR3051005	Sangue	<i>fimH27</i>
MOD1-EC685	SRR4261770	Sangue	<i>fimH27</i>
COL-89	ERR5863513	Sangue	<i>fimH27</i>
COL-87	ERR5863511	Sangue	<i>fimH27</i>
US21	SRR10568448	Sangue	<i>fimH483</i>
US28	SRR10568442	Sangue	<i>fimH27</i>
CM20	DRR102568	Urina	<i>fimH27</i>
F14W138294	SRR8505931	Urina	<i>fimH27</i>

F14W125408	SRR8505932	Urina	fimH27
M14W071194-2	SRR8505937	Urina	fimH27
P6338	SRR7879958	Urina	fimH27
D9009	SRR7879953	Urina	fimH27
P6087	SRR7879884	Urina	fimH27
0000-0061-1771	SRR5120222	Urina	fimH27
0000-0053-3941	SRR5093683	Urina	fimH27
0000-0065-6492	SRR6072766	Urina	fimH27
C014	SRR8871876	Urina	fimH27
H032	SRR8871863	Urina	fimH27
d028-11	SRR8871808	Urina	fimH27
EC114	SRR9588130	Urina	fimH27
109980	SRR10270325	Urina	fimH27

Anexo 3 – Perfil de genes de resistência presentes nos 40 genomas baixados do banco de dados

Identificação da amostra	Genes e mutações que podem conferir resistência
KGu020	<i>aph(3')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{CTX-M-2}, bla_{TEM-1B}, dfrA5, mdf(A), sul2. GyrA S83L.</i>
KMi011	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{TEM-1B}, dfrA7, mdf(A), qacE, sitABCD, sul1, sul2</i>
E2026_9	<i>mdf(A), sitABCD</i>
D.14	<i>mdf(A)</i>
EK7.18	<i>aac(3)-IId, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{TEM-1b}, dfrA14, dfrA17, mdf(A), qnrS1, sul2, tet(A). ParC S80I</i>
TC1910River3	<i>aadA5, aac(3)-IId, bla_{TEM-1b}, dfrA17, mdf(A), mph(A), qacE, sitABCD, sul1, tet(B). GyrA S83L, ParC S80I</i>
PNUSAE048738	<i>mdf(A), sitABCD. ParC S57T</i>
S31-5	<i>aadA5, aac(3)-IId, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{TEM-1b}, dfrA17, mdf(A), mph(A), qacE, sitABCD, sul1, sul2, tet(A)</i>
K DD Zu-13	<i>aac(3)-IV, aph(3'')-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-Id, bla_{CTX-M-1}, mdf(A), mph(A), sitABCD</i>
Cw Lw Down-1	<i>aac(3)-IV, aph(3'')-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-Id, bla_{CTX-M-1}, mdf(A), mph(A), sitABCD</i>
MER-5	<i>aadA5, bla_{CTX-M-15}, bla_{TEM-1b}, dfrA17, mdf(A), mph(A), qacE, sul1, tet(B). GyrA S83L</i>

MER-22	<i>bla_{CTX-M-14}, mdf(A), sitABCD, tet(A). GyrA S83L</i>
TCE03	<i>aadA5, aac(3)-IIa, bla_{CTX-M-14}, bla_{TEM-1b}, dfrA17, mdf(A), mph(A), qacE, sitABCD, sul1, tet(A). GyrA S83L</i>
KME07	<i>aadA5, aac(3)-IIa, bla_{TEM-1b}, dfrA17, mdf(A), mph(A), qacE, sitABCD, sul1, tet(A). GyrA S83L</i>
GASRECE218	<i>bla_{SHV-12}, mdf(A), sitABCD</i>
HVH 223 (4-2976528)	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{TEM-1b}, bla_{TEM-1c}, mdf(A), sitABCD, sul2</i>
HVH 215 (4-3008371)	<i>aadA5, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{TEM-1b}, dfrA17, mdf(A), qacE, sitABCD, sul1, sul2</i>
HVH 130 (4-7036876)	<i>aadA5, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{TEM-1b}, catA1, dfrA17, mdf(A), mph(A), qacE, sitABCD, sul1, sul2, tet(B)</i>
HICF136	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{TEM-1b}, dfrA14, mdf(A), mph(A), sul2</i>
HICF247	<i>aadA5, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{TEM-1b}, dfrA17, mdf(A), qacE, sitABCD, sul1, sul2</i>
MOD1-EC685	<i>aph(3')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, mdf(A), sul2, tet(B)</i>
COL-89	<i>Bla_{TEM-1b}, dfrA14, mdf(A), mph(A), sitABCD, tet(B). GyrA S83L, ParC S80I</i>
COL-87	<i>mdf(A), sitABCD</i>

US21	<i>mdf(A), sitABCD</i>
US28	<i>Mdf(A), sitABCD</i>
CM20	<i>aadA5, aac(3)-IIa, bla_{TEM-1b}, dfrA17, mdf(A), mph(A), qacE, sitABCD, sul1, tet(A). GyrA S83L</i>
F14W138294	<i>aadA5, bla_{TEM-1b}, catA1, dfrA17, mdf(A), sitABCD, sul1, tet(B)</i>
F14W125408	<i>aadA5, aac(3)-IId, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{TEM-1b}, dfrA17, mdf(A), mph(A), qacE, sitABCD, sul1, sul2, tet(A)</i>
M14W071194-2	<i>Aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{TEM-36}, dfrA14, mdf(A), mph(A), sitABCD, sul2. GyrA S83L</i>
P6338	<i>aadA5, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{TEM-1b}, dfrA17, mdf(A), mph(A), qacE, sitABCD, sul1, sul2</i>
D9009	<i>aadA5, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{TEM-1b}, dfrA17, mdf(A), mph(A), qacE, sitABCD, sul1, sul2</i>
P6087	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{TEM-1b}, dfrA17, mdf(A), sitABCD, sul2</i>
0000-0061-1771	<i>floR, mdf(A), tet(A). GyrA S83L, GyrA D87N, ParC S80I, ParE S458A</i>
0000-0053-3941	<i>aadA5, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{TEM-1b}, dfrA17, erm(B), mdf(A), mph(A), qacE, sitABCD, sul1, sul2. GyrA S83L</i>
0000-0065-6492	<i>Aac(3)-IId, aph(3')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{CMY-2}, mdf(A), sul2, tet(B). GyrA S83L, ParE L416F</i>

C014	<i>aadA5, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{TEM-1b}, dfrA17, mdf(A), qacE, sitABCD, sul1, sul2</i>
H032	<i>Mdf(A), sitABCD. GyrA S83L</i>
d028-11	<i>Mdf(A), sitABCD</i>
EC114	<i>Bla_{TEM-1b}, mdf(A), sitABCD</i>
109980	<i>aadA1, aac(3)-VIa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{CMY-2}, bla_{TEM-1b}, floR, mdf(A), qacE, sitABCD, sul1, sul2, tet(A)</i>

Anexo 4 – Perfil de genes de virulência dos 40 genomas baixados do banco de dados

Identificação da amostra	Genes de virulência
KGu020	<i>air, lpfA, cia, cvaC, hlyF, chuA, iroN, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMIII_K96, eilA, etsC, gad, iss, mchF, ompT, terC, traT</i>
KMi011	<i>air, lpfA, papC, cia, chuA, sitA, kpsE, kpsMIII_K96, eilA, iss, ompT, terC, traT</i>
E2026_9	<i>air, lpfA, chuA, sitA, kpsE, kpsMII_K5, eilA, gad, iss, ompT, terC</i>
D.14	<i>air, lpfA, chuA, kpsE, eilA, gad, terC, traT</i>
EK7.18	<i>air, iha, lpfA, papA_F43, cma, cvaC, hlyF, sat, chuA, fyuA, iroN, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMII_K5, eilA, gad, iss, mchF, ompT, terC, traT</i>
TC1910River3	<i>air, iha, lpfA, papA_F43, sat, senB, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMII, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
PNUSAE048738	<i>air, lpfA, chuA, sitA, kpsE, kpsMII_K52, eilA, gad, iss, terC</i>
S31-5	<i>air, lpfA, senB, chuA, fyuA, irp2, sitA, kpsE, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
K DD Zu-13	<i>air, lpfA, chuA, fyuA, irp2, sitA, kpsE, kpsMII_K5, eilA, etpD, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
Cw Lw Down-1	<i>air, lpfA, chuA, fyuA, irp2, sitA, kpsE, kpsMII_K5, eilA, etpD, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
MER-5	<i>air, lpfA, senB, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMIII_K96, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>

MER-22	<i>air, iha, lpfA, papA_fsiA_F16, papC, sat, senB, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMII_K52, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
TCE03	<i>air, iha, lpfA, papA_fsiA_F16, papC, sat, senB, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMII_K52, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
KME07	<i>air, iha, lpfA, papA_fsiA_F16, papC, mcbA, sat, senB, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMII_K52, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
GASRECE218	<i>air, lpfA, chuA, sitA, kpsE, kpsMII_K5, gad, iss, ompT, terC</i>
HVH 223 (4-2976528)	<i>air, iha, lpfA, papA_fsiA_F16, papC, sat, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMII_K52, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
HVH 215 (4-3008371)	<i>air, lpfA, senB, chuA, fyuA, irp2, sitA, kpsE, kpsMII_K52, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
HVH 130 (4-7036876)	<i>air, iha, lpfA, papA_fsiA_F16, papC, sat, senB, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMII_K52, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
HICF136	<i>air, lpfA, mcbA, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMIII_K96, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
HICF247	<i>air, iha, lpfA, papA_fsiA_F16, papC, sat, senB, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMII_K52, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
MOD1-EC685	<i>afaA, afaB, afaC, afaD, afaE8, air, lpfA, mchB, mchC, mcmA, chuA, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMIII_K96, eilA, gad, iss, mchF, ompT, terC, traT</i>
COL-89	<i>air, lpfA, papA_F43, mcbA, sat, senB, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsM_K11, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>

COL-87	<i>air, lpfA, chuA, sitA, kpsE, kpsMIII_K96, eilA, gad, iss, ompT, terC</i>
US21	<i>air, lpfA, astA, chuA, fyuA, irp2, sitA, kpsE, kpsMII_K52, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
US28	<i>air, iha, lpfA, papA_fsiA_F16, papC, sat, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMII_K52, eilA, gad, iss, ompT, terC</i>
CM20	<i>air, iha, lpfA, papA_fsiA_F16, papC, sat, senB, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMII_K52, eilA, gad, iss, mchF, ompT, terC, traT</i>
F14W138294	<i>air, lpfA, papA_feiA_F8, papC, senB, chuA, fyuA, irp2, sitA, kpsE, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
F14W125408	<i>air, lpfA, senB, chuA, sitA, kpsMII, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
M14W071194-2	<i>air, lpfA, papA_feiA_F8, papC, chuA, fyuA, irp2, sitA, kpsE, eilA, gad, iss, terC, traT</i>
P6338	<i>air, iha, lpfA, papA_fsiA_F16, papC, mcbA, sat, senB, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMII_K52, eilA, gad, iss, terC, traT</i>
D9009	<i>air, iha, lpfA, papA_fsiA_F16, papC, sat, senB, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
P6087	<i>air, iha, lpfA, papA_fsiA_F16, papC, sat, senB, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMII_K4, eilA, gad, hra, iss, terC, traT</i>
0000-0061-1771	<i>air, lpfA, chuA, fyuA, irp2, kpsE, kpsMIII_K96, eilA, gad, ompT, terC</i>

0000-0053-3941	<i>air, iha, lpfA, papA_fsiA_F16, papC, sat, senB, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMII_K52, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
0000-0065-6492	<i>air, iha, lpfA, papA_fsiA_F16, papC, sat, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMII_K52, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
C014	<i>air, iha, lpfA, papA_fsiA_F16, papC, sat, senB, chuA, fyuA, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsMII_K52, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
H032	<i>air, lpfA, papA_feiA_F8, senB, chuA, fyuA, irp2, sitA, kpsE, eilA, gad, iss, ompT, terC, traT</i>
d028-11	<i>air, lpfA, chuA, fyuA, irp2, sitA, kpsE, kpsMII_K5, eilA, gad, iss, ompT, terC</i>
EC114	<i>air, lpfA, chuA, sitA, kpsE, kpsMIII_K96, eilA, gad, iss, ompT, terC</i>
109980	<i>air, lpfA, tsh, cvaC, hlyF, mchB, mchC, mcmA, chuA, fyuA, iroN, irp2, iucC, iutA, sitA, kpsE, kpsM_K15, eilA, etsC, gad, hra, iss, mchF, ompT, terC, traT</i>
