

MARIANA ANJO BARBOSA

CLONE ST95 COMO CAUSA DE INFECÇÕES POR
Escherichia coli NO ESTADO DO 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
MAIO / 2021

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Dra. Beatriz Meurer Moreira e coorientação do Mestre Eduardo Moreira de Castro.

CIP - Catalogação na Publicação

B599c Barbosa, Mariana Anjo
 Clone st95 como causa de infecções por
 Escherichia coli no estado do Rio de Janeiro /
 Mariana Anjo Barbosa. -- Rio de Janeiro, 2021.
 64 f.

 Orientadora: Beatriz Meurer Moreira.
 Coorientador: Eduardo Moreira de Castro.
 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. ST95. 3.
 susceptibilidade a antimicrobianos. I. Moreira,
 Beatriz Meurer, orient. II. de Castro, Eduardo
 Moreira, 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: **Mariana Anjo Barbosa**

DRE: 117084595

BANCA EXAMINADORA: Profa. Marinella Silva Laport (Presidente)
Profa. Káris Maria de Pinho Rodrigues
Profa. Rosana Barreto Rocha Ferreira
Profa. Karla Rodrigues Miranda (Suplente)

Título da Monografia: **“Clone ST95 como causa de infecções
por *Escherichia coli* no estado do Rio de Janeiro”**

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

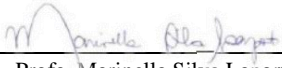
Data e hora de início: **13 de maio de 2021 às 16:00h**

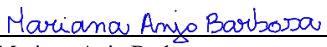
Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota **10,0** neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE 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, 13 de maio de 2021.


NOTA Banca Examinadora:

<u>10,0</u>	Profa. Marinella Silva Laport
<u>10,0</u>	Profa. Káris Maria de Pinho Rodrigues
<u>10,0</u>	Profa. Rosana Barreto Rocha Ferreira
<u> </u>	Profa. Karla Rodrigues Miranda

Presidente da banca 
Profa. Marinella Silva Laport

Aluno: 
Mariana Anjo Barbosa

Orientador: 
Profa. Beatriz Meurer Moreira / Coorientador: M.Sc. Eduardo Moreira Castro

Coordenador de TCC 
Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Dr^a Beatriz Moreira, que me recebeu de braços abertos. Agradeço por toda confiança, disponibilidade, paciência, orientação e oportunidade. Agradeço também ao meu coorientador Eduardo Moreira pelos ensinamentos, disponibilidade e contribuição durante a realização do projeto. Obrigada a todos os meus colegas do LIMM, alunos, professores e servidores técnicos-administrativos, principalmente por todo conhecimento compartilhado.

A Deus e aos meus pais, Carla e João Luiz, que me permitiram ter todas as melhores condições para que eu pudesse passar por essa etapa na minha vida. Agradeço também a eles por toda compreensão, apoio e incentivo incondicional que me proporcionam. Obrigada por todo o carinho e por me ensinarem os valores de vida que hoje me transformaram em quem eu sou. Sempre posso contar com vocês para o que precisar e espero conseguir dar muito orgulho aos dois e retribuir todo esse tempo, dedicação e amor.

Ao meu irmão, João Fernando, meu parceiro de vida que desde os meus dois anos de idade vem me acompanhando e tornando a minha vida mais feliz. Apesar de não deixar de fazer seu papel de irmão mais novo e sempre pegar no meu pé, sou muito grata por poder dividir muitas aventuras e momentos com você. Mesmo sem saber, você me faz querer ser uma pessoa melhor, me dá forças pra continuar seguindo em frente e foi fundamental para eu conseguir concluir esta etapa em um ano tão difícil para todos.

À minha família Anjo Barbosa por todo apoio. Apesar de parte dela estar distante, sendo dividida pelo oceano Atlântico, são todos igualmente presentes na minha vida. São muito importantes para o meu crescimento e dividimos muitos momentos bons nas reuniões de família. Um agradecimento especial aos meus avós por serem, entre muitas coisas, grandes exemplos de vida pra mim.

Agradeço ao apoio das minhas amigas do grupo “*friends*”, Ana Clara, Catarina e Gabriela, parceiras desde o colégio, sou muito feliz por poder dividir a vida com vocês. Agradeço também pelo incentivo dos meus amigos Ariane, Isabelle, Lucas e Thaís, que conheci na faculdade e me acompanharam nessa trajetória na microbiologia. Muito obrigada à Anna Luiza, amiga que conheci no jardim de infância, estudamos juntas na escola e agora cursamos juntas a graduação em microbiologia. Obrigada especialmente por ouvir as minhas reclamações, por todas as parcerias em trabalhos e por todo apoio.

Por fim, sou grata também a Universidade Federal do Rio de Janeiro, ao Instituto de Microbiologia Paulo de Goés e a todos os professores que fizeram parte da minha formação, por se empenharem e oferecerem um ensino de qualidade. Agradeço também aos órgãos de fomento, PIBIC, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

MARIANA ANJO BARBOSA

CLONE ST95 COMO CAUSA DE INFECÇÕES POR *ESCHERICHIA COLI* NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Orientadora: Beatriz Meurer Moreira

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Escherichia coli patogênica extraintestinal (ExPEC), mais especificamente o patotipo *E. coli* uropatogênica (UPEC), é a principal causa de infecção de trato urinário (ITU) e são frequentemente identificados em infecção de corrente sanguínea (ICS). Dentre as principais linhagens pandêmicas de ExPEC, definidas por MLST, estão ST131 e ST95. Amostras do ST95 são identificadas com alta prevalência em ITU e ICS em vários países. Contudo, no Brasil, entre os poucos estudos realizados, foi descrita frequência alta de clones da linhagem ST131 e baixa de ST95. Os motivos dessa diferença não são claros, mas o predomínio do ST131 no Brasil pode ser associado à alta proporção de resistência a antimicrobianos entre as amostras desse ST. Já as cepas do ST95 apresentam maior susceptibilidade a antimicrobianos e sua baixa prevalência no Brasil permanece pouco explorada. Neste estudo propomos a análise de uma coleção de amostras de *E. coli* oriundas de indivíduos com ITU diagnosticada na comunidade, obtidas nos anos de 2005 (n = 139), 2015 (n = 499) e 2019 (n = 937) no Rio de Janeiro e de uma coleção de amostras isoladas de ICS obtidas em 2013 a 2015 (n = 166). Foi investigada a frequência das amostras e o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *E. coli* do ST95 no Rio de Janeiro, características que posteriormente associadas com outras análises permitirão compreender melhor a tendência da baixa frequência e maior susceptibilidade aos antimicrobianos dessa linhagem. As amostras de 2019 foram previamente identificadas e o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos determinado pelo VITEK. A tipificação da linhagem foi realizada por meio de PCR específico para identificação do ST95. As outras coleções haviam sido previamente tipificadas. No presente estudo, as amostras do ST95 foram identificadas por MALDI-TOF MS, e susceptibilidade a antimicrobianos e de produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) foram determinadas por disco-difusão. Nas coleções de ITU, amostras ST95 representam 1,4% (n = 2) e 0,8% (n = 4) das coleções de 2005 e 2015, respectivamente, e 2,5% (n = 24) na coleção de 2019, que constituiu em aumento significativo (p < 0,05). Foi detectada resistência a 12 dos 16 antimicrobianos testados, contudo, maioria das amostras apresentaram altas taxas de susceptibilidade aos antimicrobianos testados, sendo 66,6% (n = 20/30) nas coleções de ITU e 50% (n = 4/8) na de ICS. Ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprim foram os antimicrobianos em que se observou maior número de amostras não-susceptíveis. Entre todas as amostras utilizadas no estudo uma, pertencente à coleção oriunda de ITU de 2019, foi identificada como multirresistente e produtora de ESBL. Em suma, amostras ST95 coletadas no Rio de Janeiro apresentam manutenção de baixa prevalência e altas taxas de susceptibilidade. Análises de outros fatores associados a esses resultados ainda precisam ser realizadas.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, ST95, susceptibilidade a antimicrobianos.

ABSTRACT

MARIANA ANJO BARBOSA

ST95 CLONE AS A CAUSE OF *ESCHERICHIA COLI* INFECTIONS IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO

Orientador: Beatriz Meurer Moreira

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC), more specifically uropathogenic *E. coli* (UPEC), is the leading cause of urinary tract infection (UTI) and is commonly identified in bloodstream infections (BSI). ST131 and ST95 are among the main pandemic lineages of ExPEC defined by MLST. ST95 strains are detected with high prevalence in UTI and BSI in several countries. On the other hand, among the few studies conducted in Brazil, a high frequency of ST131 clones and low prevalence of ST95 strains was described. The reasons for this difference are not clear, but the high prevalence of ST131 in Brazil might be associated with a high proportion of antimicrobial resistance among isolates of this ST. ST95 strains have higher antimicrobial susceptibility and its low prevalence in Brazil remains poorly explored. In this study we propose the analysis of a collection of *E. coli* isolates from individuals with UTI diagnosed in the community, obtained in the years 2005 (n=139), 2015 (n=499), and 2019 (n=937) in Rio de Janeiro and from a collection of isolates from BSI obtained from 2013 to 2015 (n=166). The frequency among isolates and the antimicrobial susceptibility profile of *E. coli* ST95 in Rio de Janeiro were investigated. Those characteristics, later associated with other analyses, could allow a better understanding of the trend of low frequency and greater susceptibility to antimicrobials of this lineage. The 2019 isolates were previously identified and the antimicrobial susceptibility profile determined by VITEK. Typing of the lineage was performed by means of ST95-specific PCR. The other collections had been previously typified. In the present study, ST95 samples were identified by MALDI-TOF MS, and antimicrobial susceptibility and extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production were determined by disc-diffusion. In the UTI collections, ST95 samples represent 1,4% (n=2) and 0,8% (n=4) of the 2005 and 2015 collections, respectively, and 2,5% (n=24) in the 2019 collection, which constituted a significant increase (p<0.05). Resistance to 12 of the 16 antimicrobials tested was detected. However, most of the samples showed high rates of susceptibility to the antimicrobials tested, accounting for 66.6% (n=20/30) in the UTI collections and 50% (n=4/8) in the BSI collections. Ampicillin and sulfamethoxazole-trimethoprim were the antimicrobials with the highest non-susceptibility rates. Among all the samples investigated in the study, one belonging to the collection from UTI of 2019, was identified as multidrug-resistant and was also positive for the phenotypical producing ESBL. Briefly, ST95 samples collected in Rio de Janeiro have low prevalence maintenance and high susceptibility rates. Analyses of other factors associated with these results still need to be performed.

Key-words: Antimicrobial susceptibility, *Escherichia coli*, ST95.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fatores possivelmente associados a disseminação e frequência de cepas de <i>E. coli</i> da linhagem ST95.....	31
Figura 2- Fluxograma das principais etapas do presente estudo.....	34
Figura 3- Prevalência (%) de amostras de <i>E. coli</i> ST95 em cada uma das três coleções de UPEC provenientes de ITU.....	40
Figura 4- Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de cada coleção proveniente de ITU....	42
Figura 5- Resultado do teste susceptibilidade a 12 antimicrobianos da amostra multirresistente da coleção de ITU de 2019 que apresentou perfil de não susceptível a 11 dos 16 antimicrobianos testados neste estudo.....	42
Figura 6- Resultado positivo do teste fenotípico de produção de ESBL de amostra da coleção de amostras isoladas de ITU de 2019.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estudos que descrevem a prevalência de amostras ST95 isoladas de ITU e ICS.....	26
Tabela 2- Amostras de <i>Escherichia coli</i> do ST95 utilizadas no estudo.....	34
Tabela 3- Iniciadores utilizados na amplificação de amostras do ST95.....	36
Tabela 4- Antimicrobianos utilizados no teste de susceptibilidade por disco difusão.....	37
Tabela 5- Iniciadores utilizados para detecção de genes codificadores de betalactamases.....	38
Tabela 6- Prevalência de amostras de <i>E. coli</i> ST95 relativa ao total de amostras de cada coleção original.....	41
Tabela 7- Prevalência (%) de amostras não-susceptíveis a cada antimicrobiano nas coleções analisadas.....	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APEC	<i>E. coli</i> patogênica aviária (do inglês, <i>avian pathogenic E coli associated E. coli</i>)
ATCC	do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
CC	Complexos clonais
CLSI	do inglês, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DAEC	<i>E. coli</i> de aderência difusa (do inglês <i>diffuse adhering E. coli</i>)
DASA	Laboratório Diagnósticos da América S. A.
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa (do inglês, <i>enteroaggregative E. coli</i>)
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica (do inglês, <i>enterohemorrhagic E. coli</i>)
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva (do inglês, <i>enteroinvasive E. coli</i>) <i>enzyme electrophoresis</i>)
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica (do inglês, <i>enteropathogenic E. coli</i>)
ESBL	Betalactamases de espectro estendido (do inglês, <i>extended spectrum beta-lactamase</i>)
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica (do inglês, <i>enterotoxigenic E. coli</i>)
ExPEC	<i>E. coli</i> patogênica extraintestinal (do inglês, <i>extraintestinal E. coli</i>)
ICS	Infecção de corrente sanguínea
ITU	Infecção de trato urinário
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI-TOF MS	do inglês, <i>matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry</i>
MDR	Resistente a múltiplas drogas (do inglês, <i>multidrug-resistant</i>)
MHI	meio ágar Mueller-Hinton
MLEE	Eletroforese de enzimas codificadas por multilocus (do inglês, <i>multilocus enzyme electrophoresis</i>)
MLST	Tipificação por sequenciamento de múltiplos loci (do inglês, <i>multilocus sequence typing</i>)
NMEC	<i>E. coli</i> de meningite neonatal (do inglês, <i>neonatal meningitis pathogenic E. coli</i>)
PCR	do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
SEPEC	<i>E. coli</i> de seps (do inglês, <i>sepsis pathogenic E. coli</i>)
ST	do inglês, <i>sequence type</i>
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina shiga (do inglês, <i>shiga toxin producing E. coli</i>)
TBE	Solução de tris, ácido bórico e EDTA
TSA	Meio ágar tripton de soja (do inglês, <i>tryptic soy agar</i>)
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênica (do inglês, <i>uropathogenic E. coli</i>)

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Características do microrganismo	13
1.2. Fatores de virulência de <i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal	14
1.2.1. Fímbria do tipo 1	16
1.3. Infecções por <i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal	17
1.4. Caracterização genotípica de <i>Escherichia coli</i>	19
1.4.1. Grupos filogenéticos	19
1.4.2. Tipificação de linhagens	20
1.5. Linhagens pandêmicas de <i>Escherichia coli</i> patogênica extra intestinal	21
1.5.1 Linhagem ST131	21
1.5.2 Linhagem ST95	23
1.6. Resistência a antimicrobianos	28
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVO	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Desenho do estudo	34
4.2 Coleção de amostras	34
4.3 Tipificação da linhagem	35
4.4 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos	36
4.5 Caracterização fenotípica da produção de betalactamases de espectro estendido	37
4.6 Caracterização genotípica da produção de betalactamases de espectro estendido	38
4.7 Análises estatísticas	39
4.8 Observação dos produtos de PCR	39
5. RESULTADOS	40
5.1. Prevalência de amostras de <i>E. coli</i> ST95	40
5.2. Susceptibilidade a antimicrobianos	41
5.3. Produção de betalactamases de espectro estendido	44
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÕES	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características do microrganismo

O microrganismo *Escherichia coli* foi descrito pela primeira vez em 1884 por Theodor Escherich. Este foi um microbiologista alemão, o qual teria sido o primeiro pediatra infectologista, que, ao estudar a microbiota intestinal de crianças, identificou uma bactéria de crescimento rápido, que chamou de *Bacterium coli Commune*. Desde então, devido à facilidade de ser encontrada e de se trabalhar com ela, tornou-se um microrganismo modelo para diversos estudos que, posteriormente, a partir de 1950, incluem os estudos de biologia molecular (Crick *et al.*, 1961; Escherich, 1988; Shulman, Friedmann e Sims, 2007; Blount, 2015). *E. coli* era uma bactéria considerada comensal não patogênica até o ano de 1945, quando foi associada a casos de diarreia infantil (Bray, 1945).

A espécie *E. coli*, pertence ao filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Enterobacterales* e família *Enterobacteriaceae* (taxonomia GTDB, do inglês, “Genome Taxonomy Database”). Assim como outros membros da família *Enterobacteriaceae*, são uma das espécies pioneiras na colonização do trato gastrointestinal humano pouco tempo após o nascimento e ao consumirem o oxigênio inicialmente disponível possibilitam a colonização posterior por microrganismos anaeróbios restritos que também colonizam o trato gastrointestinal humano (Secher, Brehin e Oswald, 2016). Cepas de *E. coli* são caracterizadas como Gram negativas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos. Alguns aspectos metabólicos dessa bactéria incluem necessidades nutricionais simples, capacidade de reduzir nitrato a nitrito, fermentar glicose, reação negativa para a enzima citocromo-oxidase e produção de catalase. Essas bactérias comensais geralmente causam infecções apenas em indivíduos imunossuprimidos ou que tenham algum comprometimento na barreira epitelial do trato gastrointestinal (Kaper, Nataro e Mobley., 2004). Apesar de serem principalmente descritas como comensais ou patogênicas em humanos, cepas de *E. coli* também podem ser encontradas no ambiente, em alimentos e no trato intestinal de animais (Müller, Stephan e Nüesch-Inderbinnen, 2016; Yamaji *et al.*, 2018).

Cepas de *E. coli* são microrganismos compostos por cromossomo único, circular, capazes de carrear plasmídeos, com estrutura composta por membrana citoplasmática, espaço periplasmático, peptidoglicano, membrana externa com lipopolissacarídeo (LPS), porinas e fímbrias. Os antígenos H, K e O em sua estrutura são utilizados para classificação sorológica das enterobactérias. O antígeno H corresponde ao flagelo, K à capsula e O a um polissacarídeo que compõe o LPS (Kaper, Nataro e Mobley, 2004; Tenailon *et al.*, 2010; Strockbine *et al.*, 2015).

As cepas comensais habitam o intestino, podendo ser encontradas nas camadas de muco que cobrem as células epiteliais, chegando ao lúmen intestinal, e conseqüentemente, nas fezes (Poulsen *et al.*, 1994). As cepas patogênicas são geneticamente diversas entre si e diferem das comensais por conta de pressões seletivas que proporcionam o acúmulo de fatores de virulência e de genes de resistência a antimicrobianos. Essa combinação de características permitiu o estabelecimento de cepas bem-sucedidas responsáveis por causar uma variedade de infecções, que podem ser letais (Kaper, Nataro e Mobley, 2004; Foxman, 2010; Tenaillon *et al.*, 2010).

Os patotipos intestinais mais bem estudados são os seguintes: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC). As variantes capazes de causar infecções extraintestinais (ExPEC) incluem *E. coli* uropatogênica (UPEC), que causa infecção do trato urinário; *E. coli* causadora de sepse (SEPEC) e *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC). Já *E. coli* patogênica aviária (APEC), outro tipo de ExPEC, causa infecção em animais (Kaper, Nataro e Mobley, 2004; Jang *et al.*, 2017).

Assim, *E. coli* é uma bactéria que se destaca por sua capacidade de causar diversas infecções em humanos e em animais. Nestes últimos, cepas de *E. coli* são uma das principais causas de diarreia, infecções no trato urinário, colibacilose e mastite. Essas doenças causam significantes perdas econômicas e redução da produtividade (Poirel *et al.*, 2018).

1.2. Fatores de virulência de *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

As cepas ExPEC, além de possuírem uma estrutura filogenética complexa e grande plasticidade no genoma, também possuem variados fatores de virulência que permitem que o microrganismo supere as defesas do hospedeiro e seja capaz de invadir tecidos promovendo uma resposta inflamatória (Johnson e Russo, 2002). Esses fatores de virulência incluem adesinas, toxinas, fatores de aquisição de ferro, LPS, cápsula polisacarídica e invasinas, são codificadas em ilhas de patogenicidade, plasmídeos e outros elementos genéticos móveis. (Sarowska *et al.*, 2019).

As ilhas de patogenicidade são regiões específicas do cromossomo bacteriano, onde estão concentrados genes de virulência. Essas ilhas e os genes associados se disseminam entre populações bacterianas por meio de transferência horizontal e já foram identificados em cepas de ExPEC (Croxen e Finlay, 2010; Cyويا *et al.*, 2015; Sarowska *et al.*, 2019). Além das ilhas de patogenicidade, essas bactérias possuem uma variedade de plasmídeos capazes de promover

a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos e genes de virulência (Calhau *et al.*, 2015; Sarowska *et al.*, 2019).

As toxinas produzidas por ExPEC podem comprometer a integridade celular do hospedeiro e possibilitar a entrada do microrganismo em camadas profundas do tecido. Dessa forma, o microrganismo tem acesso a nutrientes, escapando do sistema imune do hospedeiro e levando a uma possível resposta inflamatória intensa (Lüthje e Brauner, 2014). Diversos genes que codificam toxinas em amostras de ExPEC, como *tsh* (transportador de hemaglutinina), *pic* (protease envolvida na colonização), entre outros, são frequentemente detectados (Sarowska *et al.*, 2019). Contudo, os mais observados em UPEC são: *hlyA*, que codificam α -hemolisina, *cnfI*, que codifica um fator necrotizante citotóxico e *sat*, que corresponde a uma toxina de secreção autotransportadora (Dhakal, Kulesus e Mulvey, 2008). A α -hemolisina é uma toxina secretada que recebe esse nome por ser capaz de lisar eritrócitos, além de outros tipos celulares como células imunes, endoteliais e epiteliais do trato urinário. O fator necrotizante citotóxico ativa Rho GTPases, conseqüentemente, induzindo mudanças celulares baseadas na reorganização dos microfilamentos de actina do citoesqueleto, o que facilita a endocitose da bactéria por células uroteliais, por exemplo. Além de atuar como adesina, a toxina autotransportadora secretada, tem também atividade citotóxica (Lüthje e Brauner 2014; Subashchandrabose e Mobley, 2017).

Fatores de virulência de bactérias considerados invasinas, importantes para a invasão na célula hospedeira, são as proteínas Ibe. A cápsula e resistência ao soro (TraT) também favorecem a invasão. Ibe é uma proteína de membrana externa que atua na invasão das células endoteliais cerebrais (Logue *et al.*, 2012). Já a cápsula, que recobre a célula bacteriana, interfere na detecção dos antígenos de superfície da bactéria, protegendo-a dos mecanismos do sistema imune do hospedeiro. TraT é uma lipoproteína de membrana externa relacionada à resistência ao soro, que associada a outros componentes bacterianos inativa os mecanismos de ataque à membrana promovidos pelo sistema de defesa do hospedeiro (Johnson, 1991).

A deficiência de ferro prejudica o metabolismo e a capacidade adaptativa das bactérias. Portanto, sistemas para aquisição de ferro a partir do hospedeiro são muito importantes. Já foram observadas em cepas de ExPEC bombas na membrana para transferência de ferro para o interior da bactéria, como a bomba FeoAB. Sideróforos, complexos de pequenas moléculas quelantes de ferro, também são importantes para a captação de ferro nessas cepas. Ao serem secretadas para o exterior da célula bacteriana, essas proteínas se ligam a moléculas de Fe^{3+} de ferritinas e transferrinas e são recolhidas pelo próprio microrganismo através de receptores na

membrana externa (Lüthje e Brauner, 2014; Subashchandrabose e Mobley, 2017; Sarowska *et al.*, 2019).

Os sideróforos podem ser divididos em 5 classes e as cepas de ExPEC possuem os seguintes tipos: aerobactina, enterobactina, salmoquelina e yersiniabactina. O salmoquelina, um derivado glicosilado de enterobactina, é um dos sistemas de captação considerado um fator de virulência característico encontrados em cepas de ExPEC, além da aerobactina que é característica dessas bactérias e apresenta maior eficiência na captação de ferro quando comparado à enterobactina. Esses dois sideróforos são codificados pelos plasmídeos ColV e ColBM. O sideróforo yersiniabactina também se destaca pela sua importância principalmente em UPEC para a colonização do trato urinário (Sarowska *et al.*, 2019). Os sideróforos também são considerados fundamentais para a ocorrência de infecção de corrente sanguínea (ICS) (Dale e Woodford, 2015).

A aderência à superfície da célula hospedeira é uma etapa fundamental para a colonização bacteriana que envolve interações específicas com receptores e a superfície do tecido. As adesinas são estruturas que medeiam esse processo e podem ser classificadas em fimbriais ou não fimbriais. As fimbrias são estruturas complexas codificadas por um conjunto de genes e grande parte dessas adesinas pertence à família das chaperonas. A maioria dos genes responsáveis pela presença de fimbrias na superfície da célula bacteriana estão no cromossomo e, com menos frequência, em plasmídeos. Fímbria do tipo 1 e fímbria P são alguns tipos detectados com frequência em cepas de UPEC (Bower, Eto e Mulvey, 2005; Subashchandrabose e Mobley, 2017). Já em relação às adesinas não fimbriais, a maioria pertence ao grupo de autotransportadoras que são proteínas secretadas muito diversas podendo ter ação de adesinas, proteases, toxinas, e invasinas. São compostas por diversos domínios, permitindo seu próprio transporte através da membrana bacteriana. Essas proteínas estão presentes principalmente em cepas de UPEC e alguns exemplos são as do tipo curli e algumas da família Dr e fímbria S/FC1 (Bower, Eto e Mulvey, 2005; Lüthje e Brauner, 2014; Chahales e Thanassi, 2017; Sarowska *et al.*, 2019).

1.2.1. Fímbria do tipo 1

A fímbria do tipo 1 possui função importante na colonização intestinal e do trato urinário, sendo considerada um fator de virulência essencial em cepas de UPEC e em outros tipos de ExPEC. Contudo, a presença dessa fímbria não é suficiente para estabelecer uma infecção a longo prazo e não está exclusivamente presente em cepas de *E. coli* patogênicas, sendo também encontrada em bactérias comensais (Bower, Eto e Mulvey, 2005; Lüthje e

Brauner, 2014; Spaulding *et al.*, 2017). A fimbria do tipo 1 é codificada pelo operon *fim*, que abriga os genes necessários para sua síntese, montagem e regulação. Um dos genes pertencentes a esse conjunto é o *fimH*, que codifica uma adesina responsável pela ligação a estruturas com resíduos de manose que são expressos também por células do epitélio do trato urinário. Associados à adesina *fimH*, os genes *fimF* e *fimG* codificam uma estrutura fibrilar que ancora a adesina ao eixo do pilus; já *fimB* e *fimE* controlam a expressão da fimbria (Schwan, 2011; Busch e Waksman, 2012; Lüthje e Brauner, 2014; Sarowska *et al.*, 2019). O *fimH* é um dos genes de virulência mais frequentes nas cepas de UPEC (Hojati, Molaie e Gholipour, 2015; Khairy *et al.*, 2019). Diversos trabalhos avaliam a prevalência de cepas que possuem esse gene. Um exemplo é um estudo realizado na Inglaterra com amostras de UPEC isoladas de infecção de trato urinário (ITU) tanto relacionada à assistência à saúde como adquiridas na comunidade que identificou o *fimH* em 97% das amostras (Gibreel *et al.*, 2012).

1.3. Infecções por *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

As cepas de ExPEC são consideradas comensais quando se localizam no intestino. Contudo, estas amostras podem se disseminar para outros sítios e causar infecções (Vila *et al.*, 2016). Sendo assim, cepas de ExPEC são responsáveis por um grande número de infecções em humanos no mundo, tanto infecções relacionadas à assistência em saúde quanto infecções adquiridas na comunidade. Algumas dessas infecções acometem o trato urinário, corrente sanguínea e as meninges, podendo desencadear meningite, sendo a mais comum a meningite neonatal (Manges *et al.*, 2019).

A ITU é considerada a infecção bacteriana mais comum e pode ser causada por diferentes espécies bacterianas. Contudo, as bactérias Gram negativas anaeróbias facultativas, incluindo *E. coli*, são responsáveis pela maior parte dessas infecções (Foxman, 2002; Foxman, 2010; Riley, 2014). *E. coli* é o agente causador mais frequente de infecções bacterianas, sendo ExPEC responsável por 80% das ITU (Kaper, Nataro e Mobley., 2004). Aproximadamente 150 milhões de pessoas sofrem de ITU por ano no mundo, isso resulta em um custo maior que 6 bilhões de dólares gastos direto com saúde anualmente (Harding e Ronald, 1994., Stamm e Norrby 2001; Flores-Mireles *et al.*, 2015).

As ITU podem ser divididas em não-complicadas e complicadas. As não-complicadas atingem indivíduos saudáveis, sem alterações do trato urinário. Elas podem ser subdivididas em aquelas que atingem a porção inferior do trato urinário, que afetam a uretra e a bexiga, cistite, e infecções que atingem a parte superior do trato, os ureteres e rins, pielonefrite (Hannan *et al.*, 2012; Hooton, 2012). Nas ITU não-complicadas, primeiramente, a bactéria

uropatogênica, que pode estar colonizando o trato intestinal, contamina a região periuretral e coloniza a uretra. Após esta colonização, as bactérias migram para a bexiga e utilizando seus fatores de virulência conseguem também colonizar e invadir as células. Em seguida, algumas bactérias conseguem evadir ao sistema imune do hospedeiro, inclusive a infiltração de neutrófilos, e ao se multiplicarem conseguem formar biofilme. Assim, elas produzem compostos, como proteases e toxinas, que levam ao dano das células do hospedeiro e fornecem nutrientes importantes para sobrevivência bacteriana e invasão dos rins. A ITU em que ocorre colonização dos rins pode progredir para bacteremia caso não seja tratada adequadamente, isso ocorre, pois, o patógeno em alguns casos atravessa a barreira epitelial nos rins chegando à corrente sanguínea (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Já as infecções classificadas como complicadas, são associadas a fatores que comprometem a defesa do hospedeiro e a estrutura do trato urinário. Elas se diferem das não-complicadas pois ocorre o comprometimento da bexiga. Esse comprometimento está muitas vezes associado ao uso de cateter, que induz uma resposta imune do hospedeiro e leva ao acúmulo de fibrinogênio ao redor da estrutura. Logo, as bactérias capazes de se ligar ao fibrinogênio, se multiplicam, formam biofilmes, causam dano epitelial e conseguem ascender para os rins, podendo ser capazes de causar também ICS (Flores-Mireles *et al.*, 2015). ITU associadas a cateter acarretam maior morbidade, mortalidade e ICS (Chenoweth, Gould e Saint, 2014).

A colonização do trato urinário por *E. coli* é mais frequente em mulheres do que em homens: estima-se que aproximadamente metade da população feminina apresenta, ou terá, pelo menos uma ITU durante a vida. Isso ocorre principalmente devido a diferenças anatômicas entre os sexos. Por exemplo, o comprimento da uretra é menor em mulheres, o que aumenta a chance de bactérias ascenderem até a bexiga (Foxman, 2002, 2013). Apesar do tratamento correto com antibióticos, a reincidência de ITU é comum, ocorrendo em aproximadamente 30% a 50% em mulheres e 12% em homens com ITU por ano (Foxman, 2013). Além disso, a idade mais avançada é um fator relacionado à maior ocorrência de ITU. Na população idosa, as ITU são o segundo tipo de infecção mais comum, sendo responsável por aproximadamente 25% de todas as infecções adquiridas na comunidade que acometem idosos (Ruben *et al.*, 1995; Foxman, 2002; Foxman, 2013; Caljouw *et al.*, 2011;).

Cepas de *E. coli* estão entre as principais espécies bacterianas responsáveis por causar ICS, sendo essas principais espécies bacterianas responsáveis por causar mais da metade de todos os casos de ICS (De Kraker *et al.*, 2013; Laupland, 2013; Laupland e Church, 2014; Manges *et al.*, 2019; Fröding *et al.*, 2020). Um trabalho realizado com amostras isoladas de ICS

entre 1997 e 2016 de centros de saúde de 45 países diferentes revelou que, durante o período de 20 anos, *E. coli* foi a segunda espécie mais frequente (20,5%), atrás apenas de *Staphylococcus aureus* (20,7%) (Diekema *et al.*, 2019). A presença dessa bactéria na corrente sanguínea pode resultar em uma intensa resposta inflamatória, levando à sepse que, por sua vez, é associada à alta morbidade e mortalidade (Russo e Johnson, 2003; Miajlovic e Smith, 2014). O trato urinário é uma fonte comum de cepas responsáveis por ICS e foi observado que eventos de ITU e exposição prévia a cefalosporinas são alguns fatores de risco significativos para a ocorrência de ICS causada por cepas de *E. coli* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL: do inglês *extended spectrum beta-lactamase*), que são enzimas que conferem resistência a antimicrobianos betalactâmicos de amplo espectro (Micenková *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2019).

O conjunto de diversos fatores de virulência como adesinas e invasinas, além da resistência a antimicrobianos, propicia cepas de ExPEC a causar ICS. As linhagens mais virulentas são responsáveis por causar surtos e atingir pacientes hospitalizados ou imunossuprimidos, grupos esses mais susceptíveis a ICS (Schlackow *et al.*, 2012; Otto *et al.*, 2016; Daga *et al.*, 2019). A frequência de *E. coli* causadora de ICS tem aumentado desde os anos 2000 e a taxa de cepas produtoras de ESBL varia entre os países. Contudo, nos últimos anos, cepas de ExPEC causadoras de ICS produtoras de ESBL tem aumentado, principalmente do tipo CTX-M, que são capazes de conferir resistência até a cefalosporinas de amplo espectro (Gagliotti *et al.*, 2011; Schlackow *et al.*, 2012; De Kraker *et al.*, 2013; Bonomo, 2017; Daga *et al.*, 2019).

1.4. Caracterização genotípica de *Escherichia coli*

1.4.1. Grupos filogenéticos

As cepas de *E. coli* podem ser divididas em filogrupos. Essa divisão foi identificada inicialmente a partir de uma técnica chamada *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE), na qual analisa-se a mobilidade de aproximadamente 35 enzimas por eletroforese. Assim, é possível supor a presença de diferentes alelos e agrupar as cepas de acordo com seu perfil alélico. Essa prática dividiu essa espécie nos grupos A, B1, B2, C, D e E (Selander *et al.*, 1987; Chaudhuri e Henderson, 2012).

À medida que MLEE foi sendo utilizada, observou-se evidências de que diferentes grupos filogenéticos possuem papéis ecológicos distintos: em humanos, cepas dos grupos A e B2 são mais comuns, já cepas isoladas de animais encontram-se predominantemente no grupo B1 (Tenailon *et al.*, 2010; Chaudhuri e Henderson, 2012). Além disso, constatou-se que as

cepas comensais e diarreio gênicas pertencem aos grupos A e B1, enquanto as cepas de EXPEC pertencem em maioria ao B2 e algumas ao D. Cepas pertencentes ao grupo B2 e D geralmente carregam mais genes codificadores de fatores de virulência do que as cepas dos outros grupos (Picard *et al.*, 1999; Johnson e Stell, 2000; Russo e Johnson., 2000).

Com o avanço das técnicas moleculares e estudos epidemiológicos, foram desenvolvidos métodos mais práticos e econômicos com objetivo de identificar os grupos filogenéticos. Um protocolo eficiente de *polymerase chain reaction* (PCR) *multiplex* foi elaborado por Clermont e colaboradores para detecção dos genes *yjaA*, *chuA* e *tspE4.C2*. A partir da presença ou ausência desses elementos, as cepas são classificadas nos grupos detectados com mais frequência, que são: A, B1, B2, e D. No grupo A estão as cepas negativas para esses elementos e no grupo B1 são as que possuem o gene *TSPE4.C2*. Já no B2 estão as cepas positivas para os genes *yjaA* e *chuA* e no grupamento D estão as cepas que possuem apenas o gene *chuA* (Clermont, Bonacorsi e Bingen, 2000; Gordon *et al.*, 2008). Posteriormente, devido ao um crescimento significativo do banco de dados de *multilocus sequence typing* (MLST) (técnica abordada no tópico abaixo) para cepas de *E. coli* de diferentes hospedeiros e locais, foi possível notar que algumas cepas estavam sendo agrupadas erroneamente através dessa técnica e foram identificados novos grupos. Assim, foi adicionada a detecção do gene *arpA* ao PCR *multiplex* para melhor diferenciação entre oito filogrupos (A, B1, B2, C, D, E, F e clados I a V) que compoem a atual classificação dos grupos filogenéticos. Já o grupo U abriga as amostras que não têm seu grupo identificado pela técnica aplicada (Clermont *et al.*, 2013).

1.4.2. Tipificação de linhagens

Outra metodologia empregada na caracterização genotípica de *E. coli* é MLST, uma técnica que permite determinar os complexos clonais (CC) e determinar os diferentes *sequence type* (ST) das cepas. Esta técnica, proposta no ano de 1998, consiste no sequenciamento de sete genes de manutenção celular conservados no genoma bacteriano. Para *E. coli*, os genes são os seguintes: *adk* (adenilato quinase), *fumC* (fumarato hidratase), *gyrB* (DNA girase), *icd* (isocitrato/isopropilmalato desidrogenase), *mdh* (malato desidrogenase), *purA* (adenilsuccinato desidrogenase) e *recA* (domínio de ligação ATP/GTP). Cada um dos alelos sequenciados recebe uma numeração e a sequência dos números resulta em um perfil alélico chamado de ST. Dessa forma, as cepas que possuem o mesmo perfil pertencem ao mesmo ST, e as que variam em até dois dos genes são agrupadas no mesmo CC. Essa técnica é vantajosa, pois permite a

comparação entre estudos de diferentes laboratórios e a consulta de perfis alélicos já conhecidos em uma base dados (Maiden *et al.*, 1998).

Mais recentemente, outras técnicas foram desenvolvidas e podem ser utilizadas para identificar as principais linhagens pandêmicas de *E. coli*. Doumith e colaboradores elaboraram um PCR *multiplex* que permite identificar exclusivamente as linhagens ST73, ST69, ST131 e ST95, que são as responsáveis por grande parte das ITU e de ICS causadas por essa bactéria (Riley, 2014). Nessa técnica, são amplificados fragmentos genômicos de tamanhos diferentes, únicos e conservados em cada linhagem. Os produtos da amplificação são facilmente observados e diferenciados após a eletroforese no gel de agarose, permitindo a rápida determinação da linhagem a qual as cepas testadas pertencem. A eficácia dessa técnica, que atinge 100% de sensibilidade e 99,5% de especificidade, foi demonstrada a partir da comparação com MLST desenvolvida anteriormente e bem estabelecida (Doumith *et al.*, 2015). A determinação do ST é importante para observação da estrutura de uma coleção bacteriana, sendo fundamental em estudos evolutivos e epidemiológicos.

1.5. Linhagens pandêmicas de *Escherichia coli* patogênica extra intestinal

Estudos que realizam análises globais para acompanhar a distribuição temporal e geográfica dos clones de *E. coli* são importantes para observar a estrutura populacional e as características epidemiológicas. As linhagens clonais de ExPEC mais destacadas são: ST131, ST393, ST69, ST95 e ST73 (Riley, 2014; Manges *et al.*, 2019). Duas dessas principais linhagens clonais de ExPEC distribuídas globalmente responsáveis por um grande número de ITU e ICS são ST131 e ST95. Essas linhagens são associadas tanto a infecções relacionadas à assistência à saúde como infecções adquiridas na comunidade (Johnson e Russo, 2002; Riley, 2014).

1.5.1 Linhagem ST131

As cepas de *E. coli* ST131 são mais prováveis de causar especialmente pielonefrite e urosepse do que as outras linhagens de ExPEC (Qureshi e Doi, 2014). Essas cepas pertencem ao grupo filogenético B2. Antes dos anos 2000, a maioria das cepas de ExPEC eram susceptíveis a antimicrobianos de primeiro uso como cefalosporinas e fluoroquinolonas. Contudo, cepas resistentes a esses dois antimicrobianos passaram a ser observadas com muita frequência em diversas partes do mundo. A linhagem ST131 é a responsável por grande parte do aumento das infecções causadas por cepas de ExPEC resistentes a antimicrobianos,

incluindo as resistentes a betalactâmicos de amplo espectro. Isso ocorre pois é uma linhagem conhecida por ser resistente a fluoroquinolonas, devido a mutações em genes cromossômicos (*gyrA* e *parC*), e às cefalosporinas, através da produção de betalactamases. Além disso, essa linhagem é conhecida por produzir principalmente CTX-M-15, contribuindo com o aumento global de bactérias produtoras desse tipo de ESBL (Riley, 2014; Banerjee e Johnson, 2014; Pitout e DeVinney, 2017; Shaik *et al.*, 2017). Cepas de *E. coli* ST131 produtoras de ESBL são comumente mais resistentes à amicacina, amoxicilina-ácido clavulânico, piperacilina-tazobactam ou ciprofloxacina, do que as cepas produtoras de ESBL de outras linhagens. As cepas não produtoras de ESBL dessa linhagem apresentam maior resistência a fluoroquinolonas e amoxicilina que outras linhagens (Nicolas-Chanoine, Bertrand e Madec, 2014).

Além disso, cepas do ST131 possuem com frequência genes que codificam fatores de virulência, sendo alguns desses: *sat*, *fimH*, *iucD* e *traiT*. (Nicolas-Chanoine, Bertrand e Madec, 2014). Análises genéticas, como o sequenciamento do genoma completo, permitiram observar que essa linhagem é composta por diferentes clados, que podem ser associados ao gene *fimH*. O clado A é associado ao *fimH41*, B ao *fimH22*, e clado C, que teria origem do clado B e possui subclasses, é associado ao *fimH30*, esse último identificado com mais frequência nessa linhagem. Essa diversidade de alelos pode representar diferentes habilidades de colonização (Johnson *et al.*, 2013; Pitout e DeVinney, 2017; Paitan, 2018).

Segundo a revisão da Manges e colaboradores (2019), a linhagem ST131 é a mais frequentemente identificada em infecções causadas por ExPEC na Ásia e na Europa. Inúmeros trabalhos apontam a prevalência dessa linhagem em diversos países. Um exemplo desses estudos foi realizado na Suíça, revelando uma prevalência de 14% dessa linhagem entre amostras de UPEC causadoras de ITU adquiridas na comunidade (Nüesch-Inderbinnen *et al.*, 2017). Esse estudo indicou também que essas amostras eram resistentes a diversos antimicrobianos, com alta frequência de amostras resistentes a múltiplas drogas (MDR - do inglês *multidrug-resistant*) (83%) e 50% das amostras dessa linhagem eram produtoras de ESBL, mais frequentemente CTX-M-14 e CTX-M-15 (Nüesch-Inderbinnen *et al.*, 2017). Em um outro trabalho realizado na China com amostras isoladas de pacientes com ICS tanto relacionada a assistência à saúde como adquirida na comunidade identificaram *E. coli* ST131 como a linhagem mais frequente (15%) entre as amostras (Chen *et al.*, 2019).

1.5.2 Linhagem ST95

As cepas de *E. coli* ST95, do grupo filogenético B2, além de serem frequentemente isoladas de ICS e ITU, também são associadas à meningite neonatal. O primeiro registro de isolamento de cepas dessa linhagem presente no banco de dados MLST é de cepas provenientes de ITU em humanos de 1941. Essas cepas abrigam um grande conjunto de fatores de virulência (**Figura 1**), entre eles: *fimH*, *fimAvMT78*, *papG II*, *iucD*, *iroN*, *kpsM II-K1*, *cvaC*, *iss*, *traT*, *malX*, *usp* e *tsh* (Riley 2014).

A maioria das cepas desse ST são caracterizadas pela baixa frequência de resistência a múltiplas drogas, diferentemente da linhagem de ST131. Entretanto, em 2010 foi detectada uma cepa de ICS portadora de genes que codificam betalactamases, como *bla_{CTX-M}* e *bla_{KPC}*, diferente da maioria das cepas dessa linhagem (Adams-Sapper *et al.*, 2013; Riley 2014). Posteriormente, outros trabalhos encontraram cepas de ST95 resistentes a antimicrobianos e produtoras de betalactamases como CTX-M, TEM, OXA-48 e SHV; porém, esta continua sendo uma linhagem caracterizada majoritariamente como mais susceptível a antimicrobianos do que outras (Hojabri *et al.*, 2019; Birgy *et al.*, 2020). O trabalho de Forde e colaboradores (2018) se destaca, pois identificou uma cepa de *E. coli* ST95 resistente a diversos antimicrobianos e potencialmente muito virulenta. A cepa chamada de MS8345, isolada de secreção respiratória de um paciente no Catar com hemorragia subaracnóidea, foi analisada por meio do sequenciamento do genoma completo e teste fenotípico de susceptibilidade a antimicrobianos. Os autores detectaram a presença de um grande plasmídeo (241,164 pares de base) carreador de 15 genes de resistência a antimicrobianos, incluindo a ESBL, *bla_{CTX-M-1}*. Os autores identificaram também 3 prováveis sistemas de efluxo para múltiplas drogas, 14 genes de resistência a antimicrobianos codificados no cromossomo e um grande plasmídeo de virulência previamente associado à bacteremia. Essa cepa apresentou o gene *mcr-1*, codificado em um plasmídeo, que confere resistência à colistina, um antimicrobiano de última escolha, importante, por exemplo, para tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes a carbapenemas. A aquisição desse plasmídeo por outras cepas é um risco relevante à saúde pública (Forde *et al.*, 2018).

Em relação à fimbria do tipo 1, alguns dos genes que codificam as adesinas já identificados nessa linhagem são *fimH1*, *fimH47*, *fimH9* e *fimH6*, sendo *fimH6* e *fimH1* os mais frequentemente detectados (Adams-Sapper *et al.*, 2013; Stephens *et al.*, 2017). Gordon e colaboradores (2017), ao investigar uma coleção de 200 amostras do CC95, provenientes de pessoas do Canadá, França e Austrália, por meio de PCR e sequenciamento do genoma

completo, identificaram que as amostras poderiam ser divididas em 5 subgrupos. Esses subgrupos variavam em sorotipo, virulência e perfil gênico de resistência a antimicrobianos. Apenas 9 das amostras não puderam ser agrupadas em um desses subgrupos e em 4 dos 5 subgrupos as amostras que apresentavam mesmo sorotipo e possuíam a mesmo alelo do gene *fimH*. O subgrupo A abrigou amostras com sorogrupo O1:H7 ou O2a:H7 e *fimH*41. O B, apesar de ter sido composto pelo sorogrupo O18:H7, foi associado a 4 alelos de *fimH* diferentes, sendo o único em que as amostras de mesmo sorogrupo não carregavam o mesmo alelo de *fimH*. No C encontraram os sorogrupos O1:H7, O25b:H4 e O2a:H7 e o alelo *fimH*27. No subgrupo D estavam as amostras com os sorogrupos O45a:H7, O1:H7 e O2a:H4 e os alelos *fimH*30, 54 e 92. Já o E, corresponde as amostras com sorogrupo O2a:H4 e alelo *fimH*27 (Gordon *et al.*, 2017). Os autores também analisaram a frequência desses subgrupos em coleções de cepas do CC95 da Austrália, de 2002 e 2015, e de outros trabalhos da França, 2005 a 2007 e 2000 e 2010, e Estados Unidos (EUA), cepas de 1981 a 2015. Foi observado que entre as cepas isoladas de espécimes de urina dos EUA, a maioria pertenceu ao A e B, já da Austrália A e C foram predominantes. Nas cepas provenientes de espécimes de sangue da França, o subgrupo D foi predominante, porém na Austrália nenhuma pertenceu a esse subgrupo. Entre as amostras isoladas de espécimes de fezes na França, a maioria foi classificada como subgrupo D. Já na Austrália, o mais comum foi o subgrupo A. Esse é um importante trabalho que foi capaz de realizar a divisão dessa linhagem em subgrupos e aplicar essa divisão a coleções de outros trabalhos prévios de outras regiões (Gordon *et al.*, 2017). No entanto, a importância relativa, e as características de virulência e de resistência a antimicrobianos em cada um desses subgrupos ainda precisam ser determinadas.

Segundo Manges e colaboradores (2019), ST95 é a linhagem mais frequentemente detectada em ITU na América do Norte, e representa uma grande fração em estudos realizados em outras regiões, o que destaca sua importância clínica. Entretanto, a frequência desse ST é variável de acordo com a região. Um exemplo é um estudo realizado no Japão, entre 2011 e 2012, com o objetivo de analisar a disseminação de UPEC em uma comunidade, que mostrou a alta prevalência de cepas do clone ST95 (n=48; 29%) isoladas de mulheres com ITU (Matsukawa *et al.*, 2019). Esse mesmo trabalho identificou essa linhagem como uma das que apresentou menor taxa de resistência a antimicrobianos (n=4; 9%). Em outro estudo, pesquisadores investigaram em São Francisco, nos EUA, entre 2007 e 2010, a susceptibilidade e os genes relacionados a resistência a antimicrobianos em linhagens de ExPEC mais comuns nessa comunidade. Os autores identificaram ST95 (18%) como a segunda linhagem mais frequente em amostras de pacientes com ICS e como a linhagem mais provável de ser

susceptível a antimicrobianos (Adams-Sapper *et al.*, 2013). Já outros trabalhos identificam esse ST com menor prevalência, como observado por Alghoribi e colaboradores (2015) onde 5% das amostras de ITU pertenceram a essa linhagem, sendo a sétima linhagem com maior prevalência (Alghoribi *et al.*, 2015). Esses e alguns outros estudos com cepas do ST95 isoladas de ITU e ICS que revelam essa diferença de prevalência entre os locais estão citados na **Tabela 1**.

Esses dados de prevalência sugerem que o fenótipo de resistência a antimicrobianos não seja o fator mais determinante para disseminação de cepas de ExPEC (Riley 2014). A disseminação e manutenção de frequência de diferentes linhagens de ExPEC, inclusive linhagens mais susceptíveis como o ST95, podem estar associadas também a diversos determinantes que podem variar entre diferentes locais (**Figura 1**). Um fator importante é a disseminação facilitada pela presença desse ST no ambiente, por exemplo como foi observado por Gomi e colaboradores (2017) no Rio Yamato no Japão. A linhagem ST95 foi identificada como a mais frequente (31%) entre as amostras, sendo 78% (n=14\18) das amostras ST95 classificadas como susceptíveis aos antimicrobianos testados. Esses dados são importantes pois as amostras foram isoladas de águas de superfície frequentemente usadas para consumo, irrigação e lazer, possivelmente contribuindo assim para a disseminação dessas cepas e para a ocorrência de possíveis infecções. Ao comparar amostras dessa linhagem de origem ambiental com as de origem clínica foi possível agrupá-las em uma árvore filogenética de acordo com os subtipos do gene *fimH*, sugerindo que essas amostras de diferentes origens estão relacionadas. Os autores destacam também que o rio está em uma área densamente povoada e diversas estações de tratamento de água, locais de criação de animais e hospitais são encontrados ao longo do seu curso. Essas poderiam ser prováveis fontes de contaminação por bactérias como *E. coli* (Gomi *et al.*, 2017).

Tabela 1- Estudos que descrevem a prevalência de amostras ST95 isoladas de ITU e ICS

Local	Ano de isolamento	(Pred¹.) Frequência %	Fonte	Referência
Inglaterra	2007 a 2009	(4°) 6	ITU ³	Gibreel <i>et al.</i> , 2012
EUA, San Francisco	2007 a 2010	(2°) 18	ICS ⁴	Adams-Sapper <i>et al.</i> , 2013
EUA, Minnesota	2011	(2°) 11	Esp. clínicos ²	Banerjee <i>et al.</i> , 2013
Inglaterra	2010 a 2012	(4°) 10	ICS	Horner <i>et al.</i> , 2014
Arabia Saudita	2012 e 2013	(7°) 5	ITU	Alghoribi <i>et al.</i> , 2015
Coreia do sul	2011 a 2013	(1°) 36	ITU crianças	Yun <i>et al.</i> , 2015
EUA, California	1999-2000 e 2016-2017	(1°) 15 e 17	ITU	Yamaji <i>et al.</i> , 2018
China, Zhejiang	2015	(3°) 6	ICS	Chen <i>et al.</i> , 2019
EUA, Oklahoma	2006 a 2016	(1°) 11	ICS neonatos	Cole <i>et al.</i> , 2019
Canadá	2012 a 2015	(1°) 18	ITU mulheres	Fibke <i>et al.</i> , 2019
Iran, Semnan	2015 e 2016	(5°) 5	Esp. clínicos	Hojabri <i>et al.</i> , 2019
Japão	2011 e 2012	(1°) 29	ITU mulheres	Matsukawa <i>et al.</i> , 2019
EUA, California	2003 a 2005	(1°) 21	ITU	Tarlton <i>et al.</i> , 2019
França	2014 a 2017	(5°) 4	ITU crianças	Birgy <i>et al.</i> , 2020
Espanha e França	2016	6 e 4	Esp. clínicos	Flament-Simon <i>et al.</i> , 2020
Canadá, Calgary	2016	(4°) 7	ICS	Holland <i>et al.</i> , 2020
EUA, California	2018	(3°) 11	ITU	Matsui <i>et al.</i> , 2020
Bangladesh	2018 e 2019	(2°) 9	ITU	Mazumder <i>et al.</i> , 2020

¹Pred: predominância em relação as outras linhagens; ²Esp. Clínico: espécimes clínicos variados, como sangue e urina; ³ITU: infecção de trato urinário; ⁴infecção de corrente sanguínea.

O esgoto e o seu tratamento adequado também é um fator importante relacionado a esse espalhamento de patótipos como ExPEC (**Figura 1**). Já foram detectadas diferentes linhagens de ExPEC tanto no esgoto antes de ser tratado como após o tratamento. Um exemplo é uma análise utilizando amostras isoladas de diferentes estações de tratamento de esgoto do Canadá. Entre as amostras identificadas após o tratamento com cloro foram identificadas diferentes linhagens de ExPEC entre elas ST95, sendo a segunda mais comum correspondendo a 17% (n=4/24). Os autores realizaram também uma comparação genômica entre essas amostras isoladas da água residual com sequências de bancos de dados de amostras clínicas de UPEC e observaram alta similaridade. Esses resultados indicaram que diversas amostras de UPEC, incluindo ST95, isoladas de efluentes de tratamento de esgoto são tolerantes a esse tipo de tratamento e provavelmente capazes de causar infecções em humanos. Esses dados indicam a existência de um potencial risco de saúde pública devido as diversas formas de uso e locais de destino desses efluentes (Zhi *et al.*, 2020).

Diversos estudos indicam que alimentos e animais, principalmente animais de criadouro para consumo, como aves e suínos, também possuem um papel importante na disseminação de cepas de ExPEC, inclusive da linhagem ST95, atuando como reservatórios (Manges, 2016) (**Figura 1**). Faccone e colaboradores (2019) detectaram amostras de *E. coli* isoladas de suínos em fazendas na Argentina. Entre essas amostras, os autores identificaram duas como ST95 (Faccone *et al.*, 2019). Essa linhagem ST95 além de causar infecções em humanos, também inclui cepas associadas a infecções animais (APEC), como por exemplo colibacilose em aves (Riley, 2014). Em relação às aves, em um trabalho realizado na Turquia foi detectada uma cepa ST95 entre amostras isoladas de espécimes de *swab* cloacal de aves de aviário (Aslantaş, 2019). Outro estudo promoveu uma análise comparativa de genomas de cepas de APEC, subgrupo de ExPEC consideradas zoonóticas, causadoras de infecções em aves, com cepas de ExPEC da linhagem ST95 causadoras de infecções em humanos. Observou-se grande similaridade entre algumas cepas desses dois grupos (Jørgensen *et al.*, 2019). Comparações entre essas cepas de duas diferentes origens também foi feita por Mora e colaboradores (2013) que observaram dados semelhantes. Ge e colaboradores (2014), através de análises genômicas de cepas do CC95 de APEC e de outras ExPEC causadoras de infecções em humanos, também identificaram similaridades significativas e uma relação evolutiva próxima. Ademais, os autores observaram que as cepas de APEC foram capazes de causar meningite e sepse em modelo animal de roedores neonatos (Ge *et al.*, 2014). Já em relação a cepas capazes de causar meningite em humanos, ao serem submetidas a classificação por grupo filogenético, MLST e análise de fatores de virulência foi observada similaridade com cepas de APEC. A maioria das cepas

utilizadas neste trabalho, tanto isoladas de meningite como cepas de APEC, foram classificadas como ST95. Ao testar as cepas de APEC em modelos animais de meningite, os autores identificaram algumas capazes de causar meningite em ratos. O mesmo foi observado nas cepas de NMEC: algumas foram capazes de causar colisepticemia em aves (Tivendale *et al.*, 2010). Forber e colaboradores (2018) ao analisarem uma amostra isolada de secreção respiratória de um paciente com hemorragia subaracnoide, nomeada MS8345 e classificada como ST95 por MLST, também identificou uma relação filogenética com amostras dessa linhagem causadoras de meningite e de infecções em aves. As três cepas apresentaram similaridade genômica e foram agrupadas em um mesmo clado na linhagem ST95 na árvore filogenética (Forbes *et al.*, 2018). Esses dados, indicam que algumas cepas do ST95 são geneticamente similares e capazes de causar diversos tipos de infecções em humanos e em animais como aves.

1.6. Resistência a antimicrobianos

A resistência a antimicrobianos evoluiu rapidamente nas últimas décadas e se tornou uma das maiores ameaças à saúde, segurança dos alimentos e desenvolvimento. As infecções que apresentam dificuldade de tratamento por serem causadas por microrganismos resistentes a múltiplas drogas são cada vez mais comuns, principalmente no ambiente hospitalar. Esse tipo de infecção também está associado ao aumento de mortalidade e tem um impacto negativo na economia (Munita e Arias, 2016; OPAS, 2017). Esse aumento de resistência é multifatorial e ainda não completamente compreendido, podendo envolver a frequência de uso dessas drogas e outros fatores socioeconômicos (Hofer, 2019).

Características socioeconômicas e outros fatores variáveis entre diferentes locais podem possivelmente estar relacionadas a diferentes taxas de resistência a antimicrobianos e também à maior frequência de cepas mais susceptíveis ou resistentes em determinadas regiões (**Figura 1**). Alguns trabalhos realizados nos últimos anos buscam observar fatores associados a resistência a antimicrobianos que contribuem para maiores taxas de não-susceptibilidade (Collignon *et al.*, 2018; Nadimpalli *et al.*, 2020; Ramay *et al.*, 2020). Um estudo realizado com dados que incluíram características da espécie *E. coli* de diversos países em relação a resistência a antimicrobianos, uso de antimicrobianos, e características antropológicas e socioeconômicas como educação, corrupção, gastos com saúde entre outros identificou associações relevantes entre as variáveis. Melhores índices de educação, infraestrutura, gastos com saúde pública apresentaram uma correlação inversa com maiores taxas de resistência. Ou seja, melhoras nos sistemas de saneamento, melhor acesso a água limpa, um melhor governo, melhora nos gastos

com saúde, entre outros fatores, são importantes para redução das taxas de resistência a antimicrobianos globalmente (Collignon *et al.*, 2018). Nadimpalli e colaboradores (2020) também destacam esse problema em regiões urbanas consideradas informais, caracterizadas por um alta densidade de pessoas, água e saneamento insuficientes entre outros aspectos. Os autores sugerem que melhoras nas infraestruturas nesses locais poderiam auxiliar na limitação da disseminação de resistência a antimicrobianos, redução da ocorrência de infecções causadas por microrganismos resistentes nessa população e conseqüentemente também prevenção do uso inadequado de antimicrobianos (Nadimpalli *et al.*, 2020). Outro estudo realizado em comunidades na Guatemala buscou analisar os efeitos da higiene e saneamento na prevalência de bactérias resistentes a antimicrobianos. Observando amostras de *E. coli* isoladas de espécimes de fezes, os autores identificaram que a probabilidade de detectar amostras mais resistentes reduzia de acordo com melhoras na higiene. Além disso, a diferença entre os níveis de higiene teve maior impacto nas taxas de resistência detectadas do que o uso de antimicrobianos. Contudo, em indivíduos habitando regiões com melhores níveis de higiene foi possível observar maior probabilidade de detectar bactérias resistentes em participantes que reportaram o uso de antimicrobianos do que aqueles que não reportaram uso. Uma hipótese que justifique esse dado é que as péssimas condições de higiene e saneamento que facilitam a disseminação de bactérias e de resistência estejam se sobrepondo aos efeitos do uso de antimicrobianos (Ramay *et al.*, 2020). Esses dados poderiam ser associados a diferentes frequências de linhagens de ExPEC mais susceptíveis ou mais resistentes a antimicrobianos em diversos locais.

Assim, apesar do uso intenso dos antimicrobianos em diferentes setores, como na medicina humana e no setor veterinário, ser importante causa relacionada ao aumento de resistência (**Figura 1**), apenas a redução do uso destes medicamentos não seria suficiente para controlar a disseminação de bactérias resistentes (OPAS, 2017; McEwen e Collignon, 2018; Hofer, 2019). Os microrganismos resistentes podem ser encontrados em humanos, animais, na água, no solo, ou seja, em diferentes nichos. Logo, a resistência a antimicrobianos é um problema complexo que envolve a interação da população microbiana afetando humanos, animais e o ambiente, sendo necessária a abordagem multisetorial desse problema. Essa proposta é chamada de “*One Health*”, envolvendo uma ação conjunta de profissionais de diversos setores com o objetivo de otimizar a saúde das pessoas, animais, e do ambiente (McEwen e Collignon, 2018).

O aumento de resistência também é observado em cepas de *E. coli* devido à eficiente habilidade de adquirir e transmitir plasmídeos e outros elementos genéticos móveis que

carreiam genes que codificam a resistência a antimicrobianos. Logo, essa espécie é considerada um importante reservatório de genes de resistência, atuando como doadora e receptora desses genes, adquirindo-os e transferindo-os para outras bactérias. Tem se observado um aumento no número de genes de resistência em cepas de *E. coli* nas últimas décadas e muitos desses foram adquiridos por transferência horizontal. Uma preocupação é a transmissão de cepas de *E. coli* entre animais e humanos, tanto por contato direto como com excreções ou pela alimentação. Dessa forma, a resistência a antimicrobianos em *E. coli* é considerada uma preocupação da saúde pública mundial (Vila *et al.*, 2016; Poirel *et al.*, 2018). Uma evidência que exemplifica essa transferência horizontal de genes de resistência é observada na disseminação de genes que codificam ESBL, mediada por plasmídeos em cepas de *E. coli* causadoras de ICS (Wang *et al.*, 2019).

A transferência horizontal de genes que tem relevante impacto na plasticidade do genoma bacteriano, pode ocorrer por diferentes mecanismos, sendo eles: transformação, transdução e conjugação. A transformação consiste na internalização de fragmentos de DNA exógeno encontrado no ambiente. Já a transdução, é caracterizada pela transferência do material genético por bacteriófagos. A conjugação, de forma geral, ocorre através de pilus de conjugação; dessa forma, o material genético é passado diretamente da célula doadora para a célula receptora. Já se observou que devido aos eventos de transferência horizontal o genoma de cepas de *E. coli* patogênica podem ser 1Mb maiores do que de cepas não patogênicas (Juhas, 2015; Abe, Nomura e Suzuki, 2020). Além desses três tipos de transferência horizontal, já foi observada a relevância de vesículas de membrana que são liberadas tanto por bactérias Gram negativas, como Gram positivas, e que se originam da membrana, podendo ter um tamanho variado e composição diversa como: proteínas, DNA, RNA, entre outros (Domingues e Nielsen, 2017; Abe, Nomura e Suzuki, 2020). No interior de vesículas liberadas por cepas de *E. coli* já foram detectados RNA, genes de virulência e de resistência a antimicrobianos, além de toxinas (Kolling e Matthews, 1999; Blenkiron *et al.*, 2016; Domingues e Nielsen, 2017; Bielaszewska *et al.*, 2020). Em um estudo recente, observou-se a importância dessas vesículas liberadas por cepas de *E. coli* resistentes a betalactâmicos para a sobrevivência de cepas susceptíveis na presença dessa classe de droga (Kim *et al.*, 2018).

A resistência a antimicrobianos em *E. coli* e outras bactérias Gram negativas é mediada por diferentes mecanismos. Entre eles podemos destacar as bombas de efluxo, alteração na permeabilidade da membrana e mutações em porinas, inativação do antimicrobiano, produção de enzimas como ESBL e mutações no sítio de ligação ou no alvo. Os estudos de vigilância demonstram que entre as cepas de *E. coli* existem amostras resistentes a todas as principais

classes de antimicrobianos (Paitan, 2018). As infecções causadas por *E. coli* susceptíveis possuem uma grande variedade de possíveis opções de tratamento como penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, betalactâmicos, aminoglicosídeos, sulfametoxazol-trimetropim e outros. Contudo, as infecções causadas por cepas de *E. coli* resistentes apresentam menos opções de tratamento disponíveis. O aumento da resistência a carbapenemas, que são os antimicrobianos de maior espectro conhecidos, e a colistina, que pertence a classe das polimixinas usada como uma alternativa para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes produtoras de ESBL, são exemplos que dificultam significativamente o tratamento dessas infecções (Vila *et al.*, 2016; Paitan, 2018; Poirel *et al.*, 2018).

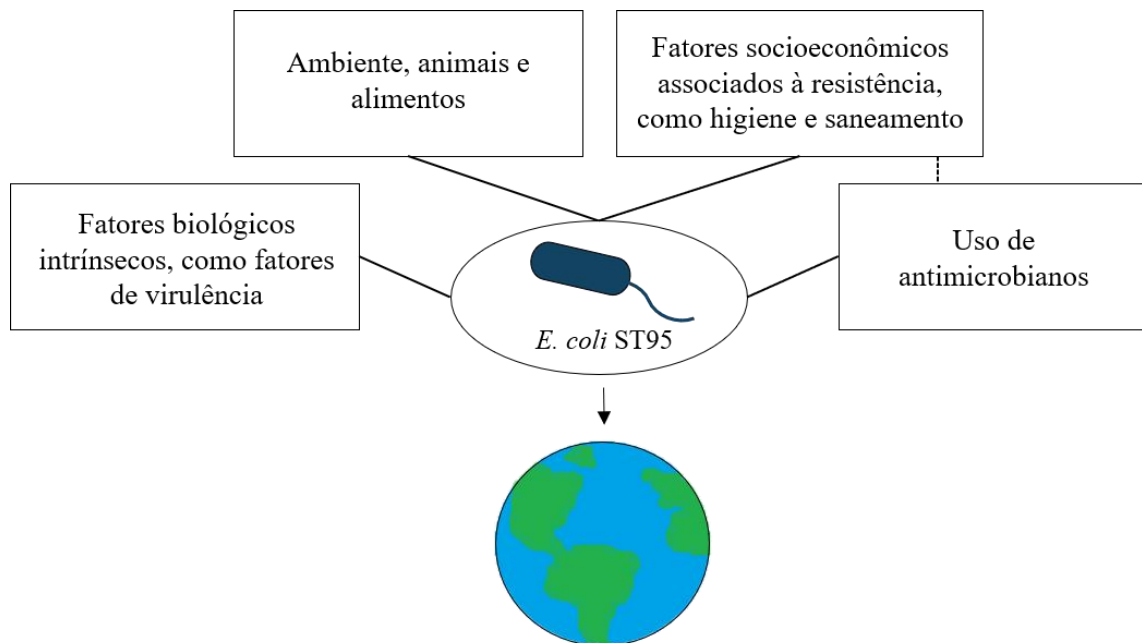


Figura 1- Fatores possivelmente associados a disseminação e frequência de cepas de *E. coli* da linhagem ST95.

2. JUSTIFICATIVA

E. coli é um dos microrganismos mais frequentemente isolados de ICS, sendo a segunda espécie mais comum (21%) isolada de ICS entre 1997 e 2016 de 45 países diferentes durante o período de 20 anos (MoraRillo *et al.*, 2015; Diekema *et al.*, 2019), e entre seus patotipos, UPEC é a principal causa de ITU (Foxman e Brown 2003). Algumas das principais linhagens pandêmicas de ExPEC capazes de causar essas infecções são ST131, ST393, ST69, ST95 e ST73 (Riley, 2014). Diversos estudos internacionais, como a revisão de Manges e colaboradores de 2019, foram realizados para acompanhar a distribuição temporal e geográfica desses clones de *E. coli*. Esses estudos são fundamentais para a investigação epidemiológica e análise das características que diferenciam essas linhagens.

Contudo, no Brasil são poucos estudos que buscam monitorar a evolução e disseminação dos principais clones de ExPEC no país. Um dos estudos mais recentes analisou amostras isoladas de espécimes de urina de pacientes hospitalizados no Rio de Janeiro em 2015 e 2016 e identificou a prevalência de ST131 (n = 26; 24%) nas cepas de ExPEC (Campos *et al.*, 2018). Outro estudo recente foi realizado pelo nosso grupo, para investigar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de *E. coli* obtidas de indivíduos com ITU diagnosticada na comunidade em 2015 (de Souza da Silva *et al.*, 2020). Foi identificada a expansão do ST131, quando comparado com cepas de UPEC de um estudo realizado anos antes (Dias *et al.*, 2009), e a permanência da baixa frequência do ST95. Esses estudos mostram resultados diferentes em relação ao predomínio do ST95, em comparação ao observado em outros países. Os motivos dessa grande diferença não são claros, entretanto, o predomínio do ST131 no Brasil poderia ser associado à alta taxa de resistência a antimicrobianos e ao grande número de fatores de virulência, como é demonstrado em diversos estudos (Riley, 2014; Flament-Simon *et al.*, 2020). Esse achado poderia estar associado ao uso desses medicamentos em grande intensidade. Já as razões pelas quais as cepas do ST95 são susceptíveis à maioria dos antimicrobianos e mais disseminadas em diversas regiões do mundo, e pouco frequente no Brasil, ainda são pouco exploradas.

Este é um entre os poucos trabalhos que citam ou investigam o ST95 no Brasil, no estado do Rio de Janeiro. Portanto, este estudo consiste na análise de uma coleção de amostras de *E. coli* do ST95 obtidas de indivíduos com ITU e ICS do Rio de Janeiro. Foram investigadas a sua prevalência ao longo do tempo e suas características fenotípicas de resistência a antimicrobianos. Assim, obtivemos mais informações sobre este ST, como sua importância clínica como causa dessas infecções no Brasil.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Investigar a prevalência de amostras de *E. coli* do ST95 em coleções de UPEC isoladas de ITU e outra de amostras isoladas de ICS coletadas no Rio de Janeiro, analisar características de susceptibilidade a antimicrobianos e mudanças temporais na prevalência nas coleções de UPEC.

3.2. Objetivos específicos

- a) Determinar a prevalência de *E. coli* ST95 entre as amostras de UPEC isoladas de ITU em 2019.
- b) Comparar a prevalência de amostras ST95 obtidas de ITU de forma sucessiva nos anos de 2005 e 2006, 2015 e 2019.
- c) Descrever e comparar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos nas amostras ST95 dessas coleções provenientes de ITU em 2005 e 2006, 2015 e 2019 e isoladas de ICS em 2013 a 2015.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho do estudo

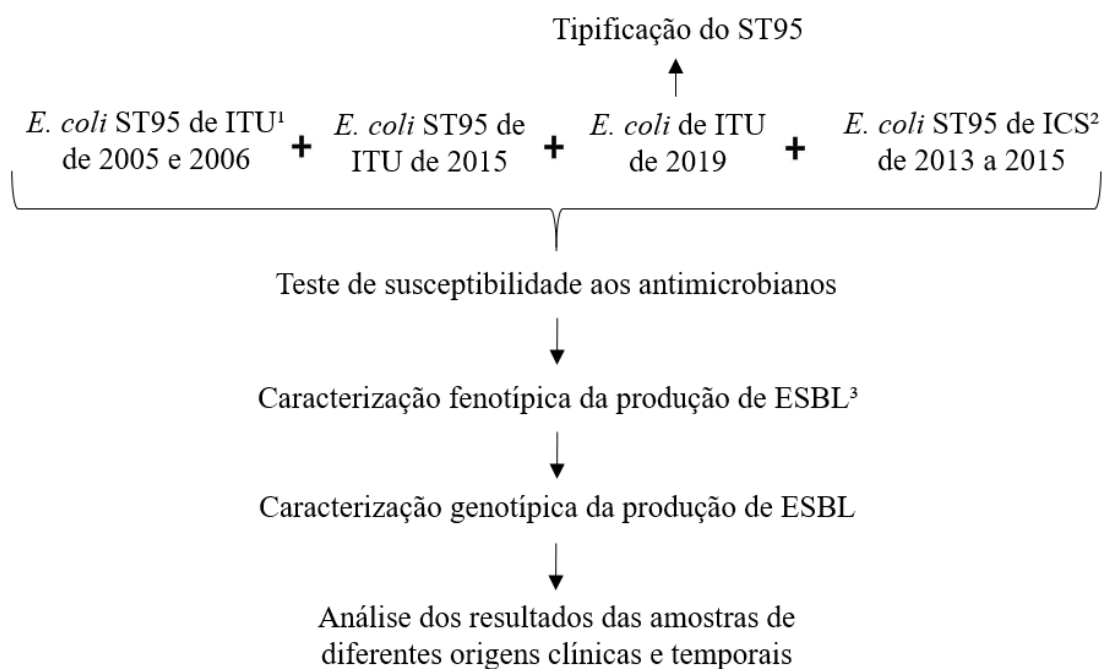


Figura 2- Fluxograma das principais etapas do presente estudo. ¹ITU: infecção de trato urinário; ²ICS: infecção de corrente sanguínea; ³ESBL: betalactamase de espectro estendido.

4.2 Coleção de amostras

Para a realização desse estudo foi utilizada uma coleção de amostras de *E. coli* ST95 composta por cepas oriundas de dois grupos de amostras de UPEC e um grupo de amostras de ICS, cuja linhagem foi previamente identificada (Dias *et al.*, 2009, de Araújo Longo, 2017 e de Souza da Silva *et al.*, 2020). Soma-se a essas uma terceira coleção de amostras de UPEC provenientes de ITU estabelecida em 2019 que foram tipificadas e utilizadas no atual estudo. Informações referentes a estas coleções utilizadas encontram-se na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Amostras de *Escherichia coli* do ST95 utilizadas no estudo

Fonte (espécime)	Ano de obtenção	Nº de amostras na col. original ⁴ (nº de ST95)	Referência
ITU ¹ Diag ³ . na comunidade (urina)	2005 e 2006	139 (2)	Dias <i>et al.</i> , 2009
	2015	499 (4)	de Souza da Silva <i>et al.</i> , 2020
	2019	937 (ND ⁵)	Este estudo
ICS ² Diag ³ . no hospital (sangue)	2013 a 2015	166 (8)	de Araújo Longo, 2017

¹ITU: infecção de trato urinário; ²ICS: infecção de corrente sanguínea; ³ Diag: diagnosticada; ⁴col. original: coleção original; ⁵ND: não determinado.

Uma coleção dos grupos de amostras de UPEC ST95 utilizado nesse estudo é proveniente de uma coleção de amostras coletadas de mulheres com ITU diagnosticada na comunidade, no Rio de Janeiro, entre 2005 e 2006 (n=2). Esse estudo foi também desenvolvido no laboratório do presente projeto (Dias *et al.*, 2009).

A segunda coleção de UPEC é formada por amostras isoladas de ITU diagnosticadas na comunidade identificadas em espécimes de urina coletadas de diversos locais no estado do Rio de Janeiro. Essa coleção de amostras foi fornecida pelo Laboratório de Diagnósticos da América (DASA), referentes a indivíduos que buscaram atendimento no ano de 2015. Essas amostras de *E. coli* ST95 compõem um conjunto de cepas utilizadas em um trabalho realizado previamente no laboratório (de Souza da Silva *et al.*, 2020).

A coleção de amostras de ICS utilizada nesse estudo foi estabelecida entre abril de 2013 e fevereiro de 2015, proveniente de dois hospitais do Rio de Janeiro: Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) e Hospital do Câncer I do Instituto Nacional do Câncer (INCA). Esse grupo de amostras de *E. coli* ST95 compõe uma coleção que foi utilizada em um trabalho realizado anteriormente no laboratório (de Araújo Longo, 2017).

A terceira coleção de amostras UPEC isoladas de ITU diagnosticadas na comunidade, que representa a maior parte das amostras (n=937), também é composta por cepas que foram isoladas de espécimes de urina coletadas no estado do Rio de Janeiro. Esses indivíduos buscaram o atendimento no DASA no ano de 2019. As amostras foram identificadas como *E. coli* previamente pelo teste automatizado VITEK (BioMérieux®). O resultado dessas análises foi enviado ao nosso laboratório em formato de ficha individual contendo informações sobre os pacientes (idade, sexo e local de coleta), o resultado do teste de susceptibilidade a antimicrobianos e a identificação da amostra, ambos realizados pelo VITEK. As fichas vieram acompanhadas das culturas bacterianas com contagem de UFC/mL realizadas previamente. No laboratório as amostras foram identificadas por espectrometria de massas por MALDI-TOF MS (do inglês *matrix-assisted laser desorption ionization time of flight*).

4.3. Tipificação da linhagem

A coleção de amostras de *E. coli* isoladas de ITU no ano de 2019 foi submetida a técnica de PCR *multiplex*, com o objetivo de identificar quais dessas pertenciam à linhagem ST95. Na técnica de PCR *multiplex*, foram usados iniciadores para as regiões conservadas do ST95 e das outras linhagens ST73, ST131 e ST69 (**Tabela 3**).

Tabela 3- Iniciadores utilizados na amplificação de amostras do ST95

Iniciador	Sequência de Oligonucleotídeos (5' >3')	Amplicon (pb¹)	Referência
ST95_for ²	ACTAATCAGGATGGCGAGAC	200	Doumith <i>et al.</i> , 2015
ST95_rev ³	ATCACGCCCATTAATCCAGT		
ST73_for	TGGTTTTACCATTTTGTTCGGA	490	
ST73_rev	GGAAATCGTTGATGTTGGCT		
ST131_for	GACTGCATTTTCGTCGCCATA	310	
ST131_rev	CCGGCGGCATCATAATGAAA		
ST69_for	ATCTGGAGGCAACAAGCATA	104	
ST69_rev	AGAGAAAGGGCGTTCAGAAT		

¹pb: pares de bases; ²for: *forward*; ³rev: *reverse*.

O DNA das amostras utilizado na reação de amplificação foi obtido a partir do seu cultivo em meio ágar triptona de soja (TSA), e incubação a 35 ± 2 °C por 24 horas. Foi preparada uma suspensão com uma colônia da amostra em um tubo de 1,5 mL contendo 100 µl de água livre de DNase e RNase. Essa suspensão foi agitada no vortex para auxiliar na liberação do DNA da amostra.

O volume final da reação foi de 10 µL contendo os seguintes componentes: 5 µL de Master Mix (Promega), 0,2 µL de cada iniciador (10 pmol/µL), 3,6 µL de água e 1,0 µL da solução contendo DNA da amostra. Os ciclos dessa reação de amplificação consistem nas seguintes etapas: desnaturação inicial de 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, e uma etapa final de extensão de 72 °C por 5 min.

Apenas as amostras identificadas como *E. coli* ST95, tanto nessa coleção de ITU de 2019, como nos outros grupos de amostras previamente tipificadas nos estudos realizados anteriormente (**Tabela 2**), foram utilizadas para as próximas etapas da metodologia (**Figura 2**). Essas amostras foram estocadas e armazenadas em criotubos contendo 1 mL de *skim milk* e glicerol a 10% a -20 °C.

4.4. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

Foi realizado o teste de susceptibilidade a todos os 16 antimicrobianos utilizados no estudo por disco-difusão em ágar no laboratório para as amostras ST95 das coleções provenientes de ITU de 2005, 2015 e 2019. Já para a coleção de amostras isoladas de ICS, foi realizado o teste de susceptibilidade a antimicrobianos específicos para complementar o teste realizado no estudo anterior que utilizou essas amostras. Dessa forma, foi obtido para toda a coleção de *E. coli* ST95 utilizada no atual estudo o resultado do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos presentes na **Tabela 4**.

Para realização desse teste, as amostras foram cultivadas em meio TSA por esgotamento e as culturas incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas. Em tubos contendo solução salina (0,85%) foram adicionadas aproximadamente 3 a 5 colônias bacterianas até obter turvação semelhante a solução padrão 0,5 da escala McFarland. Essa suspensão foi semeada uniformemente por meio de um *swab* em meio ágar Mueller-Hinton (MHI). Após a semeadura, foram adicionados os discos com antimicrobianos (**Tabela 4**) na superfície do ágar com distância mínima de 24 mm entre os centros dos discos com auxílio de uma pinça esterilizada. Posteriormente, as culturas foram incubadas na estufa por 16 a 18 horas a 35 ± 2 °C. A cepa *E. coli* ATCC® 25922 (do inglês, *American Type Culture Collection*) foi utilizada como controle de qualidade dos discos antimicrobianos e o resultado foi analisado por meio da mensuração dos halos de inibição de cada disco de antimicrobiano, seguindo as diretrizes do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021). Isso permitiu classificar as cepas bacterianas em resistentes, intermediárias e sensíveis.

Tabela 4- Antimicrobianos utilizados no teste de susceptibilidade por disco difusão

Antimicrobiano (concentração nos discos)	Sigla	Classe	
Ampicilina (10 µg)	AMP	Penicilinas	Betalactâmicos
Amoxicilina/Ac. Clavulânico (20/10 µg)	AMC		
Cefuroxima (30 µg)	CRX	Cefalosporinas 2ª geração	
Cefoxitina (30 µg)	CFO		
Cefotaxima ¹ (30 µg)	CTX	Cefalosporinas 3ª geração	
Ceftriaxona (30 µg)	CRO		
Ceftazidima ¹ (30 µg)	CAZ		
Cefepima ¹ (30 µg)	CPM	Cefalosporinas 4ª geração	
Aztreonam ¹ (30 µg)	ATM	Monobactâmicos	
Ertapenem (10 µg)	ETP	Carbapenêmicos	
Amicacina (30 µg)	AMI	Aminoglicosídeos	
Gentamicina (10 µg)	GEN		
Fosfomicina (200 µg)	FOS	Fosfomicinas	
Nitrofurantoína (300 µg)	NIT	Nitrofuranos	
Ciprofloxacina (5 µg)	CIP	Quinolonas	
Sulfametoxazol-trimetoprim (10 µg)	SUT	Sulfanamidas	

¹antimicrobianos utilizados no teste fenotípico de produção de ESBL.

4.5. Caracterização fenotípica da produção de betalactamases de espectro estendido

Foi realizado também o teste de dupla difusão para avaliar a produção de ESBL. Para isso, foi realizada a suspensão de cada amostra, cultivada anteriormente em meio TSA, em

solução salina e feita a semeadura uniforme em meio ágar MHI, de acordo com a metodologia descrita previamente no subtópico 4.4.

Nesse teste foram utilizados cinco discos de antimicrobianos por placa, dispostos na superfície do ágar, com auxílio de uma pinça esterilizada, a uma distância de 2,5 cm entre o centro de cada um deles. No centro da placa foi colocado um disco de amoxicilina/ ácido clavulânico, cercado por discos com os seguintes antimicrobianos: cefotaxima, cefepima, ceftazidima (cefalosporinas) e aztreonam (monobactâmico) (Jarlier *et al.*, 1988). Esses antimicrobianos estão descritos na **Tabela 4**.

Um resultado positivo é caracterizado pela observação da distorção dos halos de inibição indicando sinergismo. As ESBL são capazes de hidrolisar cefalosporinas e monobactâmicos, contudo são inibidas pelo ácido clavulânico. Assim, a produção de ESBL é detectada ao ocorrer a ampliação do halo de inibição em alguma das cefalosporinas ou do aztreonam na presença do ácido clavulânico, ou com a formação de uma “zona fantasma” (Akpaka e Swanston, 2008). A cepa *E. coli* ATCC® 25922 foi utilizada como controle negativo da produção de ESBL.

4.6. Caracterização genotípica da produção de betalactamases de espectro estendido

As amostras classificadas como produtoras de ESBL foram caracterizadas a partir da detecção de genes que codificam essas enzimas. Para isso, foram submetidas a PCR *simplex* para a pesquisa dos genes que codificam betalactamases do tipo CTX-M. Os iniciadores utilizados nessas reações encontram-se descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Iniciadores utilizados para detecção de genes codificadores de betalactamases

Genes <i>bla</i>	Iniciador	Sequência de Oligonucleotídeos (5' >3')	Amplicon (pb ⁴)	Referência
CTX-M (gr ¹ . 1)	for ² rev ³	TGTTATTTTCGTCTCTTTCAG CATTCCCTTTCCGCTATTAC	926	Wang <i>et al.</i> , 2012
CTX-M (gr. 2)	for rev	GAAGGCCGAGGGATAATAC GTTGCAAGACAAGACTGAAG	986	
CTX-M (gr. 8)	for rev	CAGGAGTTTGAGATGATGAG GAGCGCTCCACATTTTTTAG	910	
CTX-M (gr. 9)	for rev	CGTATTGGGAGTTTGAGATG TTCAACAAAACCAGTTACAG	907	

¹gr: grupo; ²for: *forward*; ³rev: *reverse*; ⁴pb: pares de base.

O volume final das reações foram de 10 µL contendo os seguintes componentes: 5µL de Master Mix (Promega), 1,0 µL de cada iniciador (10 pmol/µL), 2,0 µL de água e 1,0 µL da solução contendo DNA da amostra. A amplificação dos genes *bla_{CTX-M}* grupo 1 e *bla_{CTX-M}* grupo 9 foi realizada através de um ciclo inicial de desnaturação de 3 min a 94° C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94° C, 1 min a 51° C e 2 min a 72° C, seguido por ciclo de extensão final de 5 min a 72° C. Já as reações de amplificação dos genes *bla_{CTX-M}* grupo 2 e *bla_{CTX-M}* grupo 8, consistiram em um ciclo inicial de 3 min a 94° C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94° C, 1 min a 56° C e 2 min a 72° C, seguido por ciclo de extensão final de 5 min a 72° C (Wang *et al.*, 2012).

4.7. Análises estatísticas

Os dados foram analisados através do programa Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health versão 3.01 (Dean *et al.*, 2013). As diferenças entre as variáveis categóricas foram analisadas por teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher e teste t de Student. Valor de p bicaudal <0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

4.8. Observação dos produtos de PCR

Os produtos das reações de PCR, realizadas nas etapas 4.3 e 4.6 descritas acima na metodologia, foram aplicados em gel de agarose a 1,5% com tampão tris-borato EDTA (TBE) 0,5X (1X – 89mm tris, 89mm ácido bórico e 0,05 M EDTA [pH 8,2]) e corado com brometo de etídio a 1 µg/mL. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal a 100 Volts e o resultado observado a partir da captura de imagens dos géis realizada no equipamento transiluminador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

5. RESULTADOS

5.1. Prevalência de amostras de *E. coli* ST95

Primeiramente, foi calculada e comparada a prevalência de amostras previamente tipificadas de *E. coli* ST95 para cada uma das coleções de UPEC pré-estabelecidas. Entre as amostras de 2005 e 2006 esta linhagem correspondeu a 1,4% (n=2/139) do total de amostras da coleção e em 2015 essa linhagem foi equivalente a 0,8% (n= 4/499) desse grupo de amostras.

Na coleção de 937 amostras de *E. coli* isoladas de ITU no ano de 2019, que foi submetidas ao PCR *multiplex*, foram identificadas 24 amostras de *E. coli* ST95 que correspondem a 2,5% (n=24/937) do total desta coleção.

Assim, foi possível observar que apesar da manutenção da baixa prevalência, ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) na frequência dessa linhagem entre amostras isoladas de espécimes de urina de indivíduos com ITU diagnosticadas na comunidade no ano de 2015 e 2019. A prevalência nas coleções nos diferentes anos e esse aumento estão representados abaixo na **Figura 3**.

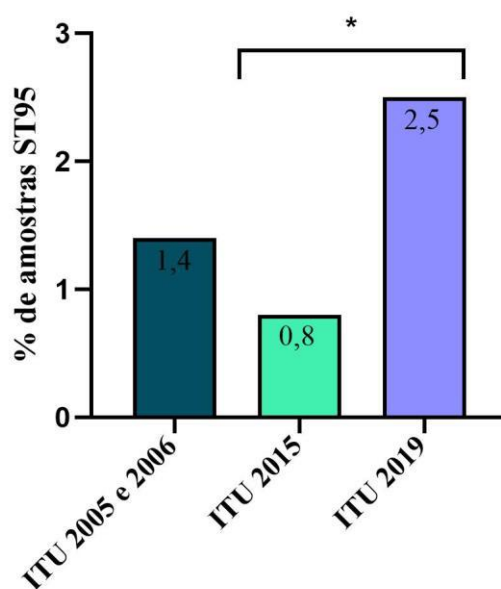


Figura 3 – Prevalência (%) de amostras de *E. coli* ST95 em cada uma das três coleções de UPEC provenientes de ITU. ITU: infecção de trato urinário; *: aumento significativo.

A prevalência dessa linhagem entre amostras provenientes de ICS fornecidas por hospitais no Rio de Janeiro corresponde a 4,8% ($n = 8/166$). Esse valor revela uma maior frequência desse ST em amostras do estudo isoladas de ICS em hospitais do que de ITU diagnosticadas na comunidade. A prevalência de amostras de *E. coli* ST95 em cada grupo de amostras está representada na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Prevalência de amostras de *E. coli* ST95 relativa ao total de amostras de cada coleção original.

Col. original ¹	Nº de amostras da col. original	Nº de ST95 (% relativo ao total de amostras da col. original)
ITU ² 2005 e 2006	N=139	2 (1,4)
ITU 2015	N=499	4 (0,8)
ITU 2019	N=937	24 (2,5)
ICS ³ 2013 a 2015	N=166	8 (4,8)
Total	N=1584	35 (2,2)

¹Col. original: coleção original; ²ITU: infecção de trato urinário; ³ICS: infecção de corrente sanguínea.

5.2. Susceptibilidade a antimicrobianos

Tendo em vista analisar o perfil de resistência a antimicrobianos das amostras de *E. coli* ST95 utilizadas no estudo realizamos o teste por disco difusão em ágar. Entre todas as amostras analisadas que foram isoladas de ITU 67% ($n=20/30$) foram classificadas como susceptíveis a todos os antimicrobianos testados, 23% ($n=7/30$) foram classificadas como não-susceptíveis a um antimicrobiano e 10% ($n=3/30$) foram consideradas não-susceptíveis a ao menos dois antimicrobianos. Já entre as amostras de ICS, 50% ($n=4/8$) foram classificadas como susceptíveis a todos os antimicrobianos testados, 38% ($n=3/8$) foram classificadas como não-susceptíveis a um antimicrobiano e 13% ($n=1/8$) foram consideradas não-susceptíveis a ao menos dois antimicrobianos. Além disso, as taxas de amostras susceptíveis, resistentes a um antimicrobiano e resistente a mais de um antimicrobiano para cada coleção de ITU está ilustrada na **Figura 4**.

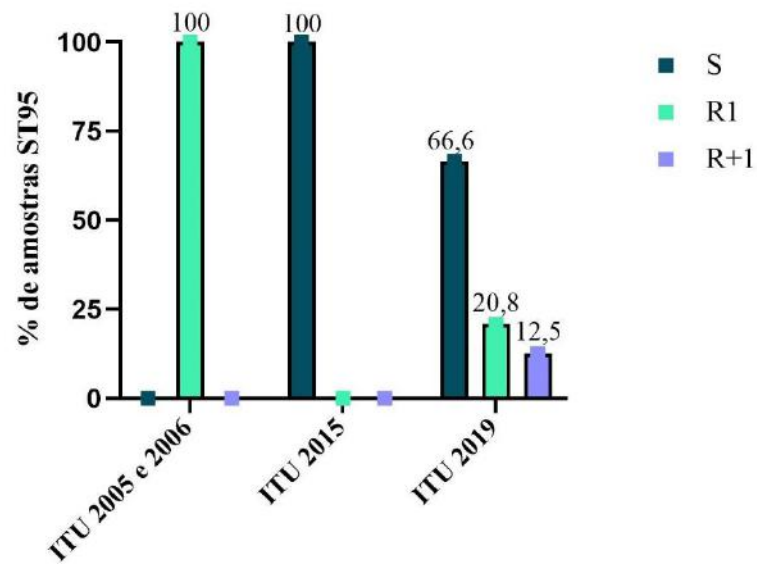


Figura 4 – Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de cada coleção proveniente de ITU. S: sensível a todos os antimicrobianos testados; R1: resistente a um dos antimicrobianos testados; R+1: resistente a mais de um antimicrobiano testado.

Uma amostra pertencente a coleção de ITU de 2019 foi classificada como MDR, ou seja, não-susceptível a pelo menos um antimicrobiano de 3 classes diferentes (Magiorakos *et al.*, 2012), sendo não-susceptível a 11 antimicrobianos testados: ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, gentamicina, ciprofloxacina, ceftriaxona, sulfametoxazol-trimetoprim, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, aztreonam e cefepima (**Figura 5**).

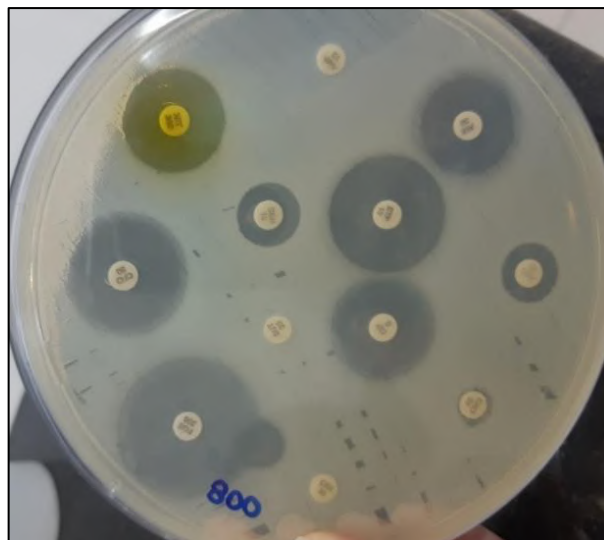


Figura 5 – Resultado do teste susceptibilidade a 12 antimicrobianos da amostra multirresistente da coleção de ITU de 2019 que apresentou perfil de não susceptível a 11 dos 16 antimicrobianos testados. Discos de antimicrobianos observados na figura: AMI = amicacina; AMP = ampicilina; ETP = ertapenem; AMC = amoxicilina-ácido clavulânico; NIT = nitrofurantoína; GEN = gentamicina; CIP = ciprofloxacina; CRO = ceftriaxona; SUT = sulfametoxazol-trimpetoprim; CFO = cefoxitina; FOS = fosfomicina; CRX = cefuroxima.

Outra amostra com a segunda maior taxa de não-susceptibilidade pertence a coleção de ICS de 2013 a 2015 e apresentou não-susceptibilidade a 4 antimicrobianos testados: ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, cefotaxima e cefepima.

Foi detectada resistência a 12 antimicrobianos entre os 16 testados. Os antimicrobianos com maior taxa de não-susceptibilidade nas coleções de ITU foram os seguintes: ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprim, ambos com 17% (n=5/30). Por outro lado, não foi detectada nenhuma amostra dessas coleções não-susceptíveis à: amicacina, ertapenem, nitrofurantoína, cefotaxima e fosfomicina. Na coleção de amostras isoladas de ICS o antimicrobiano com maior taxa de não-susceptibilidade foi ampicilina, para qual 38% (n=3/8) das amostras apresentaram resistência. Além de ampicilina, nessa coleção foram detectadas amostras não-susceptíveis também a: sulfametoxazol-trimetoprim, cefoxitina, cefotaxima e cefepima. Resultados referentes ao teste de susceptibilidade estão apresentados na **Tabela 7**.

A comparação entre as frequências de resistência aos antimicrobianos individualmente nas diferentes coleções de amostras não revelou diferenças com significado estatístico.

Tabela 7- Prevalência (%) de amostras não-susceptíveis a cada antimicrobiano nas coleções analisadas

Antimicrobianos	Número e (%) de amostras resistentes			
	ICS ¹ 2013 a 2015 (n=8)	ITU ² 2005 a 2006 (n=2)	ITU 2015 (n=4)	ITU 2019 (n=24)
Amicacina	0	0	0	0
Ampicilina	3 (38)	1	0	4 (17)
Ertapenem	0	0	0	0
Amoxicilina/ac. Clavulânico	0	0	0	2 (8)
Nitrofurantoína	0	0	0	0
Gentamicina	0	0	0	1 (4)
Ciprofloxacina	0	0	0	2 (8)
Ceftriaxona	0	0 ³	0	1(4)
Sulfametoxazol-trimetoprim	1 (13)	1	0	4 (17)
Cefoxitina	1 (13)	0	0	0
Fosfomicina	0	0	0	0
Cefuroxima	0	0	0	1 (4)
Cefotaxima	1 (13)	0	0	2 (8)
Ceftazidima	0	0	0	1 (4)
Aztreonam	0	0 ³	0	1 (4)
Cefepima	1 (13)	0 ³	0	1 (4)

¹ICS: infecção de corrente sanguínea; ²ITU: infecção de trato urinário; ³não determinado para uma das duas amostras.

5.3. Produção de betalactamases de espectro estendido

Todas as amostras foram submetidas ao teste de disco aproximação para a detecção de produção de ESBL. Aquelas com resultado positivo foram submetidas ao teste de PCR para amplificação de genes codificadores dessas enzimas.

Apenas uma amostra da coleção isolada de ITU no ano de 2019 revelou produção de ESBL (**Figura 6**). Essa amostra apresentou resistência a 11 dos 16 antimicrobianos testados sendo classificada como MDR e portadora do gene *bla*CTX-M do grupo 2.

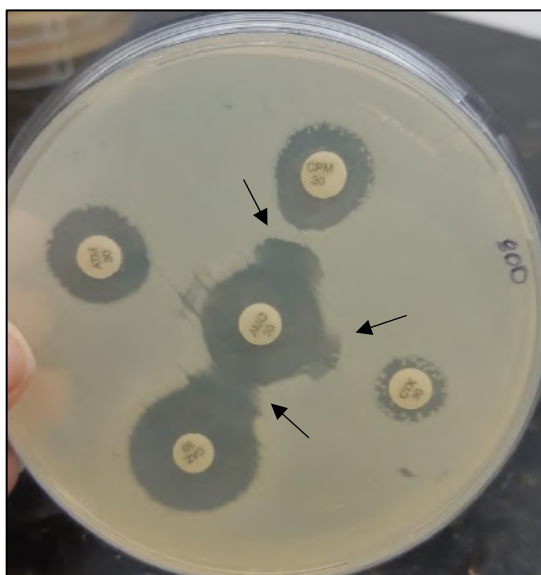


Figura 6 – Resultado positivo do teste fenotípico de produção de ESBL de amostra da coleção de amostras isoladas de ITU de 2019. Setas indicam distorção dos halos de inibição, revelando sinergismo entre o disco contendo o inibidor de beta-lactamases e os discos com antimicrobianos beta-lactâmicos. Discos de antimicrobianos observados na figura: CPM = cefepima; CTX = cefotaxima; CAZ = ceftazidima; ATM = aztreonam; AMC = amoxicilina-ácido clavulânico.

6. DISCUSSÃO

Tendo em vista sua relevância médica e a pouca quantidade de estudos que analisam a linhagem *E. coli* do ST95, principalmente no Brasil, o presente projeto investigou a prevalência dessas cepas em coleções de amostras de UPEC coletadas no Rio de Janeiro. Observou-se no atual trabalho uma baixa prevalência dessa linhagem em cada coleção de amostras de ITU estudada (0,8% a 2,5%). Esse resultado é diferente do relatado por outros trabalhos de diversos países que identificaram ST95 dentre as linhagens mais prevalentes entre amostras isoladas de ITU (Yun *et al.*, 2015; Yamaji *et al.*, 2018; Fibke *et al.*, 2019). Um trabalho que expõe essa diferença ao ser comparado com o dado observado no atual estudo foi realizado no Canadá, também com amostras de ExPEC isoladas de ITU adquiridas na comunidade. Os autores identificaram a linhagem ST95 (18%) como a mais prevalente (Fibke *et al.*, 2019). Yun e colaboradores (2015) também identificaram *E. coli* do ST95 como a linhagem mais prevalente (36%) entre amostras isoladas de 2011 a 2013 de espécimes de urina de crianças diagnosticadas com ITU adquiridas na comunidade (Yun *et al.*, 2015). Já outros estudos detectaram também baixa frequência desse ST (Gibreel *et al.*, 2012 e Alghoribi *et al.*, 2015). Um exemplo é um trabalho realizado na Arábia Saudita com amostras isoladas de pacientes com ITU adquiridas na comunidade, que representava maior parte da coleção, e também de ITU associadas à assistência à saúde. *E. coli* ST95 correspondeu a 5% das amostras, sendo a sétima linhagem mais comum (Alghoribi *et al.*, 2015). Esses dados, em conjunto com outros na literatura, revelam diferentes taxas de frequência dessa linhagem em diversas regiões no mundo (Manges *et al.*, 2019; Matsukawa *et al.*, 2019; Matsui *et al.*, 2020). Contudo, os motivos que levam a essas diferentes taxas ainda não são bem esclarecidos.

Um dos resultados importantes evidenciados neste trabalho é a manutenção da baixa prevalência dessa linhagem nas coleções de ITU nos anos de 2005 (1,4%), 2015 (0,8%) e 2019 (2,5%). Essa manutenção da prevalência dessa linhagem por um determinado período de tempo já foi observada em alguns trabalhos (Gibreel *et al.*, 2012; Yamaji *et al.*, 2018; Birgy *et al.*, 2020). Um exemplo é um estudo realizado em uma comunidade universitária na Califórnia com amostras de UPEC isoladas de ITU adquiridas na comunidade em dois períodos: 1999-2000 e 2016-2017 (Yamaji *et al.*, 2018). Os autores identificaram no primeiro período que as amostras ST95 correspondiam a 15% das analisadas, enquanto no segundo período elas passaram a representar 17%. Apesar de nesse trabalho a linhagem ST95 ser a mais frequente em comparação com as outras linhagens identificadas, diferente do observado nos resultados do atual trabalho com amostras do Rio de Janeiro, ele revela também a ocorrência da manutenção da prevalência da linhagem nas duas coleções. A manutenção da frequência dessa linhagem

também foi observada em uma coleção de UPEC provenientes de espécimes de urina contendo amostras isoladas de infecções adquiridas na comunidade na Inglaterra, que era maior parte das amostras dessa linhagem, e de ITU associadas à assistência à saúde. Ao comparar a prevalência em 2007 com 2009, os autores detectaram a manutenção da baixa prevalência das amostras desse ST (~6%) (Gibreel *et al.*, 2012). Em um outro trabalho com amostras isoladas de ITU fornecidas por centros pediátricos na França também foi possível observar uma manutenção da baixa prevalência do ST95 ao longo dos anos 2015, 2016 e 2017 (Birgy *et al.*, 2020). Gordon e colaboradores (2017) detectaram a manutenção da frequência do CC95 em amostras isoladas de espécimes clínicos de fezes, urina e sangue dos anos 2002 para 2014 na Austrália. Não foi identificada mudança significativa na prevalência das amostras do CC95 em nenhum dos espécimes, especificamente da urina, entre as amostras do grupo B2, em 2002 o CC95 correspondeu a 15% e 2014 a representou 17% (Gordon *et al.*, 2017). Observa-se assim que, apesar da frequência variar entre diferentes regiões, a prevalência desse ST se mantém ao longo do tempo. Os fatores envolvidos nessa manutenção de prevalência também precisam ser mais estudados.

Devido ao número reduzido de trabalhos que investiguem essa linhagem no Brasil, buscamos identificar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos nas amostras utilizadas nesse trabalho. Os resultados revelaram que a maioria das amostras isoladas de ITU foram classificadas como susceptíveis a todos antimicrobianos testados (67%, n=20/30). Esse resultado é similar a dados de diversos relatos que caracterizaram essa linhagem como amplamente susceptível (Gibreel *et al.*, 2012; Matsukawa *et al.*, 2019). Em um trabalho realizado na Inglaterra analisando amostras isoladas de ITU, sendo a maioria de infecções adquiridas na comunidade, revelou que o ST95 apresentou as menores taxas de resistência entre todas as linhagens identificadas (Gibreel *et al.*, 2012). Dados semelhantes também foram reportados por um estudo de 2015 realizado na Coreia do Sul ao analisar amostras de UPEC obtidas de crianças diagnosticadas com ITU adquiridas na comunidade. Os autores identificaram que o número de amostras susceptíveis a todos os antimicrobianos foi maior na linhagem ST95 (n=11/23, 48%) (Yun *et al.*, 2015). As razões associadas à manutenção dessa ampla susceptibilidade, diferente de outras linhagens pandêmicas como ST131, mesmo estando sob constante pressão seletiva, inclusive devido ao amplo uso de antimicrobianos, necessitam ser melhor investigadas.

A maior susceptibilidade a antimicrobianos da linhagem ST95 observada neste e em outros estudos pode estar associada a outros fatores. Em um estudo realizado por Stephen e colaboradores em 2017, foi identificado com alta frequência em amostras amplamente

susceptíveis dessa linhagem um grupo de plasmídeos (pUTI89, pRS218 e pEC14_114) com similares chamado de pUTI89-like. Os registros sobre esses plasmídeos se iniciam em 1974, quando, em San Francisco nos EUA, foi detectada a presença do plasmídeo pRS218 em uma cepa, *E. coli* RS218, obtida de um caso de meningite neonatal, semelhante a outros plasmídeos detectados posteriormente (Stephens *et al.*, 2017). O plasmídeo pRS218 abriga diversos genes associados a fatores de virulência importantes para sobrevivência da bactéria no hospedeiro (Wijetunge *et al.*, 2014). Já em 2010, foi sequenciado o DNA de um plasmídeo portador de genes associados à manutenção e estabilidade do plasmídeo, resistência à colicina, elementos genéticos móveis e replicação, identificado em cepas de UPEC coletadas em Minnesota nos EUA. Esse plasmídeo foi denominado de pEC14_114 (DebRoy *et al.*, 2010). Nesse mesmo ano, foi detectada a presença de um grande elemento extra cromossômico nomeado pUTI89 na cepa UTI89 de UPEC, coletada em St. Louis, MO nos EUA. Esse plasmídeo abrigava genes relacionados à conjugação e outros genes comumente encontrados em bactérias patogênicas, como por exemplo codificadores de sistemas envolvidos na captação de ferro (Cusumano *et al.*, 2010). Segundo Stephen e colaboradores (2017), a presença desse conjunto de plasmídeos foi associada a maior susceptibilidade a antimicrobianos e a ausência de outros plasmídeos na mesma célula. Esse dado sugere que as altas taxas de susceptibilidade a antimicrobianos identificadas nessa linhagem e observadas nesse atual trabalho podem estar associadas a outros fatores, como a presença desses plasmídeos.

Outro fator que pode estar associado a maior susceptibilidade a antimicrobianos nessa linhagem é o gene *fimH*. O estudo realizado por Stephens e colaboradores (2017) revelou que, assim como a presença dos plasmídeos pUTI89-like, a presença do alelo *fimH6* foi associada a maior susceptibilidade a antimicrobianos e a menor quantidade de genes de resistência do que as cepas com outros alelos. Além disso, foi observada uma associação frequente do pUTI89-like com genótipo *fimH6* (Stephens *et al.*, 2017). O mesmo dado foi observado em 2012, em um estudo realizado com cepas isoladas de ICS, nas quais 67% das susceptíveis apresentavam genótipo *fimH6* (Adams-Sapper *et al.*, 2013). Nesse mesmo trabalho, além do alelo *fimH6* ter sido associado a maior probabilidade da amostra ser susceptível a antimicrobianos, 43% das amostras que apresentavam esse genótipo pertenciam à linhagem ST95. Além disso, esse alelo foi o mais encontrado entre as amostras da linhagem ST95 e nenhuma delas era MDR. Já em relação às amostras dessa linhagem com genótipo *fimH1*, 75% foi classificada como resistente a pelo menos uma classe de antimicrobianos e 38% foram classificadas como MDR. Os autores detectaram também amostras MDR dessa linhagem com os alelos *fimH9* e *fimH47* (Adams-Sapper *et al.*, 2013). Outro trabalho que aborda os diferentes alelos do gene *fimH* nessa

linhagem foi realizado com amostras de ITU adquiridas na comunidade na Califórnia nos EUA. Nesse estudo, o subtipo *fimH47* foi mais frequente entre amostras susceptíveis a antimicrobianos beta lactâmicos, enquanto o genótipo *fimH6* foi identificado com mais frequência entre amostras resistentes a beta lactâmicos (Tarlton *et al.*, 2019).

Já na linhagem ST131, também é possível observar uma associação entre os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos e alelos específicos do gene *fimH*. Esse ST pode ser dividido geneticamente em clados A, B e C. O clado B é associado ao alelo *fimH22* sendo frequentemente susceptível a fluoroquinolonas, e raramente carrega plasmídeos com o gene *bla_{CTX-M-15}*. Já o clado C é associado ao *fimH30* e pode ser dividido em subclados, sendo o C1/H30R associado a resistência a fluoroquinolonas e o C2/H30-Rx comumente produtor de ESBL, mais especificamente CTX-M-15 (Pitout e DeVinney, 2017). Já foi detectado em cepas do subclado C2 a resistência também a carbapenemas, devido à produção de carbapenemases como KPC-2. Esse subclado C2 abriga maior quantidade de genes de resistência a antimicrobianos do que os clados A, B e C1 (Ellaby *et al.*, 2019). Em vista dos dados mencionados, é possível supor que existe uma associação entre os tipos de *fimH* e a resistência ou susceptibilidade a antimicrobianos em alguns casos nessas linhagens. Contudo são necessárias mais análises, principalmente em cepas do ST95, para esclarecer essa relação.

Outro dado importante obtido no presente estudo é em relação aos antimicrobianos que possuíram as maiores taxas de não-susceptibilidade. Nas análises das amostras isoladas de ITU observou-se maior número de amostras resistentes à ampicilina (17%, n=5/30), e sulfametoxazol-trimetoprim (17%, n=5/30). Assim como o atual estudo, outros trabalhos de outros locais também observaram esse resultado (Yamaji *et al.*, 2018; Fibke *et al.*, 2019). Por exemplo, um trabalho utilizando amostras de UPEC isoladas de ITU adquiridas na comunidade realizado no Canadá identificou na linhagem ST95 a maior taxa de resistência às classes das penicilinas (17%) e a segunda maior taxa de resistência as sulfonamidas (11%) (Fibke *et al.*, 2019). O trabalho de Yamaji e colaboradores (2018) com amostras de UPEC isoladas de ITU adquiridas na comunidade na Califórnia, EUA, também revelou a presença de amostras dessa linhagem resistentes à ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprim em dois períodos diferentes. Entre 1999-2000, 3% das amostras dessa linhagem eram resistentes à ampicilina; já entre 2016-2017, esse número aumentou para 21% delas. As amostras resistentes a sulfametoxazol-trimetoprim representavam 2,9% das amostras dessa linhagem e passaram a representar 2,6%. Nesse mesmo trabalho, os autores detectaram duas amostras dessa linhagem resistentes à gentamicina e fosfomicina (Yamaji *et al.*, 2018). Já no atual estudo, detectou-se uma amostra de ITU resistente à gentamicina, porém nenhuma apresentou resistência à fosfomicina.

Outro estudo também identificou nessa linhagem mais amostras resistentes à ampicilina (41%), sendo este realizado em Minnessota nos EUA com amostras de ExPEC isoladas de infecção associadas à assistência à saúde e adquiridas na comunidade. Em relação às amostras desse ST, 88% foram isoladas de espécimes de urina e 13% de sangue (Banerjee *et al.*, 2013). Já um estudo desenvolvido no Iran, com amostras de UPEC dessa linhagem isoladas de espécimes de urina, mostrou as maiores taxas de resistência à cefotaxima (47%), sulfametoxazol-trimetoprim (33%) e ciprofloxacina (33%) (Hojabri *et al.*, 2019). Esse resultado é diferente dos dados analisados no atual trabalho; porém, neste, além da resistência a sulfametoxazol-trimetoprim, foi identificada não-susceptibilidade à cefotaxima e ciprofloxacina. Assim, foi possível observar semelhanças entre as taxas de resistência a antimicrobianos das amostras isoladas de ITU no atual trabalho em comparação com estudos prévios.

No atual trabalho observamos que todas as amostras da coleção de ITU de 2015 (n=4) apresentaram susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados. Já na coleção de 2019 (n=24), detectamos resistência a diversos antimicrobianos, sendo a maior taxa de resistência à ampicilina e a sulfametoxazol-trimetoprim, ambos com 17%. Esse dado pode ser associado ao resultado obtido em um trabalho realizado em 2018 com amostras de UPEC isoladas de ITU adquiridas na comunidade na Califórnia, EUA, com a descrição de amostras dessa linhagem resistentes à ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprim em dois períodos diferentes. Entre 1999-2000, 3% das amostras dessa linhagem eram resistentes à ampicilina; já entre 2016-2017, esse número aumentou para 21%. Já a taxa de resistência a sulfametoxazol-trimetoprim reduziu de 2,9% em 1999-2000 para 2,6% em 2016-2017. (Yamaji *et al.*, 2018). Assim, foi possível estabelecer um paralelo em relação à maior taxa de resistência à ampicilina no período mais tardio nos resultados encontrados nesse trabalho e no atual estudo; contudo, o mesmo não foi observado para sulfametoxazol-trimetoprim. É importante ressaltar que apesar de ser possível realizar essa comparação, não observamos relevância estatística ao analisar as taxas de não susceptibilidade nas diferentes coleções de amostras isoladas de ITU utilizadas no nosso trabalho.

Os dados obtidos nesse trabalho revelaram uma frequência de 5% da linhagem ST95 na coleção de amostras isoladas de ICS do Rio de Janeiro. Além disso, observou-se uma maior taxa de não-susceptibilidade dessas amostras à ampicilina (38%). Esses resultados foram parecidos aos observados em outros estudos. Em Calgary, Canadá, *E. coli* foi a bactéria mais isolada de espécime de sangue em 2016 (32%) e a linhagem ST95 foi a quarta identificada com maior frequência (7%). As amostras ST95 foram classificadas como as mais susceptíveis e cujas

maiores taxas de não-susceptibilidade foram à ampicilina (13%) seguidas de amoxicilina-ácido clavulânico, cefazolina, cefoxitina, ciprofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim, correspondendo a 4% da coleção para cada um desses antimicrobianos (Holland *et al.*, 2020). Observa-se assim uma frequência dessa linhagem próxima à obtida no atual trabalho e também a maior resistência à ampicilina. Em relação aos outros antimicrobianos, neste trabalho também identificamos amostras resistentes à sulfametoxazol-trimetoprim e cefoxitina. Taxa de frequência de ST95 próxima à observada no atual estudo foi detectada também entre amostras de 2015 de ICS de pacientes em um Hospital na China, sendo essa linhagem a terceira mais frequente (6%) (Chen *et al.*, 2019). Contudo, outro estudo realizado em um período de 2006 a 2016 em Oklahoma, EUA, com amostras isoladas de espécimes de sangue de recém-nascidos com ICS, observou maior frequência do ST95 (11%) que o atual trabalho. No entanto, este mesmo estudo também detectou maiores taxas de resistência à ampicilina em amostras dessa linhagem (Cole *et al.*, 2019). Na Inglaterra, nos anos de 2010 a 2012, amostras ST95, isoladas de espécimes de sangue, corresponderam a 10% do total isolado e também apresentaram a maior taxa de resistência à ampicilina (48%) (Horner *et al.*, 2014). Já os dados observados em trabalho de 2013, em relação a amostras de *E. coli* isoladas de ICS em San Francisco, EUA, revelaram altas taxas de resistência à sulfametoxazol-trimetoprim (18%) na linhagem ST95, que foi a segunda mais frequente (18%) (Adams-Sapper *et al.*, 2013). Embora esses dados acima revelem uma variação na prevalência dessa linhagem, foi possível observar semelhanças em relação aos perfis de resistência, principalmente em relação à ampicilina.

Alguns desses estudos citados acima que analisam amostras de ICS também revelaram alguns dados em relação aos seus fatores de virulência (Chen *et al.*, 2019; Cole *et al.*, 2019). Comparando o *score* de virulência de diferentes ST, esses autores obtiveram maiores valores para as linhagens identificadas como mais frequentes neste trabalho: ST131, ST1193 e ST95 (Chen *et al.*, 2019). Em outro estudo, ao observar a distribuição desses fatores entre amostras de ST95 e ST131 isoladas de recém nascidos com ICS, os autores detectaram uma prevalência significativamente maior de *papGII-II* e capsula *K1* na linhagem ST95, que foi identificada com a maior frequência. Os resultados também revelaram uma correlação inversa entre a quantidade de fatores de virulência e o número de antimicrobianos os quais as amostras são resistentes (Cole *et al.*, 2019).

Análises sobre os fatores de virulência desse ST também foram descritos em estudos com amostras isoladas de ITU (Birgy *et al.*, 2020; Mazumder *et al.*, 2020). O gene de virulência *papGII* foi detectado também em 100% das amostras de *E. coli* ST95 isoladas de ITU fornecidas por centros pediátricos na França. Essa foi a linhagem que apresentou maior frequência desse

gene que codifica uma adesina tipo pili associado à pielonefrite (Birgy *et al.*, 2020). Já em amostras isoladas de espécimes de urina de pacientes com suspeita de ITU em 2018 e 2019 em Bangladesh, a presença das ilhas de patogenicidade *pks* foi associada a cepas de ExPEC. Além disso, elas foram identificadas em linhagens que apresentam baixas taxas de resistência a antimicrobianos como ST95 e ST73, não sendo detectada em amostras ST131 (Mazumder *et al.*, 2020). Em outro trabalho utilizando modelo de infecção em *Galleria mellonella* com amostras de ExPEC isoladas de ITU e ICS, observou-se maior virulência nos ST131 e ST95. Isso foi determinado em um ensaio de sobrevivência de 96 horas das larvas com os diferentes inóculos, onde as menores taxas de sobrevivência após esse tempo foram referentes às linhagens ST131 seguido do ST95, comparando com outros principais ST. Esse dado foi observado também através do cálculo de *score* de virulência, correspondente à quantidade de fatores de virulência detectados, que indicou alta frequência de fatores nas amostras do ST95 (Ciesielczuk *et al.*, 2015). Pesquisadores observaram também entre amostras isoladas de espécimes clínicos, sendo maioria de urina, de pacientes hospitalizados no Iran, scores de virulência significativamente mais baixos na linhagem ST131 do que na ST73 e ST95 (Hojabri *et al.*, 2019). Outro estudo conduzido com amostras isoladas de espécimes clínicos na Espanha e França, sendo a maioria de espécimes de urina e sangue, analisou também os genes de virulência dessas amostras. Os autores detectaram uma maior média de genes que codificam fatores de virulência em amostras pertencentes ao grupo filogenético B2, em que o ST95 apresentou o maior *score* (18,2) (Flament-Simon *et al.*, 2020). Essas informações sugerem que diferentes fatores de virulência sejam importantes para a manutenção da prevalência e disseminação da linhagem ST95 entre amostras isoladas de ITU e ICS, apesar da característica de susceptibilidade descrita para maioria das cepas desse ST.

Um resultado interessante obtido no presente estudo foi a classificação de uma amostra isolada de espécime de urina como MDR, produtora de ESBL e carreadora do gene *bla_{CTX-M}* do grupo 2. Outros estudos reportaram previamente cepas dessa linhagem como MDR e carreadoras de genes de resistência (Yamaji *et al.*, 2018; Hojabri *et al.*, 2019; Birgy *et al.*, 2020; Muller *et al.*, 2021). Yamaji e colaboradores (2018) detectaram entre amostras de *E. coli* pertencentes a linhagem ST95, isoladas de espécimes de urina de indivíduos com ITU adquirida na comunidade, uma amostra carreadora do gene que codifica betalactamase *bla_{OXA}* (Yamaji *et al.*, 2018). Um estudo no Iran, com amostras isoladas nos anos de 2015 e 2016 de pacientes hospitalizados, detectou a linhagem ST95, em espécimes de urina, entre as principais da análise. Apesar da maioria das amostras dessa linhagem terem apresentado perfil de susceptíveis ou resistentes a no máximo duas classes de antimicrobianos, 5 amostras (33%) eram MDR e 7

(47%) foram classificadas como produtoras de ESBL. Além disso, foram detectados nessa linhagem também alguns genes de resistência codificadores de betalactamase, como por exemplo: *bla*_{OXA-48} (n=1/7%), *bla*_{TEM} (n=8/53%) e *bla*_{CTX-M} do grupo 1 (n=12/80%) e 9 (n=9/60%) (Hojabri *et al.*, 2019). Em um estudo com amostras isoladas de ITU de crianças em centros pediátricos na França de 2014 a 2017, foram detectadas amostras da linhagem *E. coli* ST95 portadoras de genes que codificam betalactamases do tipo CTX-M-15 (n=6/67%), CTX-M-14 (n=2/22%) e CTX-M-1 (n=1/11%) (Birgy *et al.*, 2020). Outro estudo também realizado na França identificou em amostras ST95 isoladas de espécimes clínicos de pacientes admitidos no Hospital Universitário Besançon esses mesmos genes. Foram detectados os genes *bla*_{CTX-M-14} (n=4) e *bla*_{CTX-M-15} (n=2) (Muller *et al.*, 2021). Genes de resistência foram identificados também em amostras do ST95 isoladas de pacientes com ICS admitidos em um hospital em San Francisco, EUA. Além de classificarem 8 amostras do ST95 (20%) como MDR, os autores detectaram uma amostra portadora de *bla*_{CTX-M-14} e outra de *bla*_{KPC-2} (Adams-Sapper *et al.*, 2013). Uma amostra dessa linhagem, pertencente a uma coleção de amostras isoladas de espécimes clínicos de pacientes de um hospital na França e um na Espanha, também foi classificada como MDR (Flament-Simon *et al.*, 2020). Esses dados evidenciam que apesar de ser uma linhagem cuja maioria das cepas é mais susceptível a antimicrobianos ao ser comparada com outras disseminadas, já foram identificadas diversas cepas de *E. coli* ST95 MDR ou que abrigam genes de resistência, como por exemplo genes codificadores de betalactamases.

Por fim, podemos concluir que a manutenção da prevalência dessa linhagem pandêmica, a sua diferente taxa de frequência em diversos locais e suas baixas taxas de resistência a antimicrobianos, possivelmente estão associadas a características biológicas intrínsecas, como um conjunto de fatores de virulência, que fornecem capacidade de competir, por exemplo, com outras linhagens de ExPEC. Outros fatores epidemiológicos associados a características socioeconômicas variáveis entre diferentes locais, como os apresentados anteriormente, provavelmente também contribuem para a disseminação desse ST no mundo com diferentes prevalências.

Futuras análises devem ser realizadas para melhor compreensão da disseminação e frequências de *E. coli* ST95. É importante o sequenciamento dos genes codificadores de betalactamases detectados na amostra classificada como MDR e produtora de ESBL. Assim, seria possível realizar uma descrição e comparação mais detalhada com dados previamente publicados em relação à presença desses genes nessa linhagem. Outro aspecto importante que tornaria o estudo ainda mais completo seria a investigação de fatores de virulência, como por exemplo o gene *fimH*, das amostras utilizadas no trabalho. A detecção desse gene e

identificação dos diferentes alelos permitiria verificar possíveis associações dos genótipos aos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos e comparar os resultados com correlações previamente traçadas. Um dado que também poderia ser analisado neste trabalho seria as alterações ou manutenção da prevalência do ST95 entre cepas isoladas de ICS, porém para isso seria necessária outra coleção de amostras de um período mais recente. Essas outras análises, somadas aos resultados obtidos no atual trabalho, permitiriam analisar de forma mais completa as amostras da linhagem ST95 no Rio de Janeiro.

7. CONCLUSÕES

Esse trabalho investigou a prevalência de amostras de *E. coli* do ST95 em coleções de UPEC provenientes de ITU e de amostras isoladas de ICS coletadas no Rio de Janeiro e também identificou características de resistência a antimicrobianos de amostras dessa linhagem. Os dados obtidos no estudo permitiram concluir que:

- A linhagem *E. coli* ST95 apresentou baixa prevalência em cada coleção analisada.
- Foi identificado um aumento significativo ($p < 0,05$) da frequência de ST95 na coleção de 2019.
- A maioria das amostras ST95 utilizadas nesse trabalho apresentam alta susceptibilidade aos antimicrobianos testados.
- Ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprim foram os antimicrobianos em que se observou maior número de amostras não-suscetíveis nas coleções de ITU.
- Na coleção de ICS detectou-se maior quantidade de amostras resistentes à ampicilina.
- Foi detectada uma amostra na coleção de ITU de 2019 classificada como MDR e produtora de ESBL.

Este é um entre os poucos trabalhos que citam ou investigam o ST95 no Brasil, especificamente no estado do Rio de Janeiro. Estudos como este são fundamentais para monitorar as cepas dessa e de outras linhagens de ExPEC capazes de causar diversas infecções. Esses trabalhos de análises epidemiológicas permitem estimar principalmente possíveis riscos à saúde pública.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd El-Baky, R. M., Ibrahim, R. A., Mohamed, D. S., Ahmed, E. F., & 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*, Volume 13, 1221–1236.
- Abe, K., Nomura, N., Suzuki, S. (2020). Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(5), fiae031.
- Adams-Sapper, S., Diep, B. A., Perdreau-Remington, F., Riley, L. W. (2013). Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and-resistant *Escherichia coli* isolates from bloodstream infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(1), 490-497.
- Akpaka, P. E., Swanson, W. H. (2008). Phenotypic detection and occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* at a tertiary hospital in Trinidad e Tobago. *Brazilian journal of infectious diseases*, 12(6), 516-520.
- Algoribi, M. F., Gibreel, T. M., Farnham, G., Al Johani, S. M., Balkhy, H. H., 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(10), 2757-2762.
- Aslantaş, Ö. (2019). High occurrence of CMY-2-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among broiler flocks in Turkey. *Tropical animal health and production*, 1-9.
- Banerjee, R., Johnson, J. R. (2014). A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(9), 4997-5004.
- Banerjee, R., Johnston, B., Lohse, C., Chattopadhyay, S., Tchesnokova, V., Sokurenko, E. V., Johnson, J. R. (2013). The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(12), 5912-5917.
- Bielaszewska, M., Daniel, O., Karch, H., Mellmann, A. (2020). Dissemination of the *bla*CTX-M-15 gene among Enterobacteriaceae via outer membrane vesicles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
- Birgy, A., Madhi, F., Jung, C., Levy, C., Cointe, A., Bidet, P., Hobson, C. A., Bechet, S., Sobral, E., Vuthien, H., Ferroni, A., Aberrane, S., Cuzon, G., Beraud, L., Gajdos, V., Launay, E., Pinquier, D., Haas, H., Desmarest, M., Dommergues, M. A., Cohen, R., Bonacorsi, S. (2020). 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*, 75(1), 96-105.]
- Blenkiron, C., Simonov, D., Muthukaruppan, A., Tsai, P., Dauros, P., Green, S., Hong, J., Print, C. G., Swift, S., Phillips, A. R. (2016). Uropathogenic *Escherichia coli* releases extracellular vesicles that are associated with RNA. *PLoS One*, 11(8), e0160440.
- Blount, Z. D. (2015). The natural history of model organisms: The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife*, 4, e05826.
- Bonomo, R. A. (2017). β -Lactamases: a focus on current challenges. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(1), a025239.
- Bower, J. M., Eto, D. S., Mulvey, M. A. (2005). Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic*, 6(1), 18-31.
- Bray, J. (1945). Isolation of Antigenically Homogeneous Strains of *Bact. coli neapolitanum* from Summer Diarrhoea of Infants. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 57(2), 239-47.
- Busch, A., Waksman, G. (2012). Chaperone–usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1592), 1112-1122.

- Calhau, V., Domingues, S., Ribeiro, G., Mendonça, N., Da Silva, G. J. (2015). Interplay between pathogenicity island carriage, resistance profile and plasmid acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 64(8), 828-835.
- Caljouw, M. A., den Elzen, W. P., Cools, H. J., Gussekloo, J. (2011). Predictive factors of urinary tract infections among the oldest old in the general population. A population-based prospective follow-up study. *BMC Medicine*, 9(1), 57.
- Campos, A. C. C., Andrade, N. L., Ferdous, M., Chlebowicz, M. A., Santos, C. C., Correal, J. C., Lo Ten Foe, J. R., Rosa, A. C. P., Damasco, P. V., Friedrich, A. W., Rossen, J. W. (2018). Comprehensive molecular characterization of *Escherichia coli* isolates from urine samples of hospitalized patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 9, 243.
- Chahales, P., Thanassi, D. G. (2017). Structure, function, and assembly of adhesive organelles by uropathogenic bacteria. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, 277-329.
- Chaudhuri, R. R., Henderson, I. R. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 214-226.
- Chen, X., Zou, Q., Zhang, W., Wang, R., Yu, F., Chen, Y. (2019). Clinical features and microbiological characteristics of hospital- and community-onset *Escherichia coli* bloodstream infection. *Journal of medical microbiology*, 68(2), 178-187.
- Chenoweth, C. E., Gould, C. V., Saint, S. (2014). Diagnosis, management, and prevention of catheter-associated urinary tract infections. *Infectious Disease Clinics*, 28(1), 105-119.
- Ciesielczuk, H., Betts, J., Phee, L., Doumith, M., Hope, R., Woodford, N., Wareham, D. W. (2015). Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. *Virulence*, 6(2), 145-151.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555-4558.
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, 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(1), 58-65.
- CLSI (2021). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.
- Cole, B. K., Ilikj, M., McCloskey, C. B., Chavez-Bueno, S. (2019). Antibiotic resistance and molecular characterization of bacteremia *Escherichia coli* isolates from newborns in the United States. *PloS one*, 14(7), e0219352.
- Collignon, P., Beggs, J. J., Walsh, T. R., Gandra, S., Laxminarayan, R. (2018). Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *The Lancet Planetary Health*, 2(9), e398-e405.
- Crick, F. H., Barnett, L., Brenner, S., Watts-Tobin, R. J. (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192(4809), 1227-1232.
- Croxen, M. A., Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 26-38.
- Cusumano, C. K., Hung, C. S., Chen, S. L., Hultgren, S. J. (2010). Virulence plasmid harbored by uropathogenic *Escherichia coli* functions in acute stages of pathogenesis. *Infection and Immunity*, 78(4), 1457-1467.

- Cyoia, P. S., Rodrigues, G. R., Nishio, E. K., Medeiros, L. P., Koga, V. L., Pereira, A. P. D., Vespero, E. C., Houle, S., Dozois, C. M., Nakazato, G., Kobayashi, R. K. (2015). Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(10), 1068-1075.
- Daga, A. P., Koga, V. L., de Matos, C. M., Perugini, M. R. E., Pelisson, M., Kobayashi, R. K. T., Vespero, E. C. (2019). *Escherichia coli* bloodstream infection in patients at a university hospital: virulence factors and clinical characteristics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 191.
- Dale, A. P., Woodford, N. (2015). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): disease, carriage and clones. *Journal of Infection*, 71(6), 615-626.
- de Araújo Longo, L. G. (2017). Investigação da relação entre virulência e resistência a Ciprofloxacina em amostras clínicas de *Escherichia coli*. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas: Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- De Kraker, M. E. A., Jarlier, V., Monen, J. C. M., Heuer, O. E., Van De Sande, N., Grundmann, H. (2013). The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(9), 860-868.
- de Souza da Silva, A. P., de Sousa, V. S., de Araújo Longo, L. G., Caldera, S., Baltazar, I. C. L., Bonelli, R. R., Santoro-Lopes, S., 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*, 104452.
- Dean A.G., Sullivan K.M., Soe M.M. (2013) OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. Disponível em www.OpenEpi.com,
- DebRoy, C., Sidhu, M. S., Sarker, U., Jayarao, B. M., Stell, A. L., Bell, N. P., Johnson, T. J. (2010). Complete sequence of pEC14_114, a highly conserved IncFIB/FIIA plasmid associated with uropathogenic *Escherichia coli* cystitis strains. *Plasmid*, 63(1), 53-60.
- Dhakal, B. K., Kulesus, R. R., Mulvey, M. A. (2008). Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *European Journal of Clinical Investigation*, 38, 2-11.
- Dias, R. C., Marangoni, D. V., Smith, S. P., Alves, E. M., Pellegrino, F. L., Riley, L. W., Moreira, B. M. (2009). Clonal composition of *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infections in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Microbial Drug Resistance*, 15(4), 303-308.
- Dias, R. C., Moreira, B. M., 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(2), 483-488.
- Diekema, D. J., Hsueh, P. R., Mendes, R. E., Pfaller, M. A., Rolston, K. V., Sader, H. S., Jones, R. N. (2019). The microbiology of bloodstream infection: 20-year trends from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(7).
- Domingues, S., Nielsen, K. M. (2017). Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 16-21.
- Doumith, M., Day, M., Ciesielczuk, H., Hope, R., Underwood, A., Reynolds, R., Wain, J., Livermore, D. M., Woodford, N. (2015). Rapid identification of major *Escherichia coli* sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(1), 160-166.
- Ellaby, N., Doumith, M., Hopkins, K. L., Woodford, N., Ellington, M. J. (2019). Emergence of diversity in carbapenemase-producing *Escherichia coli* ST131, England, January 2014 to June 2016. *Eurosurveillance*, 24(37), 1800627.

- Escherich, T. (1988). The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. *Clinical Infectious Diseases*, 10(6), 1220-1225.
- Faccone, D., Moredo, F. A., Giacoboni, G. I., Albornoz, E., Alarcón, L., Nievas, V. F., Corso, A. (2019). Multidrug-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and *blaCTX-M* genes isolated from swine in Argentina. *Journal of global antimicrobial resistance*, 18, 160-162.4
- Fibke, C. D., Croxen, M. A., Geum, H. M., Glass, M., Wong, E., Avery, B. P., Daignault, D., Mulvey, M. R., Reid-Smith, R. J., Parmley, E. J., Portt, A., Boerlin, P., Manges, A. R. (2019, November). Genomic epidemiology of major extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* lineages causing urinary tract infections in young women across Canada. In *Open forum infectious diseases* (Vol. 6, No. 11, p. ofz431). US: Oxford University Press.
- Flament-Simon, S. C., García, V., Duprilot, M., Mayer, N., Alonso, M. P., García-Meniño, I., Blanco, J., Blanco, M., Nicolas-Chanoine, M. H., Blanco, J. (2020). High Prevalence of ST131 Subclades C2-H30Rx and C1-M27 Among Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Causing Human Extraintestinal Infections in Patients From Two Hospitals of Spain and France During 2015. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 125.
- 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., 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(4), 161.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 269-284.
- Forde, B. M., Zowawi, H. M., Harris, P. N., Roberts, L., Ibrahim, E., Shaikh, N., Deshmukh, A., Ahmed, M. A. S., Maslamani, M. A., Cottrell, K., Trembizki, E., Sundac, L., Yu, H. H., Li, J., Schembri, M. A., Whiley, D. M., Paterson, D. L., Beatson, S. A. (2018). Discovery of *mcr-1*-mediated colistin resistance in a highly virulent *Escherichia coli* lineage. *Msphere*, 3(5).
- Foxman, B. (2002). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *The American Journal of Medicine*, 113(1), 5-13.
- Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*, 7(12), 653-660.
- Foxman, B. (2013). Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infectious disease clinics of North America*, 28(1), 1-13.
- Foxman, B., Brown, P. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infectious disease clinics of North America*, 17(2), 227.
- Fröding, I., Hasan, B., Sylvén, I., Coorens, M., Naucélér, P., Giske, C. G. (2020). Extended-Spectrum β -Lactamase-and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* causing community-onset bloodstream infection: the association of bacterial clones and virulence genes with septic shock, source of infection and recurrences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Gagliotti, C., Balode, A., Baquero, F., Degener, J., Grundmann, H., Gür, D., Jarlier, V., Kahlmeter, G., Monen, J., Monnet, D L., Rossolini, G M., Suetens, C., Weist, K., Heuer, O. (2011). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS), 2002 to 2009. *Eurosurveillance*, 16(11), 19819.
- Ge, X. Z., Jiang, J., Pan, Z., Hu, L., Wang, S., Wang, H., Leung, F. C., Dai, J., Fan, H. (2014). Comparative genomic analysis shows that avian pathogenic *Escherichia coli* isolate IMT5155 (O2: K1: H5; ST complex 95, ST140) shares close relationship with ST95 APEC O1: K1 and human ExPEC O18: K1 strains. *PLoS One*, 9(11), e112048.

- Ghazvini, H., Taheri, K., Edalati, E., Miri, A., Sedighi, M., MIRKALANTARI, S. (2019). Virulence factors and antimicrobial resistance in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from cystitis and pyelonephritis. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 49(1), 361-367.
- Gibreel, T. M., Dodgson, A. R., Cheesbrough, J., Fox, A. J., Bolton, F. J., Upton, M. (2012). Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(2), 346-356.
- Gomi, R., Matsuda, T., Matsumura, Y., Yamamoto, M., Tanaka, M., Ichiyama, S., Yoneda, M. (2017). Whole-genome analysis of antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in river water. *Applied and environmental microbiology*, 83(5).
- Gordon, D. M., Clermont, O., Tolley, H., Denamur, E. (2008). Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2484-2496.
- Gordon, D. M., Geyik, S., Clermont, O., O'Brien, C. L., Huang, S., Abayasekara, C., Rajesh, A., Kennedy, K., Collignon, P., Pavli, P., Rodriguez, C., Johnston, B. D., Johnson, J. R., Decousser, J. W., Denamur, E. (2017). Fine-scale structure analysis shows epidemic patterns of clonal complex 95, a cosmopolitan *Escherichia coli* lineage responsible for extraintestinal infection. *MSphere*, 2(3).
- GTDB 2020. Disponível em: <https://gtdb.ecogenomic.org/tree>. Acesso em: 18/08/2020.
- Hannan, T. J., Totsika, M., Mansfield, K. J., Moore, K. H., Schembri, M. A., Hultgren, S. J. (2012). Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS microbiology reviews*, 36(3), 616-648.
- Haq, K. U., Noreen, S., Sehgal, S. A., Tahir, R. A., Essa, A., Ihsan, A., Siraj, S. (2020). Association of Virulence Genes with Antibiotic Resistance in Pakistani Uropathogenic *E. coli* Isolates. *Combinatorial Chemistry & High throughput screening*, 23, 0-0.
- Harding, G. K. M., Ronald, A. R. (1994). The management of urinary infections; what have we learned in the past decade?. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 4(2), 83-88.
- Hofer, U. (2019). The cost of antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), 3-3.
- Hojabri, Z., Mirmohammadkhani, M., Darabi, N., Arab, M., 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.
- Hojati, Z., Molaie, R., Gholipour, A. (2015). The *FimH* Gene in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated From Patient With Urinary Tract Infection. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(2), S1.
- Holland, M. S., Nobrega, D., Peirano, G., Naugler, C., Church, D. L., Pitout, J. D. D. (2020). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing bloodstream infections in a centralized Canadian region: a population-based surveillance study. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(11), 1554-e1.
- Hooton, T. M. (2012). Uncomplicated urinary tract infection. *New England Journal of Medicine*, 366(11), 1028-1037.
- Horner, C., Fawley, W., Morris, K., Parnell, P., Denton, M., Wilcox, M. (2014). *Escherichia coli* bacteraemia: 2 years of prospective regional surveillance (2010–12). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(1), 91-100.
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570-581.
- Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Clinical Infectious Diseases*, 10(4), 867-878.

Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 80-128.

Johnson, J. R., Goulet, P. H., Picard, B., Moseley, S. L., Roberts, P. L., Stamm, W. E. (1991). Association of carboxylesterase B electrophoretic pattern with presence and expression of urovirulence factor determinants and antimicrobial resistance among strains of *Escherichia coli* that cause urosepsis. *Infection and Immunity*, 59(7), 2311-2315.

Johnson, J. R., Russo, T. A. (2002). Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(6), 859-864.

Johnson, J. R., 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(1), 261-272.

Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Johnston, B., Clabots, C., Roberts, P. L., Billig, M., Riddell K, Rogers P, Qin X, Butler-Wu S, Price LB, Aziz M, Nicolas-Chanoine M-H, Debroy C, Robicsek A, Hansen G, Urban C, Platell J, Trott DJ, Zhanel G, Weissman SJ, Cookson BT, Fang FC, Limaye AP, Scholes D, Chattopadhyay S, Hooper DC, Sokurenko EV. (2013). Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, 207(6), 919-928.

Jørgensen, S. L., Stegger, M., Kudirkiene, E., Lilje, B., Poulsen, L. L., Ronco, T., Dos Santos, T. P., Kiil, K., Bisgaard, M., Pedersen, K., Nolan, L. K., Price, L. B., Olsen, R. H., Andersen, P. S., Christensen, H. (2019). Diversity and population overlap between avian and human *Escherichia coli* belonging to sequence type 95. *Msphere*, 4(1).

Juhas, M. (2015). Horizontal gene transfer in human pathogens. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(1), 101-108.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140.

Khairy, R. M., Mohamed, E. S., Abdel Ghany, H. M., Abdelrahim, S. S. (2019). Phylogenic classification and virulence genes profiles of uropathogenic *E. coli* and diarrhegenic *E. coli* strains isolated from community acquired infections. *PLoS One*, 14(9), e0222441.

Kim, S. W., Park, S. B., Im, S. P., Lee, J. S., Jung, J. W., Gong, T. W., Lazarte, J. M. S., Kim, J., Seo, J., Kim, J. H., Jung, H. S., Kim, G. J., Lee, Y. J., Lim, S. K., Jung, T. S. Song, J. W. (2018). Outer membrane vesicles from β -lactam-resistant *Escherichia coli* enable the survival of β -lactam-susceptible *E. coli* in the presence of β -lactam antibiotics. *Scientific Reports*, 8(1), 1-13.

Kolling, G. L., Matthews, K. R. (1999). Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 1843-1848.

Laupland, K. B. (2013). Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(6), 492-500.

Laupland, K. B., Church, D. L. (2014). Population-based epidemiology and microbiology of community-onset bloodstream infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 647-664.

Logue, C. M., Doetkott, C., Mangiamele, P., Wannemuehler, Y. M., Johnson, T. J., Tivendale, K. A., Sherwood, J. S., Li, G., Nolan, L. K. (2012). Genotypic and phenotypic traits that distinguish neonatal meningitis-associated *Escherichia coli* from fecal *E. coli* isolates of healthy human hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5824-5830.

Lüthje, P., Brauner, A. (2014). Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 65, pp. 337-372). Academic Press.

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., Monnet, D. T. (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(3), 268-281.
- Maiden, M. C., 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., 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(6), 3140-3145.
- Malekzadegan, Y., Khashei, R., Ebrahim-Saraie, H. S., Jahanabadi, Z. (2018). Distribution of virulence genes and their association with antimicrobial resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Iranian patients. *BMC infectious diseases*, 18(1), 572.
- Manges, A. R. (2016). *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 122-129.
- Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D., Pitout, J. D. (2019). Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(3).
- Matsui, Y., Hu, Y., Rubin, J., de Assis, R. S., Suh, J., Riley, L. W. (2020). Multilocus sequence typing of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infection patients and from fecal samples of healthy subjects in a college community. *MicrobiologyOpen*, e1032.
- Matsukawa, M., Igarashi, M., Watanabe, H., Qin, L., Ohnishi, M., Terajima, J., Iyoda, S., Morita-Ishihara, T., Tateda, K., Ishii, Y., Saga, T., Aoki, K., Bonomo, R. A. (2019). Epidemiology and genotypic characterisation of dissemination patterns of uropathogenic *Escherichia coli* in a community. *Epidemiology & Infection*, 147.
- Mazumder, R., Abdullah, A., Ahmed, D., Hussain, A. (2020). High Prevalence of *bla*CTX-M-15 Gene among Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates Causing Extraintestinal Infections in Bangladesh. *Antibiotics*, 9(11), 796.
- McEwen, S. A., Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial resistance: a onehealth perspective. *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*, 521-547.
- Miajlovic, H., Smith, S. G. (2014). Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiology Letters*, 354(1), 1-9.
- Micenková, L., Beňová, A., Frankovičová, L., Bosák, J., Vrba, M., Ševčíková, A., Kmeťová, M., Šmajš, D. (2017). Human *Escherichia coli* isolates from hemocultures: Septicemia linked to urogenital tract infections is caused by isolates harboring more virulence genes than bacteraemia linked to other conditions. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(3), 182-189.
- Mora, A., Viso, S., López, C., Alonso, M. P., García-Garrote, F., Dabhi, G., Mamani, R., Herrera, A., Marzoa, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Moulin-Schouleur, M., Schouler, C., Blanco, J. (2013). Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45: K1: H7-B2-ST95 in humans. *Veterinary Microbiology*, 167(3-4), 506-512.
- Mora-Rillo, M., Fernández-Romero, N., Navarro-San Francisco, C., Díez-Sebastián, J., Romero-Gómez, M. P., Arnalich Fernández, F., López, J. R. A., Mingorance, J. (2015). Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. *Virulence*, 6(1), 93-100.
- Muller, A., Gbaguidi-Haore, H., Cholley, P., Hocquet, D., Sauget, M., Bertrand, X. (2021). Hospital-diagnosed infections with *Escherichia coli* clonal group ST131 are mostly acquired in the community. *Scientific Reports*, 11(1), 1-6.
- Müller, A., Stephan, R., Nüesch-Inderbilen, M. (2016). Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Science of the Total Environment*, 541, 667-672.

- Munita, J. M., Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 481-511.
- Nadimpalli, M. L., Marks, S. J., Montealegre, M. C., Gilman, R. H., Pajuelo, M. J., Saito, M., Tsukayama, P., Njenga, S. M., Kiiru, J., Swarthout, J., Islam, M. A., Julian, T. R., Pickering, A. J. (2020). Urban informal settlements as hotspots of antimicrobial resistance and the need to curb environmental transmission. *Nature microbiology*, 5(6), 787-795.
- Nicolas-Chanoine, M. H., Bertrand, X., Madec, J. Y. (2014). *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 543-574.
- Nüesch-Inderbinen, M. T., Baschera, M., Zurfluh, K., Hächler, H., Nüesch, H., 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, 2334.
- OPAS (2017). Folha informativa – Resistência aos antibióticos. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5664:folha-informativa-resistencia-aos-antibioticos&Itemid=812. Acesso em: 18/08/2020.
- Otto, A., Biran, D., Sura, T., Becher, D., Ron, E. Z. (2016). Proteomics of septicemic *Escherichia coli*. *PROTEOMICS–Clinical Applications*, 10(9-10), 1020-1024.
- Paitan, Y. (2018). Current trends in antimicrobial resistance of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli, a Versatile Pathogen* (pp. 181-211). Springer, Cham.
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J., Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity*, 67(2), 546-553.
- Pitout, J. D., DeVinney, R. (2017). *Escherichia coli* ST131: a multidrug-resistant clone primed for global domination. *F1000Research*, 6.
- Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*, 289-316.
- Poulsen, L. K., Lan, F., Kristensen, C. S., Hobolth, P., Molin, S., Krogfelt, K. A. (1994). Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization. *Infection and immunity*, 62(11), 5191-5194.
- Qureshi, Z. A., Doi, Y. (2014). *Escherichia coli* sequence type 131: epidemiology and challenges in treatment. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12(5), 597-609.
- Ramay, B. M., Caudell, M. A., Cerdón-Rosales, C., Archila, L. D., Palmer, G. H., Jarquin, C., Moreno, P., McCracken, J. P., Rosenkrantz, L., Amram, O., Omulo, S., Call, D. R. (2020). Antibiotic use and hygiene interact to influence the distribution of antimicrobial-resistant bacteria in low-income communities in Guatemala. *Scientific reports*, 10(1), 1-10.
- Reina Yamaji, Cindy R. Friedman, Julia Rubin, Joy Suh, Erika Thys, Patrick McDermott, Melody Hung-Fan, Lee W. Riley
- Riley, L. W. (2014). Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(5), 380-390.
- Ruben, F. L., Dearwater, S. R., Norden, C. W., Kuller, L. H., Gartner, K., Shalley, A., Warshafsky, G., Kelsey, S. F., O'Donnell, D., Means, E., Amoroso, W., Bochicchio, G. (1995). Clinical infections in the noninstitutionalized geriatric age group: methods utilized and incidence of infections: The Pittsburgh Good Health Study. *American journal of epidemiology*, 141(2), 145-157.

- Russo, T. A., Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1753-1754.
- Russo, T. A., Johnson, J. R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, 5(5), 449-456.
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiaczcyk, M., Bugla-Ploskonska, G., Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens*, 11(1), 10.
- Schlackow, I., Stoesser, N., Walker, A. S., Crook, D. W., Peto, T. E., Wyllie, D. H. (2012). Increasing incidence of *Escherichia coli* bacteraemia is driven by an increase in antibiotic-resistant isolates: electronic database study in Oxfordshire 1999–2011. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(6), 1514-1524.
- Schwan, W. R. (2011). Regulation of fim genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *World Journal of Clinical Infectious Diseases*, 1(1), 17.
- Secher, T., Brehin, C., Oswald, E. (2016). Early settlers: which *E. coli* strains do you not want at birth?. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 311(1), G123-G129.
- Selander, R. K., Musser, J. M., Caugant, D. A., Gilmour, M. N., Whittam, T. S. (1987). Population genetics of pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 3(1), 1-7.
- Shah, C., Baral, R., Bartaula, B., Shrestha, L. B. (2019). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC Microbiology*, 19(1), 204.
- Shaik, S., Ranjan, A., Tiwari, S. K., Hussain, A., Nandanwar, N., Kumar, N., Jadhav, S., Semmler, T., Baddam, R., Islam, M. A., Alam, M., Wieler, L. H., Watanabe, H., Ahmed, N. (2017). Comparative genomic analysis of globally dominant ST131 clone with other epidemiologically successful extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. *MBio*, 8(5).
- Shulman, S. T., Friedmann, H. C., Sims, R. H. (2007). Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician?. *Clinical Infectious Diseases*, 45(8), 1025-1029.
- Spaulding, C. N., Klein, R. D., Ruer, S., Kau, A. L., Schreiber, H. L., Cusumano, Z. T., Dodson, K. W., Pinkner, J. S., Fremont, D. H., Janetka, J. W., Remaut, H., Gordon, J. I., Hultgren, S. J. (2017). Selective depletion of uropathogenic *E. coli* from the gut by a *FimH* antagonist. *Nature*, 546(7659), 528-532.
- Stamm, W. E., & Norrby, S. R. (2001). Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(Supplement_1), S1-S4.
- Stephens, C. M., Adams-Sapper, S., Sekhon, M., Johnson, J. R., Riley, L. W. (2017). Genomic analysis of factors associated with low prevalence of antibiotic resistance in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* sequence type 95 strains. *MSphere*, 2(2).
- Strockbine, N. A., Bopp, C. A., Fields, P. I., Kaper, J. B., Nataro, J. P. (2015). *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition (pp. 685-713). American Society of Microbiology.
- Subashchandrabose, S., Mobley, H. L. (2017). Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, 235-261.
- Tarlton, N. J., Moritz, C., Adams-Sapper, S., 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.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207-217.

Tivendale, K. A., Logue, C. M., Kariyawasam, S., Jordan, D., Hussein, A., Li, G., Wannemuehler, Y., Nolan, L. K. (2010). Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infection and immunity*, 78(8), 3412-3419.

Trata Brasil (2018). Painel saneamento Brasil. Disponível em:
<https://www.painelsaneamento.org.br/localidade?id=33> Acesso em: 05/04/21.

Vila J, Saez Lopez E, Johnson JR, Romling U, Dobrindt U, Canton R, Giske CG, Naas T, Carattoli A, MartinezMedina M, Bosch J, Retamar P, Rodriguez Bano J, Baquero F, Soto SM. (2016). *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 437-463.

Wang, X. R., Chen, J. C., Yu, K. A. N. G., Jiang, N., An, S. C., Gao, Z. C. (2012). Prevalence and characterization of plasmid-mediated *bla* ESBL with their genetic environment in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in patients with pneumonia. *Chinese medical journal*, 125(5), 894-900.

Wang, X., Kong, N., Cao, M., Zhang, L., Sun, M., Wei, Q., Liu, W. (2019). Characterization of beta-lactamases in bloodstream-infection *Escherichia coli*: Dissemination of *bla*ADC-162 and *bla*CMY-2 among bacteria via an IncF plasmid. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2175.

Wijetunge, D. S. S., Karunathilake, K. H. E. M., Chaudhari, A., Katani, R., Dudley, E. G., Kapur, V., DebRoy, C., Kariyawasam, S. (2014). Complete nucleotide sequence of pRS218, a large virulence plasmid, that augments pathogenic potential of meningitis-associated *Escherichia coli* strain RS218. *BMC Microbiology*, 14(1), 203.

Xiao, T., Wu, Z., Shi, Q., Zhang, X., Zhou, Y., Yu, X., Xiao, Y. (2019). A retrospective analysis of risk factors and outcomes in patients with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bloodstream infections. *Journal of global antimicrobial resistance*, 17, 147-156.

Yamaji, R., Friedman, C. R., Rubin, J., Suh, J., Thys, E., McDermott, P., Hung-Fan, M., Riley, L. W. (2018). A population-based surveillance study of shared genotypes of *Escherichia coli* isolates from retail meat and suspected cases of urinary tract infections. *mSphere*, 3(4).

Yamaji, R., Rubin, J., Thys, E., Friedman, C. R., Riley, L. W. (2018). Persistent pandemic lineages of uropathogenic *Escherichia coli* in a college community from 1999 to 2017. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(4).

Yun, K. W., Do Soo Kim, W. K., Lim, I. S. (2015). Molecular typing of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Korean children with urinary tract infection. *Korean journal of pediatrics*, 58(1), 20.

Zhi, S., Stothard, P., Banting, G., Scott, C., Huntley, K., Ryu, K., Otto, S., Ashbolt, N., Checkley, S., Dong, T., Ruecker, N. J., Neumann, N. F. (2020). Characterization of water treatment-resistant and multidrug-resistant urinary pathogenic *Escherichia coli* in treated wastewater. *Water Research*, 182, 115827.