



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde

NAIADY KONNO MADELA PORTO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
LINHAGENS DE *Escherichia Coli*
RESISTENTES A β -LACTÂMICOS
ISOLADAS DE PACIENTES COM INFECÇÃO
DO TRATO URINÁRIO

São José do Rio Preto
2019

Naiady Konno Madela Porto

Caracterização Molecular de Linhagens de
Escherichia Coli Resistentes aos β -Lactâmicos
Isoladas de Pacientes com Infecção do Trato
Urinário

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de São José do Rio Preto para obtenção do Título
de Mestre no Curso de Pós Graduação em Ciências
da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências
Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Mara Corrêa Lelles
Nogueira

Co-orientador: Prof. Dr. Tiago Casella

São José do Rio Preto
2019

Porto, Naiady Konno Madela

Caracterização Molecular de Linhagens De *Escherichia Coli*
Resistentes aos β -Lactâmicos Isoladas de Pacientes com Infecção do
Trato Urinário

São José Do Rio Preto, 2019

71p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio
Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Mara Corrêa Lelles Nogueira

Co-orientador: Prof. Dr. Tiago Casella

Escherichia coli, Infecção do Trato Urinário, Tipagem Molecular,
Beta Lactamase de Espectro Estendido.

NAIADY KONNO MADELA PORTO

Caracterização Molecular de Linhagens de
Escherichia Coli Resistentes aos β -Lactâmicos
Isoladas de Pacientes com Infecção do Trato
Urinário

BANCA EXAMINADORA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Mara Corrêa
Lelles Nogueira

Co-orientador: Prof. Dr. Tiago Casella

2º Examinador: Profa. Dra. Carolina Colombelli
Pacca Mazaro

3º Examinador: Profa. Dra. Alice Freitas Versiani

Suplentes: Profa. Dra. Ana Carolina Bernardes
Terzian

Dra. Fernanda Modesto Tolentino
Binhardi

São José do Rio Preto, 12/07/2019

SUMÁRIO

1. DEDICATÓRIA.....	i
2. AGRADECIMENTOS.....	ii
3. LISTA DE FIGURAS.....	iii
4. LISTA DE TABELAS.....	v
5. LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vi
6. RESUMO.....	ix
7. ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 <i>Escherichia coli</i>	4
2.2 Beta-Lactâmicos.....	5
2.2.1 Resistência aos beta-lactâmicos em <i>E. coli</i> : importância das ESBL tipo CTX-M.....	6
2.3 Tipagem molecular.....	8
2.4 Fatores de Virulência.....	9
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivos Gerais.....	12
3.2 Objetivos Específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Isolados de <i>E. coli</i>	13
4.2 Detecção e identificação dos genes de resistência.....	14
4.2.1 Extração de DNA total e plasmidial.....	14
4.2.2 Detecção dos genes de ESBL.....	15
4.3 Detecção de genes de virulência.....	16
4.4 Determinação do grupo filogenético.....	18
4.5 Purificação dos amplicons.....	19
4.6 Tipagem Molecular.....	20
4.6.1 PFGE.....	20
4.6.2 MLST.....	20
5. RESULTADOS.....	23
5.1 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	23
5.2 Genes de ESBL.....	24
5.3 Grupos filogenéticos.....	25
5.4 Genes de virulência.....	25
5.5 PFGE.....	27
5.6 MLST.....	29
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÕES.....	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ANEXOS.....	53

*Dedico esse trabalho à minha pequena Flor: Liz
Luz da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Esta fase da minha vida é muito especial e não posso deixar de agradecer a Deus por toda força, ânimo e coragem que me ofereceu para ter alcançado minha meta. Agradecer por Ele ter colocado na minha vida a luz pra me guiar, minha Liz.

A todo o pessoal dos laboratórios: Centro de Investigação de Microrganismos, de Microbiologia e de Virologia quero deixar uma palavra de gratidão por terem me recebido de braços abertos e com todas as condições que me proporcionaram dias de aprendizagem muito ricos.

Aos meus queridos amigos e orientadores Profa. Dra. Mara e Prof. Dr. Tiago reconheço um esforço gigante com muita paciência e sabedoria. Foram eles que me deram recursos e ferramentas para evoluir um pouco mais todos os dias.

É claro que não posso me esquecer da minha família, em especial, aos meus pais, porque foram eles que me incentivaram e inspiraram através de gestos e palavras a superar todas as dificuldades.

Ao meu querido João, companheiro de vida!

Aos meus amigos pelos momentos de alegrias, pelo companheirismo e pela lealdade.

Aos Professores e à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por contribuírem para meu conhecimento.

À agência CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e a FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro.

À todas as pessoas que de uma alguma forma me ajudaram a acreditar em mim; quero lhes deixar um agradecimento eterno, porque sem elas não teria sido possível.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ação dos β -lactâmicos.....	06
Figura 2. Esquema de interpretação do grupo filogenético.....	19
Figura 3. Proporção de isolados quanto à suscetibilidade a cada um dos antimicrobianos testados. AMC = amoxicilina/ácido clavulânico, TZP = piperacilina/tazobactam AMP = ampicilina, KF = cefalotina, CAZ = ceftazidima, CRO = ceftriaxona, FEP = cefepima, ETP = ertapenem, IPM = imipenem, MER = meropenem, CIP = ciprofloxacina, NOR = norfloxacina, FOS = fosfomicina, STX = sulfá/ trimetoprim, NTF = nitrofurantoína, AK = amicacina, CM = gentamicina.....	24
Figura 4. Distribuição proporcional das variantes do gene <i>bla</i> _{CTX-M} dentre as 61 <i>E. coli</i> isoladas de ITU.....	24
Figura 5. Distribuição dos isolados de <i>E. coli</i> entre os principais grupos filogenéticos.....	25
Figura 6. Genes de virulência detectados nos isolados de <i>E. coli</i> , separados, por cor, de acordo com o tipo de cada função. Azul: adesinas. Vermelha: síntese de cápsula do tipo II. Verde: toxinas. Roxa: receptores de sideróforos. Laranja: proteína específica de UPEC. Azul claro: resistência ao soro. Cinza: proteína de membrana externa.....	26
Figura 7. Características de virulência, de acordo com os genótipos, detectadas nos isolados de <i>E. coli</i> . A: adesina; S: receptores de sideróforos; I: proteína Iss de resistência ao soro; T: toxina; C: produção de cápsula; U: proteína Usp específica de UPEC; O: componente protéico OmpT de membrana externa.....	26
Figura 8. Dendrograma de similaridade genética entre os isolados de <i>E. coli</i> após restrição do genoma com enzima <i>Xba</i> I seguida de PFGE.....	28

Figura 9. Distribuição dos 58 isolados tipados por MLST entre as linhagens ST detectadas.....	29
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. *Primers* de beta-lactamases utilizados neste estudo.....16

Tabela 2. *Primers* de virulência utilizados neste estudo.....18

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Afa: Adesinas não fimbriais

AK: Amicacina

AMC: Amoxaxilina com ácido clavulânico

AMP: Ampicilina

BEL- Belgium ESBLs

BES- Brazilian ESBLs

BHI: Brain Heart Infusion

°C: Graus Censius

CAZ: Ceftazidima

CC: Complexo clonal

Cdt: citolethal distending toxin

CIM: Centro de Investigação de Microrganismos

CIP: Ciprofloxacina

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CN: Gentamicina

CNF1: fator necrotizante citotóxico a toxina

CPS: Ágar cromogênico

CRO: Cetriaxona

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxynucleoside Triphosphate

E. coli: *Escherichia coli*

EAEC: *E. coli* Enteroagregativa

EHEC: *E. coli* Enterohemorrágica

EIEC: *E. coli* Enteroinvasiva

ETEC: *E. coli* Enterotoxigênica

ETP: Ertapenem

ESBL: Beta-Lactamases de Espectro Estendido

ExPEC: *E. coli* Patogênica Extra Intestinais

FEP: Cefepima

FOS: Fosfomicina

G: Força gravitacional

GES- Guyana ESBLs

HLyA: α -hemolisina

HB: Hospital de Base

IPM: Imipenem

ITUs: Infecções Do Trato Urinário

KF: Cefalotina

LC-HB: Laboratório Central do Hospital de Base de São José do Rio Preto

LPS: Lipopolissacarídeo

MER: Meropenem

mL – mililitros

MLST: Multilocus Sequence Typing

mM: Mili molar

NAM: ácido N-acetilmurânico

NAG: N-acetilglicosamina

NMEC: Meningite no Recém Nascido

NOR: Norfloxaxina

NTF: Nitrofurantoína

pb – pares de base

PBPs: proteínas ligadoras de penicilina

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PER- Pseudomonas Extended Resistance

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

Sat: secreted autotransporter toxin

SePEC: *E. coli* associada a Septicemias

SHV- Sulphhydryl Variable

SFO- *Serratia fonticola*

SPATE: Serine proteases autotransporters of Enterobacteriaceae

ST: Sequence Type

STX: Sulfa/ Trimetoprim

TBE: Tris/Borate/EDTA

TEM- **Tem**oriana (paciente grega da qual foi isolada o primeiro microrganismo com essa beta-lactamase)

TGI: Trato Gastrointestinal

TLA- **Tl**ahuicas (Indian tribe)

TZP: Piperacilina/Tazobactam

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

UPEC: *Escherichia coli* Uropatogênica

µL – microlitros

V/cm – voltagem total dividida pela distância, em centímetros, entre os eletrodos

Vat: vacuolating autotransporter toxina

RESUMO

Introdução. As infecções do trato urinário (ITU) devido à *Escherichia coli* uropatogênica resistente a beta-lactâmicos são um importante problema de saúde pública. A falha do tratamento pode resultar na progressão para condições graves com insuficiência renal, sepse e morte. **Objetivos.** No presente trabalho, propomos realizar a avaliação de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de terceira geração isoladas de pacientes com ITU. Além de investigar e comparar perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, os genes responsáveis pela produção de ESBL e a diversidade de genes de virulência. Estas bactérias foram também comparadas quanto ao grupo filogenético e similaridade genética usando-se a tipagem molecular por análise do perfil de macrorrestrição do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE) e sequenciamento de multilocus (MLST). **Material e Métodos.** Neste estudo, cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de terceira geração isoladas de pacientes com ITU foram investigadas e comparadas quanto à diversidade de genes responsáveis pela produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), genes de virulência e grupo filogenético. Além disso, foram submetidos à tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado (PFGE) e sequenciamento multilocus (MLST). **Resultados.** Variantes do gene *bla*_{CTX-M} foram detectadas em todas as 61 *E. coli* produtoras de ESBL. O gene *bla*_{CTX-M-15} foi identificado em 37 isolados, *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{CTX-M-9} em sete cada um, *bla*_{CTX-M-14} em cinco, *bla*_{CTX-M-2} em três, e os genes *bla*_{CTX-M-3} e *bla*_{CTX-M-55}, cada um em um isolado. 29 *E. coli* foram identificados do grupo B2, 17 do grupo A, 10 do grupo D e cinco do grupo B1. Dentre os 26 genes de virulência investigados, 17 foram detectados em diferentes combinações e distribuídos em *E. coli* de todos os filogrupos. Uma ampla diversidade genética foi observada, e a porcentagem de similaridade entre as linhagens variou entre 51,1,1% e 100%. A tipagem por MLST foi realizada nas 58 dos isolados incluídos neste estudo. Destes, 27 (46,5%) foram identificados como ST/CC 131/131, nove (15,5%) como ST/CC 90/23, seis (10,3%) como ST/CC 405/405, duas (3,4%) como ST/CC 10/10, ST224, ST/CC 617/10 ou ST 2851, e os demais isolados foram identificados como ST/CC 57/350, ST/CC 155/155, ST/CC 354/354, ST/CC 648/648, ST 1177, ST 1284, ST 2208 ou ST 8022, com um (1,7%) representante cada linhagem. **Conclusões.** Os resultados do presente estudo permitem concluir que a presença de *E. coli* produtoras de ESBL e resistentes a fluoroquinolonas está, principalmente, relacionada à microbiota de cada paciente. Também, as linhagens encontradas em São José do Rio Preto são as mesmas distribuídas em todo o mundo carreadoras dos mesmos genes *bla*_{CTX-M} e potenciais causadoras de ITU ou distribuídas em alimentos ou como comensais de animais, demonstrando sua ampla disseminação e facilidade de aquisição.

PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia coli*, Infecção do Trato Urinário, Tipagem Molecular, Beta Lactamase de Espectro Estendido.

ABSTRACT

Introduction. Urinary tract infections (UTIs) due to beta-lactam-resistant uropathogenic *Escherichia coli* are an important public health problem, as those are the main recommended antimicrobials. Treatment failure may result in progression to severe conditions with renal failure, sepsis and death. **Objective.** In the present work, we propose to evaluate third generation cephalosporin resistant *E. coli* isolated from UTI patients. In addition to investigating and comparing antimicrobial susceptibility profile, the genes responsible for ESBL production and virulence gene diversity. These bacteria were also compared for phylogenetic group and genetic similarity using molecular typing by analysis of chromosomal DNA macrorestriction profile after pulsed field electrophoresis (PFGE) and multilocus sequencing (MLST). **Material and methods.** In this study, strains of *E. coli* resistant to third generation cephalosporins isolated from patients with UTI were investigated and compared for the diversity of genes responsible for the production of extended spectrum beta-lactamase (ESBL), virulence genes and phylogenetic group. In addition, they were submitted to molecular typing by pulsed field electrophoresis (PFGE) and multilocus sequencing (MLST). **Results.** Variants of the *bla*CTX-M gene were detected in all ESBL producing *E. coli*. The *bla*CTX-M-15 gene was identified in 37 isolates, *bla*CTX-M-8 and *bla*CTX-M-9 in seven each, *bla*CTX-M-14 in five, *bla*CTX-M-2 in three, and *bla*CTX-M-3 and *bla*CTX-M-55, each in an isolate. 29 *E. coli* were identified from group B2, 17 from group A, 10 from group D and five from group B1. Among the 26 virulence genes investigated, 17 were detected in different combinations and distributed in *E. coli* of all the phylogroups. A wide genetic diversity was observed, and the percentage of similarity between the lineages ranged from 51.1% to 100%. MLST typing was performed in 58 of the isolates included in this study. Of these, 27 (46.5%) were identified as ST / CC 131/131, nine (15.5%) as ST / CC 90/23, six (10.3%) as ST / CC 405/405, two (3.4%) as ST / CC 10/10, ST224, ST / CC 617/10 or ST 2851, and the other isolates were identified as ST / CC 57/350, ST / CC 155/155, ST / CC 354/354, ST / CC 648/648, ST 1177, ST 1284, ST 2208 or ST 8022, with one (1.7%) representative each lineage. **Conclusions.** The results of the present study allow us to conclude that the presence of *E. coli* producing ESBL and resistant to fluoroquinolones is mainly related to the microbiota of each patient. Also, the strains found in São José do Rio Preto are the same distributed throughout the world carriers of the same genes *bla*CTX-M and potential causers of UTI or distributed in food or as commensals of animals, demonstrating its wide dissemination and ease of acquisition.

KEY WORDS: *Escherichia coli*, Urinary Tract Infection, Molecular Typing, Extended Spectrum Beta Lactamase.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As infecções do trato urinário (ITUs) são as infecções bacterianas mais comuns na população, afetando cerca de 150 milhões de pessoas no mundo a cada ano, e constituem um importante problema de saúde pública por acometerem indivíduos na comunidade e no ambiente hospitalar, causando piora da qualidade de vida e da produtividade. Além disso, podem evoluir para quadros clínicos graves, que resultam em falência renal e óbito. ⁽¹⁻⁶⁾

As ITU referem-se à presença de bactérias na urina, geralmente em quantidade superior a 10^5 UFC/mL, ⁽⁷⁾ e a maioria dos casos é causada por *Escherichia coli* uropatogênicas (UPEC – “uropathogenic *E. coli*”). ^(8,9) As UPEC estão incluídas no grupo das *E. coli* causadoras de infecção extraintestinal (ExPEC – “extraintestinal pathogenic *E. coli*”), associadas a um amplo espectro de infecções em humanos. ⁽¹⁰⁾ Estas bactérias têm o trato gastrointestinal (TGI) de animais e humanos como principal reservatório, e as ITU ocorrem, na maioria dos casos, após a migração das bactérias do intestino para a região perianal e, posteriormente, para a uretra. ^(11,12)

A adesão e a subsequente colonização do uroepitélio, bem como a invasão e sobrevivência no interior dessas células epiteliais são facilitadas por diversos fatores de virulência expressos por bactérias causadoras de ITU. ⁽¹³⁻¹⁶⁾ Essa diversidade de fatores varia entre as diferentes linhagens e pode estar associada à gravidade das infecções, que podem evoluir como cistite, pielonefrite grave ou urosepse. ⁽¹⁷⁾ Fatores de virulência em UPEC são encontrados em ilhas de patogenicidade adquiridas por via de transferência gênica horizontal. A característica de UPEC é determinada por múltiplos genes e mecanismos de virulência, incluindo adesinas, toxinas, sistemas para a captura de ferro e vias metabólicas, nenhuma das quais é patognomônica. ⁽⁷⁾

Nos últimos anos, tem-se observado uma elevação na ocorrência de ITU por *E. coli* resistentes a diversas classes de antimicrobianos, ^(5,6) o que dificulta o tratamento e eleva os períodos de internação hospitalar, os custos da assistência à saúde (6 bilhões de dólares) e as taxas de mortalidade. ⁽¹⁸⁾

Beta-lactâmicos e fluoroquinolonas são antimicrobianos utilizados no tratamento de cistite e pielonefrite não complicadas, alternativas para fosfomicina/trometamol, nitrofurantoína e trimetoprim/sulfametoxazol. O uso de nitrofurantoína deve ser evitado quando há suspeita de pielonefrite, e o uso de trimetoprim/sulfametoxazol é limitado devido às altas taxas de uropatógenos resistentes. ⁽⁶⁾ O uso da fosfomicina não era tão frequente até alguns anos atrás devido à recomendação de dose única não ser tão eficaz quanto os demais antimicrobianos, além de ser evitada em casos de suspeita de pielonefrite. Porém, seu uso tem voltado a fazer parte de tratamentos de ITU não complicada por ainda apresentar atividade contra uropatógenos multirresistentes. ⁽⁶⁾ Contrariamente, as fluoroquinolonas são altamente eficazes no tratamento convencional de ITU, apesar dos riscos de sérios danos causados pelo seu uso. Entretanto, a taxa de resistência às fluoroquinolonas em uropatógenos tem aumentado exponencialmente em todo o mundo. ⁽⁶⁾ Devido ao cenário apresentado, o uso de beta-lactâmicos (que não são tão eficazes quanto à fluoroquinolonas e podem apresentar efeitos adversos), em especial as cefalosporinas de espectro estendido, em combinação ou não com aminoglicosídeos, e os carbapenêmicos são importantes antibióticos considerados para o tratamento de infecções do trato urinário tanto de homens quanto de mulheres. ⁽⁶⁾

De acordo com comunicação pessoal da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital de Base (HB) de São José do Rio Preto, São Paulo, a taxa de ITU relacionada a *E. coli* concomitantemente resistentes a cefalosporinas de espectro

estendido e a fluoroquinolonas tem aumentado na instituição. Assim, conhecer os mecanismos de resistência a essas duas classes de antimicrobianos e a similaridade genética entre as *E. coli* isoladas no HB poderá auxiliar no entendimento da presença de tais determinantes, bem como fornecer dados para o planejamento de protocolos de prevenção de disseminação da resistência.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete amplamente distribuída na natureza, mesófila (temperatura ótima de crescimento populacional em torno de 37 °C), geralmente, com flagelos peritríquios, não formadora de endósporo. É capaz de utilizar a D-glicose como única fonte de carbono e energia, é anaeróbia facultativa, oxidase-negativa, catalase-positiva, pode fermentar tanto a glicose quanto a lactose, e, neste caso, sempre com produção de ácido e gás, não utiliza citrato como fonte de carbono, produz indol e reduz nitratos a nitritos. ^(19,20) Após análises filogenéticas recentes na família Enterobacteriaceae, o gênero *Escherichia/Shigella*, juntamente com os gêneros *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Proteus* e *Salmonella*, dentre outros menos conhecidos, compreendem o, agora, cientificamente reconhecido “clado *Enterobacter-Escherichia*”. ⁽²¹⁾

O genoma da espécie *Escherichia coli* apresenta-se altamente plástico, pois sofre constantes inserções e deleções de bases e fragmentos de DNA. O tamanho do genoma de *E. coli* (incluindo plasmídeos e profagos) pode variar de, aproximadamente, 4,6 Mb até 5,9 Mb (uma diferença de mais de 1 milhão e trezentas mil bases), e cada indivíduo codificando de 4200 a 5500 proteínas. ⁽²²⁾ Quanto mais isolados de *E. coli* são sequenciados, mais o “core genômico” (ou seja, os genes cromossômicos que estão presentes em todas as diferentes cepas da espécie) diminui, contabilizando, atualmente, pouco menos de 1500 genes. Todos os demais genes são considerados “genes acessórios”, e incluem genes que codificam elementos de bacteriófagos e determinantes de virulência e de resistência a antimicrobianos. ⁽²²⁾ Esses genes acessórios são,

principalmente, adquiridos por transferência horizontal a partir de outras bactérias via plasmídeos, bacteriófagos, ilhas de patogenicidade e transposons. ^(22,23)

De acordo com o seu conjunto de fatores de virulência e propriedades clínicas, as linhagens de *E. coli* podem ser classificadas como patógenos intestinais ou extra-intestinais ⁽²⁴⁾

- As classes de *E. coli* que causam diarreia são: ETEC (*E. coli* Enterotoxigênica); EHEC (*E. coli* Enterohemorrágica); EIEC (*E. coli* Enteroinvasiva) e EAEC (*E. coli* Enteroagregativa).
- *E. coli* Patogênica Extra Intestinais (ExPEC), incluem as linhagens uropatogênicas (UPEC), *E. coli* associada à Meningite no Recém-Nascido (NMEC) e *E. coli* associada a Septicemias (SePEC)

2.2 Beta-Lactâmicos

Os antimicrobianos beta-lactâmicos possuem em comum um anel beta-lactâmico que pode apresentar-se isolado ou conjugado a outro anel, resultando em estruturas bicíclicas. São representados pelas penicilinas, cefalosporinas, monobactâmico e carbapenêmicos e estão entre os mais prescritos em todo o mundo ⁽²⁵⁾.

São agentes bactericidas que agem através da inibição da síntese da parede celular bacteriana, que por sua vez é composta por unidades alternadas de ácido N-acetilmurânico (NAM) e N-acetilglicosamina (NAG) formando camadas de peptideoglicano. Cada NAM possui um terminal pentapeptídico com dois resíduos de D-alanina na sua extremidade. A ligação covalente entre esses dois resíduos (transpetidação) é catalisada pelas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). Essas ligações, que se repetem ao longo de toda a parede celular, são essenciais para conferir

rigidez e estabilidade à célula. O anel beta-lactâmico tem a estrutura semelhante ao terminal D-alanina-D-alanina do NAM, o que permite a sua ligação às PBPs tornando-as incapazes de catalisar outras reações de transpetidação⁽²⁶⁾.

A integridade do anel beta-lactâmico é imprescindível à sua atividade, que consiste em inibir a síntese da parede celular bacteriana pela inativação das transpeptidases que catalisam ligações cruzadas na fase final de síntese do peptidoglicano. A hidrólise do anel beta-lactâmico implica na inativação dos beta-lactâmicos⁽²⁷⁾.

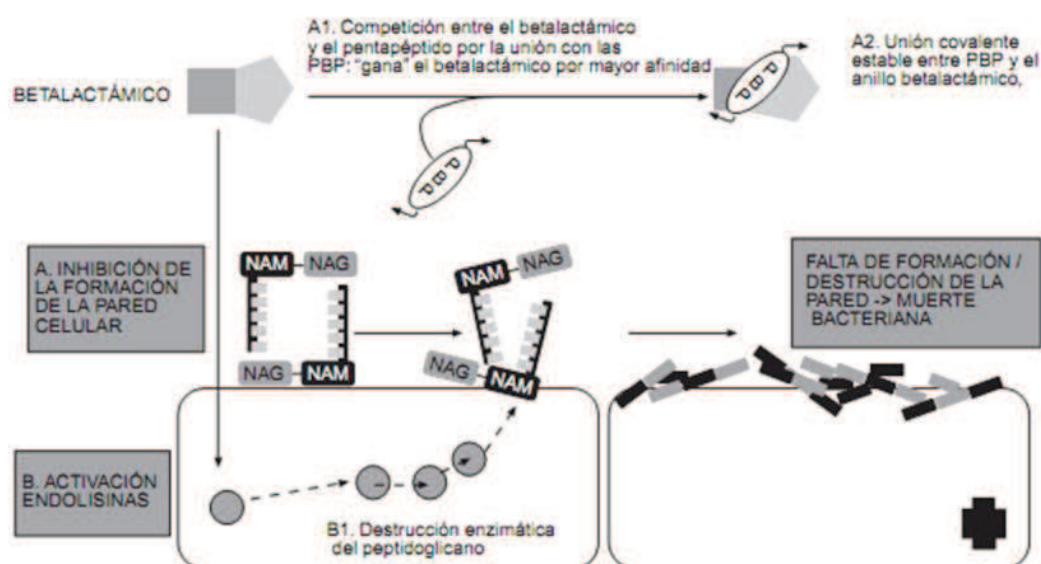


Figura 1. Mecanismo de ação dos β -lactâmicos.

2.2.1 Resistência aos beta-lactâmicos em *E. coli*: importância das ESBL tipo CTX-M

Os beta-lactâmicos são antibióticos criticamente importantes tanto em medicina humana quanto veterinária.^(28,29) Estão entre os principais antibióticos recomendados para o tratamento das ITU, principalmente em casos graves como pielonefrites.⁽³⁰⁾

Entretanto, a resistência em *E. coli* isoladas na comunidade e hospitais tem aumentado. (5,31)

O mais importante mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos em *E. coli* é a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). (31,32) Estas enzimas, da classe A de Ambler e 2be de Bush-Jacoby-Medeiros, hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico de forma irreversível, impedindo sua ação nas transpeptidases. (33) Desta forma, inativam os beta-actâmicos penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, e o aztreonam, e são responsáveis por grande parcela de falha dos tratamentos. (34) Diversas famílias de ESBL (SHV, TEM, CTX-M, SFO, BES, BEL, TLA, GES, PER e VEB) foram descritas, mas, atualmente, as do tipo CTX-M são as mais prevalentes. (35-39)

As CTX-M surgiram após a introdução da cefotaxima na prática clínica, na década de 80. (40) Há evidências de que sua origem sejam genes cromossômicos de *Kluyvera* spp., pois algumas enzimas CTX-M apresentam elevada similaridade com beta-lactamases cromossômicas de várias espécies deste gênero. (35,41) Estudos filogenéticos mostram que existem cinco grandes grupos distintos de ESBLs tipo CTX-M, com base na similaridade das sequências de aminoácidos, sendo eles: grupo CTX-M-1, grupo CTX-M-2, grupo CTX-M-8, grupo CTX-M-9 e grupo CTX-M-25. (35,42-44) Os membros do mesmo grupo exibem similaridade maior que 94% entre suas sequências de aminoácidos, enquanto entre grupos diferentes, a semelhança é menor que 90%. (35,45)

Inicialmente, as CTX-M eram reconhecidas por hidrolisarem, preferencialmente, a cefotaxima, e por isso receberam esta nomenclatura. (40) Entretanto, variantes com alta capacidade hidrolítica sobre a ceftazidima foram descritas posteriormente, como CTX-

M-3, CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19, CTX-M-23, CTX-M-27, CTX-M-55 e CTX-M-123. ^(35, 46-48) Os genes *bla*_{CTX-M} estão localizados, na maioria das bactérias, em plasmídeos conjugativos que são transferidos horizontalmente entre diversas espécies, e associados a sequências de inserção tipo *ISEcpI* e *ISCRI*, e elementos relacionados a bacteriófagos. Estas características favorecem a sua disseminação, o que explica a alta prevalência e ocorrência mundial das CTX-M. ^(45,49-51)

Com relação às UPEC, vários estudos relatam a detecção de cepas produtoras de ESBL, ^(31,52-55) sendo as CTX-M as mais comuns. ^(48,49,56)

2.3 Tipagem molecular

A principal função da tipagem molecular é a determinação da relação entre clones de micro-organismos. Várias metodologias baseadas na análise do DNA estão padronizadas, e entre elas, a PFGE (“Pulsed Field Gel Electrophoresis”) e a MLST (“Multilocus Sequence Typing”) são muito utilizadas para a identificação de reservatórios de bactérias e rotas de infecção, e para o reconhecimento de cepas virulentas. ⁽⁵⁷⁾

A PFGE é um método com alta capacidade discriminatória, baseado na comparação do padrão de bandas, que correspondem a grandes fragmentos do genoma obtidos após a digestão com enzimas de restrição, em eletroforese de campo pulsado. O MLST é baseado na análise de sequências do DNA de genes “housekeeping” conservados, para a criação de um perfil de alelos ou “sequence type” (ST). ^(58,59)

A PFGE é aplicada, principalmente, em estudos microepidemiológicos, para a comparação de cepas isoladas em locais específicos e períodos de tempo mais curtos, uma vez que compreende diversas variáveis, o que pode gerar comparações incorretas

entre resultados de laboratórios distintos. Já a MLST pode ser aplicada com facilidade em estudos de epidemiologia global, pois permite comparar cepas virulentas e resistentes aos antimicrobianos isoladas em todo o mundo com maior facilidade uma vez que se baseia, apenas, na comparação de sequências de DNA disponíveis na internet. ⁽⁵³⁾ A aplicação do MLST permitiu a identificação, em 2008, de um clone pandêmico de *E. coli*, identificado como ST131, que apresenta grande virulência e está associado à ITU tanto na comunidade como em hospitais. ⁽⁶⁰⁾ Vários estudos confirmam o predomínio mundial de ST131, que abriga uma ampla diversidade de genes de resistência em plasmídeos conjugativos, sobretudo o que codifica CTX-M-15. ⁽⁶¹⁾

Neste estudo, a técnica de PFGE foi utilizada para a tipagem de *E. coli* carreadoras de genes *bla*_{CTX-M} visando estabelecer o perfil genético e comparar os isolados obtidos de amostras clínicas de urina. A tipagem por MLST foi realizada para comparar as linhagens identificadas no estudo com dados de outros estudos conduzidos no Brasil e em outros países.

2.4 Fatores de Virulência

Em UPEC, os fatores de virulência estão associados à superfície da célula ou são secretados e exportados para os sítios de ação, e são codificados por genes localizados em elementos genéticos móveis denominados ilhas de patogenicidade, que podem ser transferidos horizontalmente. ⁽¹⁾

Entre os fatores associados à superfície destacam-se as adesinas fimbriais (Fimbriais tipo 1, P, Dr, S e F1C) e não fimbriais, que desempenham importante papel

na adesão ao uroepitélio, além de facilitarem a invasão tecidual, o transporte de toxinas para os tecidos e estimularem a produção de citocinas por células do hospedeiro. ^(62,63)

As adesinas não fimbriais (Afa) apresentam tropismo pelo epitélio renal e células endoteliais, e estão relacionadas ao desenvolvimento de ITU crônicas e recorrentes. ⁽⁶⁴⁾

Além das adesinas, a cápsula polissacarídica, o lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular e os flagelos exercem importante papel na virulência. A cápsula protege contra a fagocitose e o sistema complemento. Os antígenos da cápsula dos tipos K1 e K5 são os mais relacionados à UPEC. O LPS induz a liberação de citocinas e ácido nítrico que resultam em uma intensa resposta inflamatória. Os flagelos são responsáveis pela motilidade bacteriana, também estão associados à interação entre as UPEC e o epitélio. ^(62,64)

Entre as toxinas, destacam-se a α -hemolisina (HlyA), o fator necrotizante citotóxico (CNF1), a toxina Cdt (“citolethal distending toxin”), e duas toxinas da família SPATE (“serine proteases autotransporters of Enterobacteriaceae”) denominadas Vat (“vacuolating autotransporter toxin”) e Sat (“secreted autotransporter toxin”). A HlyA lisa eritrócitos e células do sistema imunológico, favorecendo a disseminação das UPEC através de mucosas e a aquisição de nutrientes, e está entre as toxinas mais comumente produzidas. ⁽⁶³⁾ CNF1 promove a alteração dos filamentos de actina e tubulina do citoesqueleto e, assim, favorece a invasão tecidual e a neutralização de fagócitos, sendo também produzida por uma importante parcela das UPEC. ^(64,65) Cdt provoca a lise das células hospedeiras devido à interrupção do ciclo celular. ⁽⁶⁶⁾ Vat e Sat induzem efeitos citopáticos nas células do hospedeiro que resultam em perda de células

tubulares epiteliais, dissolução das membranas glomerulares, e vacuolação do tecido renal. ⁽⁶⁵⁾

Os sideróforos são moléculas de baixo peso molecular, secretadas no meio, onde realizam a quelação do ferro (Fe^{3+}) ligado às proteínas transferrina e ferritina, que armazenam o ferro em mamíferos. Posteriormente, ligam-se os receptores na superfície das bactérias e são internalizados, fornecendo o Fe^{3+} essencial para crescimento e permanência das UPEC no trato urinário. ⁽⁶⁵⁾

Combinações distintas de sideróforos são encontradas em diferentes cepas associadas à infecção em sítios distintos do trato urinário, indicando a ocorrência de especificidade. ⁽⁶⁷⁾ Além destes, a proteína específica de UPEC (Usp) tem sido estudada, por ser uma bacteriocina com atividade sobre *E. coli* competidoras e também com atividade genotóxica sobre células de mamíferos. ⁽⁶⁸⁾

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

No presente trabalho, propomos realizar a avaliação de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de terceira geração isoladas de pacientes com ITU.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar e comparar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, os genes responsáveis pela produção de ESBL e a diversidade de genes de virulência.
- Comparar o grupo filogenético e similaridade genética usando-se a tipagem molecular por análise do perfil de macrorrestrição do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE) e sequenciamento de multilocus (MLST)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados de *E. coli*

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CAAE: 33351914.3.0000.5415).

Neste estudo, foram incluídas 61 *E. coli* produtoras de ESBL e resistentes a fluoroquinolonas isoladas de amostras de urina, coletadas de pacientes com ITU atendidos no Hospital de Base de São José do Rio Preto (HB) entre dezembro de 2014 e maio de 2015. As amostras foram processadas no setor de Microbiologia Clínica do Laboratório Central do Hospital de Base de São José do Rio Preto (LC-HB), de acordo com os procedimentos de rotina para diagnóstico microbiológico. O ágar cromogênico CPS (bioMérieux) foi usado para a urocultura e isolamento, e a identificação e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizada pelo sistema automatizado Vitek 2 Compact (bioMérieux).

As *E. coli* encontram-se armazenadas em coleção de cultura no Centro de Investigação de Microrganismos (CIM) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), em freezer a -80 °C. Para tal, uma colônia obtida de ágar MacConkey foi cultivada em caldo BHI (“Brain Heart Infusion”, Oxoid) acrescido de cefotaxima ou ceftazidima (4 µg/mL) a 37 °C por 16-18 horas. Após este tempo, 0,8 mL da cultura foi transferido para criotubos estéreis contendo 0,2 mL de glicerol 50% estéril, a fim de se obter uma concentração final de 10% de glicerol, ideal para a preservação de culturas microbianas por períodos prolongados. ⁽⁶⁹⁾

4.2 Detecção e identificação dos genes de resistência

4.2.1 Extração de DNA total e plasmidial

As cepas armazenadas a -80 °C foram reativadas através de cultivo em caldo TSB por 16 a 24 horas a 37 °C em agitação. Em seguida, uma alíquota de 1,5 mL da suspensão bacteriana foi centrifugada a 15000 G por 10 minutos e o sobrenadante descartado, essa massa celular obtida (pellet) foi utilizada para a extração do DNA genômico bacteriano. O “pellet” foi homogeneizado em 200 µL de água Milli-Q e submetido à nova centrifugação a 15000 G por 10 minutos, em seguida, após o descarte do sobrenadante, o “pellet” foi suspenso em 40 µL de água Milli-Q e incubado a 100 °C por 10 minutos.

Após a fase de lise e liberação do DNA, a mistura foi submetida a choque térmico em gelo por 2 minutos e centrifugada a 15000 G por 10 segundos a 4 °C. O sobrenadante, contendo o DNA, foi acondicionado em outro tubo de polipropileno de 1,5 mL, previamente identificado, onde foram adicionados 500 µL de etanol absoluto a -20 °C (*Merck Chemicals*) e incubado em gelo por 20 minutos. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 16000g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e 300 µL de etanol 70% (-20 °C) adicionados à amostra, em seguida, as etapas de homogeneização e centrifugação foram repetidas. O sobrenadante foi descartado e, após a secagem, o DNA foi ressuspenso com 100 µL de tampão TBE e 2 µL de RNase (2 µg/mL) (Kit comercial Invitrogen®) e a amostra de DNA incubada por 30 minutos a 37 °C em termobloco Thermomixer Comfort (Eppendorf). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Biophotometer (Eppendorf) armazenado em freezer -20 °C para posterior utilização.⁽⁷⁰⁾

4.2.2 Detecção dos genes de ESBL

Para a investigação dos principais genes de ESBL, foram utilizados *primers*,⁽⁷¹⁾ como reproduzido na **Tabela 1**. Para a detecção dos genes, seguiu-se o protocolo: em tubo de polipropileno de 200 µL, foram adicionados 2 µL de DNA extraído e os seguintes reagentes: 2,5 µL de tampão (10X), 2,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,0 µL de dNTP (2,5 mM), 1,0 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 0,2 µL de Taq DNA Polymerase (5 U/µL) e q.s.p. 25 µL de água UltraPure (Invitrogen, CA, EUA). As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Veriti[®] 96 (Applied Biosystems). Os tubos foram colocados em termociclador, programado com passo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos sequenciais de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, hibridização a 60 °C por 30 segundos, e extensão a 72 °C por 30 segundos, com uma fase de extensão final a 72 °C por 7 minutos. Uma reação sem amostra de DNA foi utilizada como controle negativo; como controle positivo para cada reação foi utilizados DNA de cepas bacterianas pré-caracterizadas por seqüenciamento. Os produtos foram analisados em gel de agarose 2%, previamente adicionado de 0,8 µL de brometo de etídio (10 mg/mL) em 100 mL de tampão TBE. A eletroforese foi realizada a 6 V/cm, por 60 minutos, utilizando o marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific). O resultado foi observado sob luz ultravioleta e fotografado utilizando o aparelho LPix Ex (Loccus Biothechnology). Após a amplificação por PCR, todos os fragmentos de DNA foram purificados com etanol⁽⁷⁰⁾ e sequenciados em equipamento 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems-HITACHI), utilizando-se o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) e o par de *primers* utilizado na PCR, para confirmação do resultado. As seqüências foram analisadas com o auxílio do programa

Accelrys Gene 2.0 (Accelrys Software Inc. 2006) e comparadas a outras previamente depositadas na base de dados GenBank.

Tabela 1. *Primers* de beta-lactamases utilizados neste estudo.

PCR	Gene Alvo	Sequência (5' – 3') ^a	Temp. anel.	Amplicon
Multiplex 2	<i>bla</i> _{CTX-M} do grupo 1	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	60 °C	688 pb
	<i>bla</i> _{CTX-M} do grupo 2	CGTTAACGGCACGATGAC CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		404 pb
	<i>bla</i> _{CTX-M} do grupo 9	TCAAGCCTGCCGATCTGGT TGATTCTCGCCGCTGAAG		561 pb
CTX-M-8/25	<i>bla</i> _{CTX-M-8, -25, -26, -39 a -41}	AACRCRCAGACGCTCTAC TCGAGCCGGAASGTGTAT	60 °C	326 pb

^a **R** = A ou G; **S** = G ou C; **Y** = T ou C

4.3 Detecção de genes de virulência

Para a detecção dos genes, seguiu-se o protocolo: em tubo de polipropileno de 200 µL, foram adicionados 2 µL de DNA extraído e os seguintes reagentes: 2,5 µL de tampão (10X), 2,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,0 µL de dNTP (2,5 mM), 1,0 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 0,2 µL de Taq DNA Polymerase (5 U/µL) e q.s.p. 25 µL de água UltraPure (Invitrogen, CA, EUA). As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Veriti[®] 96 (Applied Biosystems). Os tubos foram colocados em termociclador, programado com passo de desnaturação inicial a 95 °C por 12 minutos, seguido por 25 ciclos sequenciais de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização a 54 °C – para os genes *blapapGI*, *blapapGII* e *blairoN* –, a 55 °C – para *blavat*, 56 °C – para *blapapGIII*, *blasfaS*, a 58 °C – para *blaafa/draBC*, *blahlyA*, *blacdtB*, para *blasat*, a 63 °C – para *blanfaE*, *blakpsMTK1*, *blakpsMTK5*, *blacnfl*, *blafyuA*, *blaiutA*, a 64 °C – para *blapapEF*, *blasfa/focDE*, *blafocG*, 66 °C – para *blafimH*, *blausp*, – por 30 segundos, e extensão a 68 °C por 3 minutos, com uma fase de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos foram analisados em gel de agarose

2%, previamente adicionado de 0,8 µL de brometo de etídio (10 mg/mL) em 100 mL de tampão TBE. A eletroforese foi realizada a 6 V/cm, por 60 minutos, utilizando o marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific). O resultado foi observado sob luz ultravioleta e fotografado utilizando o aparelho LPix Ex (Loccus Biothecnology).⁽⁷²⁻⁷⁵⁾

Todas as *E. coli* foram submetidas à PCR para detecção de (**Tabela 2**):

a) genes de adesinas: *fimH* (fimbrias tipo 1), *pap* (elementos de fimbrias P), *sfaS* (adesina fimbrial S), *focG* (adesina fimbrial F1C), *sfa/focDE* (região central entre os operons *sfaS* e *focG*), *afa/draBC* (operons de adesina específica do antígeno Dr) e *nfaE* (adesina não fimbrial);

b) genes associados à síntese de cápsula: *kpsMT II K1* (cápsula do tipo 2, sorotipo K1) e *kpsMT II K5* (cápsula do tipo 2, sorotipo K5);

c) genes de toxinas: *hlyA* (α -hemolisina), *cnfI* (fator necrotizante citotóxico), *cdtB* (“citolethal distending toxin”), *sat* (“secreted autotransporter toxin”) e *vat* (“vacuolating autotransporter toxin”);

d) genes de receptores dos sideróforos: *fyuA* (yersiniabactina), *iutA* (aerobactina) e *iroN* (salmoquelina);

e) gene que codifica uma proteína específica de UPEC: *usp*;

f) gene que codifica um fator de proteção contra fagocitose no soro: *iss*;

g) gene que codifica uma proteína da membrana externa que permite sobrevivência no meio intracelular: *ompT*.

Tabela 2. *Primers* de virulência utilizados neste estudo.

Fator	Gene Alvo	Sequência (5' – 3') ^a	Amplicon	T _{Anelamento}
Adesinas	<i>fimH</i>	TGCAGAAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508 bp	66 °C
	<i>papEF</i>	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	336 bp	64 °C
	<i>papG I</i>	TTAGCTGGATGGCACAATG TTGTCCATGTATCCCATTCAT	335 bp	54 °C
	<i>papG II</i>	GGGCATTGCTACGGTAACCTG CGCTATTAATAGACAGATCAACC	545 bp	
	<i>papG III</i>	CGGCAACTTTAAGCTATGTG TGTACCATCTCATCGTTGTCTC	720 bp	56 °C
	<i>zfa/zbcDE</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410 bp	64 °C
	<i>zfaS</i>	GTGGATACGACGATTACTGTG CCGCCAGCATTCCTCTGTATTC	240 bp	56 °C
	<i>zbcG</i>	CAGCACAGGCAGTGGATAACGA GAATGTCCGCTGCCCATTCCT	360 bp	64 °C
	<i>zfa/zbcBC</i>	GCTGGGCAGCAAACTGATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	750 bp	58 °C
	<i>zfaE</i>	GCTTACTGATTCTGGGATGGA CGGTGGCGGAGTCATATGCCA	559 bp	
	<i>hpa:MT KI</i>	TAGCAAACGTTCTATTGGTGC CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	153 bp	63 °C
	<i>hpa:MT KJ</i>	CAGTATCAGCAATCGTTCGTGA CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	159 bp	
Toxinas	<i>hlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1177 bp	58 °C
	<i>ctxT</i>	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG CATTACAGAGTCTCGCCCTCATTATT	498 bp	63 °C
	<i>cdtB</i>	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG AAATCTCTCGCAATCATCCAGTTA	466 bp	58 °C
	<i>sat</i>	GCAGCTACCGCAATAGGAGGT CATTACAGAGTACCGGGGCCTA	937 bp	58 °C
Sideróforos	<i>var</i>	GAACACAGTTCATCTGATCTCC GAATATATCAAATGGTCCGCC	419 bp	55 °C
	<i>fliA</i>	TGATTAACCCCGCGACGGGAA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	880 bp	63 °C
	<i>hlyE</i>	GGCTGGACATCATGGGAACCTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	300 bp	
	<i>iroN</i>	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG GACGCCGACATTAAGACGCAG	665 bp	54 °C
Proteína Específica	<i>uzp</i>	ACATTCAAGGCAAGCCTCAG AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC	440 bp	66 °C

4.4 Determinação do grupo filogenético

Para a classificação das linhagens de *E. coli* em grupos filogenéticos, foram utilizados *primers* como esquema da figura 2. Para a detecção dos genes, seguiu-se o protocolo: em tubo de polipropileno de 200 µL, foram adicionados 2 µL de DNA extraído e os seguintes reagentes: 2,5 µL de tampão (10X), 2,0 µL de MgCl₂ (25 mM),

1,0 μL de dNTP (2,5 mM), 1,0 μL de cada *primer* (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$), 0,2 μL de Taq DNA Polymerase (5 U/ μL) e q.s.p. 25 μL de água UltraPure (Invitrogen, CA, EUA). A leitura dos resultados de grupo filogenético foi realizada conforme o esquema de Escobar-Páramo e colaboradores para uma comparação mais precisa entre as linhagens isoladas, ⁽⁷⁶⁾ porém baseado no esquema classificatório inicial de Clermont, ⁽⁷⁷⁾ e utilizando os primers descritos por Doumith e colaboradores. ⁽⁷⁸⁾

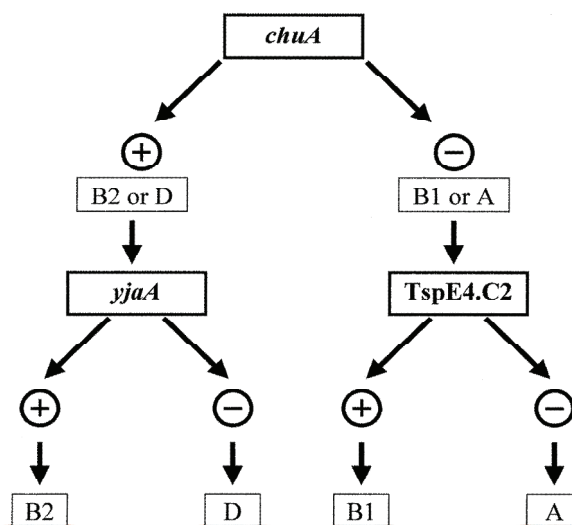


Figura 2. Esquema de interpretação do grupo filogenético.

As PCR foram conduzidas em termociclador Veriti[®] 96 (Applied Biosystems), sob a seguinte condição de ciclagem: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 65 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, finalizando com 7 minutos de extensão a 72 °C. Os produtos foram analisados como descrito na seção 3.2.2.

4.5 Purificação dos “amplicons”

Todos os produtos obtidos nas reações de PCR foram purificados com etanol. O “amplicon” de cada reação foi transferido para um tubo de polipropileno de 1,5 mL

previamente identificado, onde foram adicionados acetato de sódio 3 M e etanol absoluto, nas proporções de 10% e 3 vezes, respectivamente, do volume de “amplicons” que foi purificado. Os tubos foram colocados em freezer -80 °C por 1 hora para a precipitação do DNA. Em seguida, foram centrifugados a 16000 G por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 70%. Por fim, os tubos foram centrifugados a 16000 G por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi homogeneizado em 20 µL de tampão TBE e estocado a -20 °C até o seu uso.⁽⁷⁰⁾

4.6 Tipagem Molecular

4.6.1 PFGE

Os 61 isolados foram submetidos à tipagem molecular por PFGE, de acordo com o PulseNet (<http://www.pulsenetinternational.org/protocols/Pages/default.aspx>). Os perfis de restrição genômica gerados após digestão com a enzima *XbaI* foram analisados utilizando-se o programa BioNumerics v6.6 (Applied Maths). Os dendrogramas foram gerados usando-se o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e médias aritméticas com base no coeficiente de similaridade de Dice. Os isolados foram considerados geneticamente relacionados quando apresentaram índice de similaridade $\geq 90\%$.

4.6.2 MLST

As 61 UPEC também foram analisadas por MLST de acordo com Mora e colaboradores (2013)⁽⁷⁵⁾. Para tal, sete genes “housekeeping” (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* and *recA*) foram sequenciados, usando-se os primers especificados no web

site <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>. O perfil de alelos das sete sequências de genes foi usado para a determinação do “sequence type” (ST) a partir da base de dados eletrônica do web site *E. coli* MLST.

A primeira etapa da técnica consiste em amplificar os sete genes por PCR convencional. Para cada gene, utilizou-se uma mistura de 30 µL contendo 3,3 µL de master mix contendo tampão, MgCl₂ e dNTP, 1,5 µL de cada *primer* F e R a 10 µM, 1,5 µL de taq polimerase, 20,2 µL de água ultra pura e 2,0 µL de DNA. Depois de amplificados, os produtos foram purificados com etanol ⁽⁷⁰⁾ e armazenados a 4 °C até o momento da realização da reação com o kit Big Dye[®], Terminator para determinar a sequência de nucleotídeos.

Nesta etapa, foram feitos 2 mix para cada gene, contendo 0,875 µL de água ultra pura estéril, 0,875 µL do tampão do Big Dye[®], 0,25 µL de Big Dye[®] e 2 µL de *primer* F ou R (concentração inicial 0,67 µM) e 1 µL do gene purificado. A ciclagem utilizada foi: desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos, e armazenado a 4 °C até a precipitação. Na placa onde foi realizada a reação com Big Dye[®], foram adicionados 80 µL da solução contendo 0,3 mL 3 M de NaOAc (pH 5,3), 6,25 mL de etanol 95% e 1,45 mL de H₂O Mili-Q estéril. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 15 min e, posteriormente, centrifugada a 4 °C a 2000 g por 45 min. Em seguida, o excesso de sobrenadante foi retirado e uma nova centrifugação, com a placa invertida em papel filtro por 1 min a 4 °C e 5000 g foi realizada, para retirada total da solução. Foram, então, adicionados 150 µL de etanol 70% aos poços contendo o produto da reação com o Big Dye[®], e a mesma foi centrifugada por 10 min a 4 °C e 2000 g. Repetiu-se a retirada do sobrenadante e centrifugação invertida. Após permanecer aberta por 5 min

para secagem total, a placa foi coberta com papel alumínio e armazenada a -20 °C até o momento do sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado no aparelho 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e as sequências obtidas pré-processadas pelo software *Seqman* e os *contigs* das sequências *forward* e *reverse* foram submetidas ao website repositório de ST para *E. coli* (https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_mlst_seqdef), onde se obtém o alelo de cada um dos sete genes sequenciados e, a partir de então, compara-se esse perfil de alelos com os demais ST já depositados no website.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O **Anexo 1** desta dissertação mostra o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentado por cada um dos isolados incluídos neste estudo, obtidos a partir de identificação no equipamento Vitek 2 Compact. A **Figura 3** mostra a proporção de isolados quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados (para os propósitos deste estudo, a característica “resistência intermediária” foi considerada como “resistência”). Com relação aos beta-lactamâmicos, todos os isolados apresentaram resistência à ceftriaxona e à cefepima, sendo classificados como produtores de ESBL, com base nas recomendações do CLSI (2014) ⁽⁷⁹⁾. Observou-se, também, resistência à ceftazidima em 3 isolados, à ampicilina em 22, à cefalotina em 23, ao ertapenem em 3, ao imipenem em 3, ao meropenem em 3, à combinação amoxicilina/ácido clavulânico em 21, e piperacilina/tazobactam em 11. Quanto às demais classes de antimicrobianos, observou-se resistência à gentamicina em 33 isolados, à amicacina em 4, à sulfa/trimetopim em 42, à fosfomicina em 2 e à nitrofurantoína em 7 (**Figura 3**).

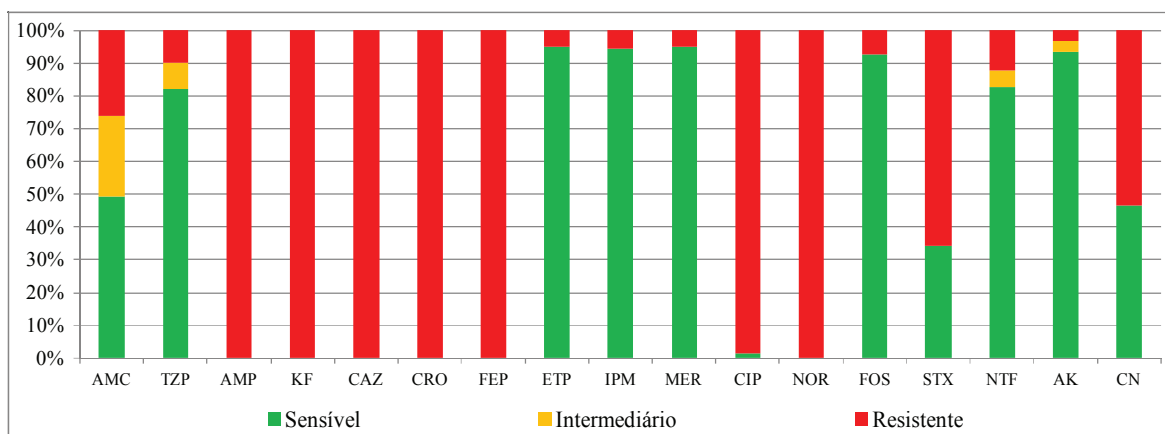


Figura 3. Proporção de isolados quanto à suscetibilidade a cada um dos antimicrobianos testados. AMC = amoxicilina/ácido clavulânico, TZP = piperacilina/tazobactam AMP = ampicilina, KF = cefalotina, CAZ = ceftazidima, CRO = ceftriaxona, FEP = cefepima, ETP = ertapenem, IPM = imipenem, MER = meropenem, CIP = ciprofloxacina, NOR = norfloxacina, FOS = fosfomicina, STX = sulfa/ trimetoprim, NTF = nitrofurantoína, AK = amicacina, CM = gentamicina.

5.2 Genes de ESBL

Variantes do gene *bla*_{CTX-M} foram detectadas em todas as 61 *E. coli* produtoras de ESBL. O gene *bla*_{CTX-M-15} foi identificado em 37 isolados (60,7%), *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{CTX-M-9} em 7 cada um (11,5%), *bla*_{CTX-M-14} em 5 (8,2%), *bla*_{CTX-M-2} em 3 (4,9%), e os genes *bla*_{CTX-M-3} e *bla*_{CTX-M-55}, cada um em 1 isolado (1,6%), como evidenciado na **Figura 4**.

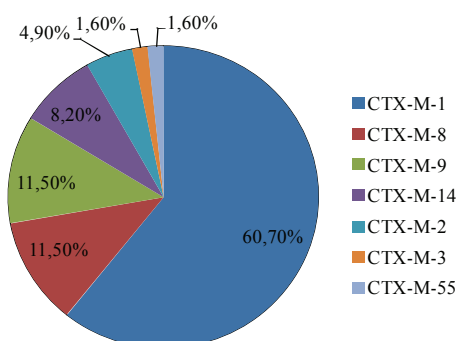


Figura 4. Distribuição proporcional das variantes do gene *bla*_{CTX-M} dentre as 61 *E. coli* isoladas de ITU.

5.3 Grupos filogenéticos

Dentre as 61 *E. coli* causadoras de ITU, 29 (47,5%) foram identificadas como membros do filogrupo B2, 17 (27,9%) como filogrupo A, 10 (16,4%) filogrupo D e 5 (8,2%) como filogrupo B1 (**Figura 5**).

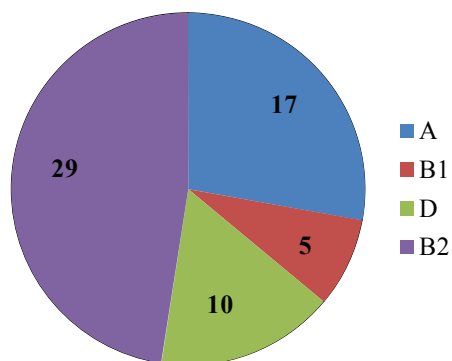


Figura 5. Distribuição dos isolados de *E. coli* entre os principais grupos filogenéticos.

5.4 Genes de virulência

Entre os 26 genes de virulência investigados, 17 foram detectados, em diferentes combinações genotípicas, sendo que nenhum isolado foi negativo para todos os genes. A **Figura 6** apresenta a distribuição desses fatores de virulência, e a **Figura 7**, os diferentes fenótipos de virulência detectados (de acordo com os genótipos).

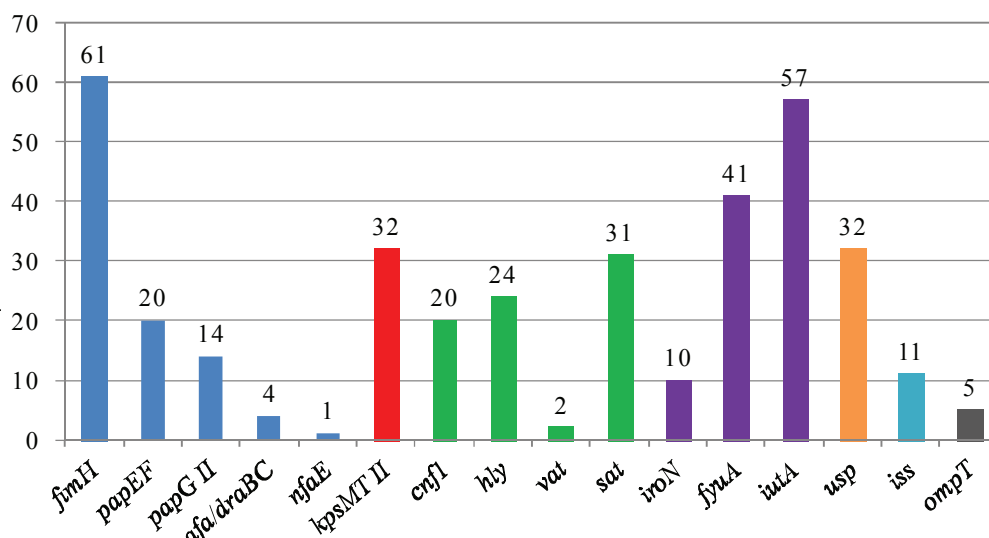


Figura 6. Genes de virulência detectados nos isolados de *E. coli*, separados, por cor, de acordo com o tipo de cada função. Azul: adesinas. Vermelha: síntese de cápsula do tipo II. Verde: toxinas. Roxa: receptores de sideróforos. Laranja: proteína específica de UPEC. Azul claro: resistência ao soro. Cinza: proteína de membrana externa.

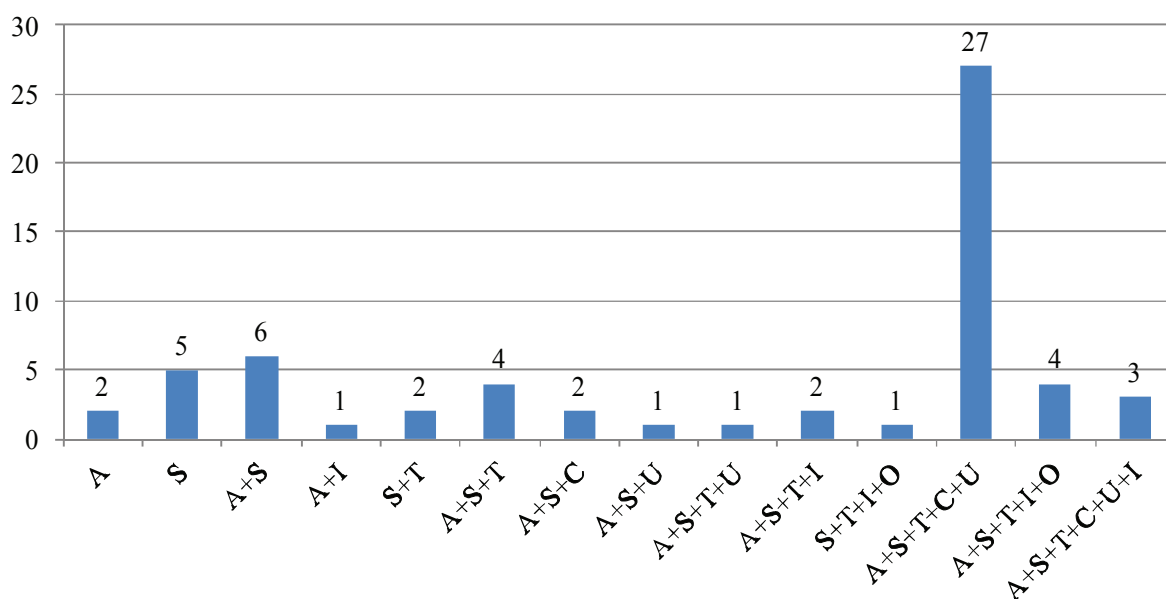


Figura 7. Características de virulência, de acordo com os genótipos, detectadas nos isolados de *E. coli*. A: adesina; S: receptores de sideróforos; I: proteína Iss de resistência ao soro; T: toxina; C: produção de cápsula; U: proteína Usp específica de UPEC; O: componente protéico OmpT de membrana externa.

5.5 PFGE

A **Figura 8** mostra o dendrograma com os perfis de PFGE dos 61 isolados deste estudo. Observou-se uma ampla diversidade genética, sendo que a percentagem de similaridade entre as linhagens variou entre 51,1% e 100%. A maioria das linhagens foi considerada como não pertencentes ao mesmo *cluster*, e os 6 *clusters* formados incluíram de 2 a 5 isolados, com similaridades variando entre 90,0% a 97,3%.

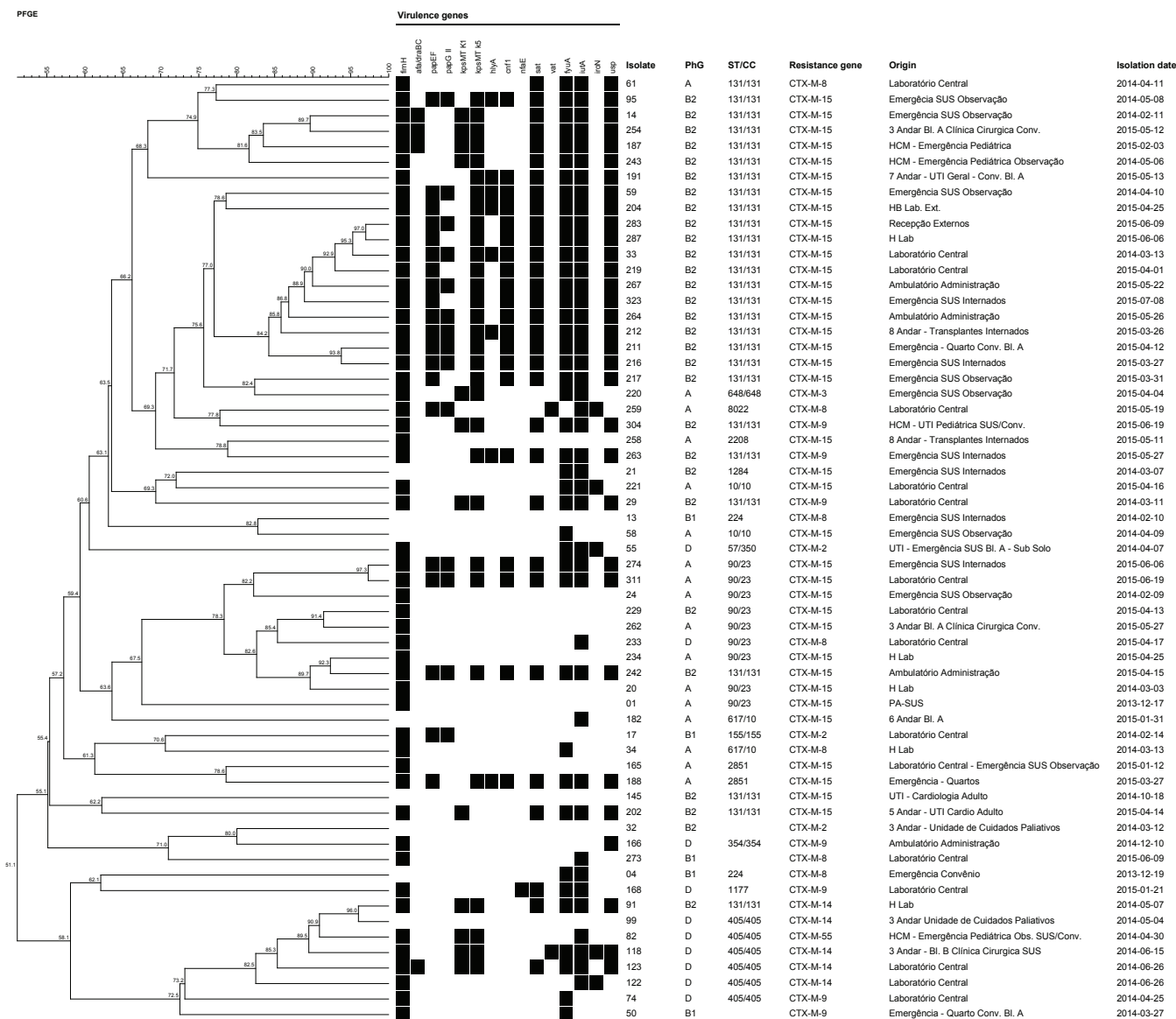


Figura 8. Dendrograma de similaridade genética entre os isolados de *E. coli* após restrição do genoma com enzima *XbaI* seguida de PFGE.

5.6 MLST

A tipagem por MLST foi realizada nas 58 dos isolados incluídos neste estudo. Destes, 27 (46,5%) foram identificados como ST/CC 131/131, nove (15,5%) como ST/CC 90/23, seis (10,3%) como ST/CC 405/405, duas (3,4%) como ST/CC 10/10, ST224, ST/CC 617/10 ou ST 2851, e os demais isolados foram identificados como ST/CC 57/350, ST/CC 155/155, ST/CC 354/354, ST/CC 648/648, ST 1177, ST 1284, ST 2208 ou ST 8022, com um (1,7%) representante cada linhagem (**Figuras 8 e 9**).

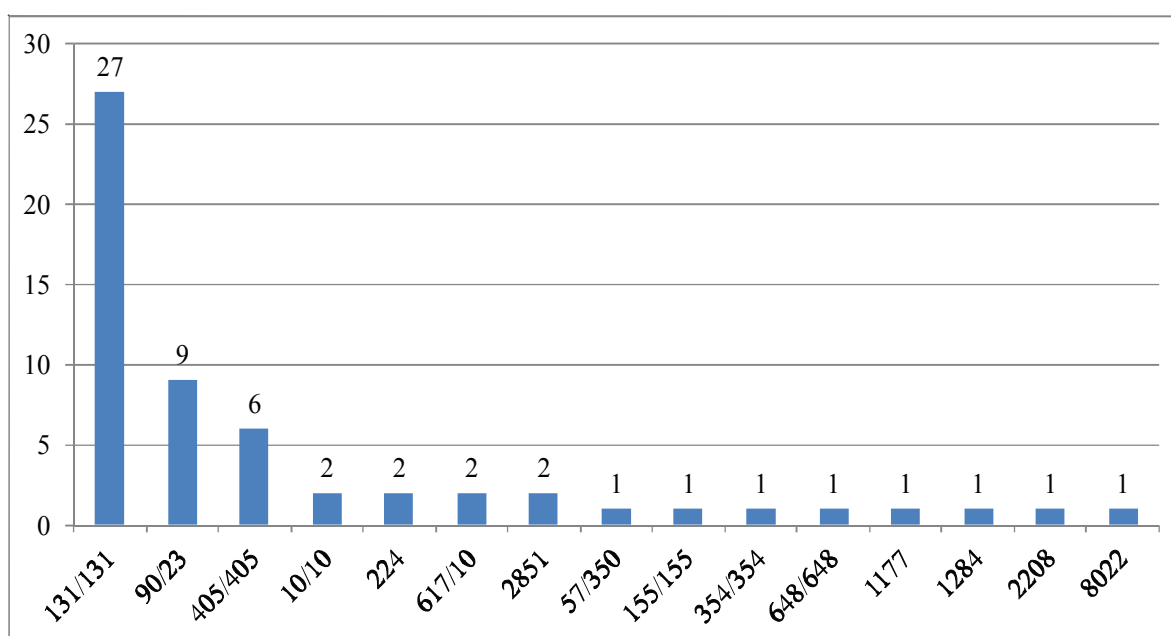


Figura 9. Distribuição dos 58 isolados tipados por MLST entre as linhagens ST detectadas.

A maioria (81,5%, 22 isolados) das linhagens ST/CC 131/131 foram identificadas como carreadoras do gene *bla*_{CTX-M-15}, mas três carregaram *bla*_{CTX-M-9}, e em duas foram identificados os genes *bla*_{CTX-M-8} ou *bla*_{CTX-M-14}. Entretanto, outras linhagens também se apresentaram como carreadoras de *bla*_{CTX-M-15}, como ST/CC 90/23 (21,6% dos 37 isolados carreadores do gene), ST/CC 10/10 ou ST 2851 (2 isolados cada uma, 5,4% dentre os carreadores de *bla*_{CTX-M-15}) e os ST/CC 617/10, ST 1284 ou ST 2208 (1

isolados cada uma, 2,7%). Seis linhagens carreadoras de *bla*_{CTX-M-9} foram identificadas como ST/CC 131/131 (3 isolados), ST/CC 354/354, ST/CC 405/405 ou ST 1177 (1 isolado cada uma). Somente duas linhagens carregaram o gene *bla*_{CTX-M-14}, sendo 4 isolados de ST/CC 405/405 e 1 de ST/CC 131/131. Já o gene *bla*_{CTX-M-8} foi carregado por 5 diferentes linhagens: ST224 (2 isolados), ST/CC 90/23, ST/CC 617/10, ST/CC 131/131 e ST 8022, com 1 isolado cada uma. Duas linhagens carreadoras de *bla*_{CTX-M-2} foram identificadas como ST/CC 57/350 ou ST/CC 155/155. O único representante da linhagem ST/CC 648/648 apresentou *bla*_{CTX-M-3}, e outro isolado ST/CC 405/405 carregou *bla*_{CTX-M-55} (**Figura 8**).

6 DISCUSSÃO

A resistência às fluoroquinolonas ciprofloxacina e à norfloxacin em 60 e 61 isolados, respectivamente (**Figura 3**), está de acordo com dados da literatura, que ressaltam o aumento da resistência às quinolonas devido ao uso dessas drogas tanto na medicina humana quanto na veterinária.⁽⁸⁰⁾ Todavia, estas taxas variam de acordo com cada região geográfica.^(6,81,82) No Brasil, já foram observados os maiores índices de resistência a quinolonas entre países latino-americanos.⁽⁸³⁾ Porém, a situação atual, no país, quanto à resistência às fluoroquinolonas carece de dados mais recentes, talvez, mesmo, por causa da já conhecida alta prevalência de resistência à ciprofloxacina em *E. coli* causadoras de ITU de origem comunitária no Brasil.⁽⁸⁴⁾ Uma explicação para tal observação pode ser o uso indiscriminado destes antibióticos para tratamento de infecções tanto no ambiente hospitalar como na comunidade.⁽⁸⁵⁾ De fato, as fluoroquinolonas ainda são bastante prescritas no mundo todo, apesar dos comprovados efeitos adversos e das altas taxas de resistência.⁽⁸⁶⁾ Entretanto, essa classe de antimicrobiano, historicamente muito utilizada para o tratamento de infecções urinárias⁽⁸⁷⁾, hoje em dia não representa mais as recomendações primárias de tratamento deste tipo de infecção, sendo reservada como alternativa terapêutica^(6,86). No presente estudo, todos os isolados apresentaram resistência a, ao menos, uma das fluoroquinolonas testadas; porém, este era um dos critérios para inclusão dos isolados no estudo, como mencionado na **seção 3.1**. Contudo, considerando que os 61 isolados foram adquiridos em um curto período de tempo (6 meses), ponderamos que esta quantidade representa um índice elevado de *E. coli* causadoras de ITU resistentes à fluoroquinolonas. Um estudo abrangendo as demais *E. coli* causadoras de ITU, porém sensíveis a estes

antimicrobianos, isoladas no mesmo período no HB, poderá revelar a prevalência destas bactérias na instituição.

Da mesma forma como analisada a resistência às fluoroquinolonas, 100% das *E. coli* do presente estudo foram resistentes às cefalosporinas de terceira e quarta geração (**Figura 3**), uma vez que este era outro critério para inclusão dos isolados. De acordo com Medina-Polo e colaboradores (2015) ⁽⁸⁸⁾, linhagens produtoras de ESBL geralmente apresentam resistência a outros antimicrobianos, tais como quinolonas e aminoglicosídeos. Sabe-se que genes que codificam ESBL estão, geralmente, localizados no mesmo plasmídeo em que são encontrados genes de resistência às quinolonas (PMQR) ⁽⁸⁹⁾. Esta associação da presença de genes que codificam ESBL e resistência à fluoroquinolonas na mesma cepa bacteriana pode ser uma explicação para a existência da grande quantidade dos isolados de *E. coli* coletados em apenas 6 meses no HB incluídos neste estudo. A taxa de infecções por Enterobacteriaceae produtoras de ESBL cresceu em todo o mundo nos últimos anos ⁽⁹⁰⁾, inclusive a incidência de portadores assintomáticos desse tipo de bactéria ⁽⁹¹⁾. No Brasil, não é diferente ⁽⁹²⁾. Um recente estudo relatou incidência superior a 85% de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL em pacientes admitidos em um hospital-escola no Ceará ⁽⁹³⁾. Mais uma vez, um estudo abrangendo todas as *E. coli* provenientes de ITU no HB entre dezembro de 2014 e maio de 2015 poderá ampliar nosso conhecimento sobre a taxa de incidência de *E. coli* produtoras de ESBL e resistentes a fluoroquinolonas causando infecção do trato urinário em pacientes admitidos no hospital.

Altas taxas de resistência ao trimetopim/sulfametoxazol e à gentamicina em *E. coli* causadoras de infecções, tanto na comunidade quanto em hospitais, tem sido constantemente relatadas em todo o mundo. ⁽⁹⁴⁻⁹⁸⁾ No presente estudo, 65,6% dos

isolados apresentaram resistência ao trimetropim/sulfametoxazol, e 53,3% à gentamicina (**Figura 3**). Genes que codificam resistência a esses antimicrobianos são encontrados como cassetes gênicos em integrons de classe 1 ⁽⁹⁹⁾, geralmente também carreadores de genes *bla*_{CTX-M}, o que facilita a disseminação deste e, concomitantemente, a dos demais genes de resistência a antimicrobianos associados ^(100,101). Assim, como no presente estudo foram analisadas somente *E. coli* sabidamente produtoras de ESBL, era esperado que muitos isolados também apresentassem resistência ao trimetropim/sulfametoxazol e à gentamicina.

Todas as *E. coli* isoladas no presente estudo se mostraram produtoras de ESBL do tipo CTX-M, o mais prevalente em todo o mundo, inclusive no Brasil ⁽⁹³⁾. A alta frequência de linhagens carreadoras de genes *bla*_{CTX-M} neste estudo está em acordo com dados previamente relatados relacionados a UPEC no Brasil ⁽¹⁰²⁾. Em nosso estudo, CTX-M-15 foi a ESBL predominante, detectada em 60,7% dos isolados (**Figura 4**). De acordo com Rocha e colaboradores (2019) ⁽⁹³⁾, CTX-M-2 e CTX-M-15 são as principais ESBLs disseminadas no Brasil. Vários estudos já descreveram *bla*_{CTX-M-2} como a variante predominante em Enterobacteriaceae isoladas em hospitais no país ^(7,93,100,102-104). Entretanto, em vários países, e também no Brasil, tem crescido o número de relatos da detecção de linhagens carreadoras de *bla*_{CTX-M-15} ^(93,102-105), e o gene tem-se disseminado em ambientes onde *bla*_{CTX-M-2} sempre foi predominante ⁽¹⁰⁰⁻¹⁰⁴⁾. Esta realidade está de acordo com os resultados encontrados neste estudo, que mostram a predominância de *bla*_{CTX-M-15} em detrimento de *bla*_{CTX-M-2}, encontrado em apenas três isolados. Um recente estudo relatou uma alta prevalência de *E. coli* produtoras de CTX-M-15 causando infecção urinária no Rio de Janeiro ⁽¹⁰²⁾. A disseminação mundial de CTX-M-15 entre as Enterobacteriaceae, não somente as causadoras de infecções, mas

também as colonizantes, tem sido grandemente relacionada à sua presença em linhagens específicas muito bem sucedidas ^(100,106), o que foi corroborado no presente estudo com a presença acentuada da linhagem ST/CC 131/131 carreadora de *bla*_{CTX-M-15}.

A maior diversidade de fatores de virulência e o maior número de isolados com diferentes genes de virulência foram observados em membros do filogruppo B2. Linhagens dos grupos filogenéticos B2 e D, onde, geralmente, estão incluídas as UPEC, frequentemente carregam determinantes de virulência ausentes em linhagens dos filogrupos A e B1, mais associadas a bactérias comensais ⁽¹⁰⁶⁾. Foi interessante observar, entretanto, que isolados dos filogrupos A e B1 também apresentaram alguns dos genes de virulência associados à ITU, e, em contrapartida, alguns isolados B2 ou D apresentaram poucos genes de virulência (**Figura 8**). Grande parte dos isolados (44,3%) apresentou, concomitantemente, genes relacionados à produção de adesina, de cápsula polissacarídica, de toxina, e de receptores de sideróforos, além da proteína Usp específica de UPEC (**Figura 7**). Esse fenótipo demonstra o potencial patogênico das *E. coli* isoladas, bem como comprova a associação dessas características com infecções do trato urinário. Ainda, a tipagem molecular por PFGE demonstrou uma baixa similaridade genética entre os isolados, que, de maneira geral, não se agrupam (**Figura 8**), evidenciando que tais cepas virulentas estão presentes na comunidade, e iniciam o processo infeccioso a partir de fatores ambientais ou internos de cada indivíduo. Assim, as ITU às quais os isolados estudados estão relacionados devem ter sido decorrentes da migração destas *E. coli* do TGI dos pacientes para o trato urinário, ou a aquisição destas bactérias se deu a partir da sua presença em alimentos ⁽¹⁰⁷⁾. Este fato explica a diversidade genética de linhagens encontrada neste estudo. O mesmo fato é amplamente estudado, e um recente estudo mostrou que, apesar da alta diversidade genética

encontrada entre *E. coli* causadoras de ITU, especialmente carreadoras do gene *bla*_{CTX-M-15}, pela técnica de PFGE, a tipagem por MLST demonstrou uma dominância da linhagem ST/CC 131/131 ⁽¹⁰⁸⁾. O mesmo foi observado no presente estudo, onde houve predominância da linhagem ST/CC 131/131 produtora de CTX-M-15 e com relativa diversidade genética entre si (**Figura 8**). Este clone pertence ao grupo filogenético B2, sorotipo O25b:H4, e é a principal linhagem patogênica extraintestinal de *E. coli*, grande responsável pela disseminação global de *bla*_{CTX-M-15} ⁽¹⁰⁹⁾. Uma característica adicional de um subclone globalmente disseminado é a resistência à ciprofloxacina e a presença da adesina fimbrial do tipo *fimH30* ^(109,110). Assim, o sequenciamento do gene *fimH*, detectado em todos os isolados ST/CC 131/131, poderá elucidar se os mesmos se tratam deste subclone mundialmente disseminado. Os isolados desta linhagem identificados neste estudo apresentaram diversos fatores de virulência associados à adesão, síntese de cápsula, produção de toxinas, produção de sideróforos e produção da proteína Usp específica de UPEC (**Figura 8**). De fato, a prevalência global de ST/CC 131/131 entre os isolados clínicos ocorre porque esta linhagem é mais virulenta, o que lhe tem proporcionando vantagem física no nicho patogênico. ⁽¹¹⁰⁾

Outros isolados pertencentes à linhagem ST/CC 131/131 carregaram outras variantes de *bla*_{CTX-M}, sendo três carreadores de *bla*_{CTX-M-9}, um carreador de *bla*_{CTX-M-8} e um de *bla*_{CTX-M-14}. De fato, diversas outras variantes já foram detectadas nesta linhagem, tais como CTX-M-1, -2, -3, -10, -18, -24, -27, -28, -32, -39, -52, -55, -65 e -103 ⁽⁶⁰⁾. Por outro lado, outras linhagens também carregaram *bla*_{CTX-M-15} no presente estudo, como ST/CC 10/10, ST/CC 90/23, ST 2208 e ST 2851 (**Figura 8**). As duas primeiras são mais relatadas na literatura científica, tendo sido previamente identificadas como produtoras de CTX-M-15 em diferentes localidades. ⁽¹¹¹⁻¹¹⁵⁾

Com relação às demais linhagens de *E. coli* identificadas e o *bla*_{CTX-M} relacionado a elas, as variantes do grupo 9 de *bla*_{CTX-M} detectadas, *bla*_{CTX-M-9} e *bla*_{CTX-M-14}, foram carregadas, além da linhagem ST/CC 131/131, como mencionado anteriormente, pelas ST/CC 354/354, ST/CC 405/405 ou ST 1177 (**Figura 8**). *E. coli* ST/CC 405/405 já foi relatada causando infecção do trato urinário carregando *bla*_{CTX-M} do grupo 9 ou não. ⁽¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾ ST/CC 354/354 foi detectada recentemente carregando *bla*_{CTX-M-24} em infecções no Líbano ⁽¹¹⁹⁾ e *bla*_{CTX-M-14} ou *bla*_{CTX-M-15} em ITU na China ⁽¹²⁰⁾. O gene *bla*_{CTX-M-8} foi detectado, além de na ST/CC 131/131, também nas linhagens ST/CC 90/23 e ST 224 (**Figura 8**). Esta última já foi detectada, no Brasil, como uma cepa hipervirulenta causadora de infecção fatal em gato doméstico ⁽¹²¹⁾ e como colonizante em búfalo de produção ⁽¹²²⁾, em ambos os casos produtora de CTX-M-8; em outras regiões, a linhagem ST 224 também esteve associada à ITU em humanos, porém carregando *bla*_{CTX-M-14} ou *bla*_{CTX-M-15}, na China ⁽¹²⁰⁾ ou ITU em gato na França, carregando *bla*_{CTX-M-32} ⁽¹²³⁾. *E. coli* ST/CC 648/648 também já foi detectada causando ITU em humanos, porém, diferentemente do presente estudo, na China eram carregadoras de *bla*_{CTX-M-14} ou *bla*_{CTX-M-15} ⁽¹²⁰⁾, enquanto aqui, *bla*_{CTX-M-3} (**Figura 8**), uma variante do grupo 1 de *bla*_{CTX-M}, como *bla*_{CTX-M-15} ⁽¹²⁴⁾. A terceira variante do grupo 1 de *bla*_{CTX-M} identificada neste estudo, *bla*_{CTX-M-55} (**Figura 8**), era carregada por uma *E. coli* ST/CC 405/405, o mesmo já relatado em países asiáticos, onde este gene é bastante disseminado ^(125,126). Além disso, também foi identificada como causa de ITU na China, porém carregando *bla*_{CTX-M-14} ou *bla*_{CTX-M-15}, ou mesmo outros genes produtores de ESBL ⁽¹²⁰⁾. *E. coli* produtoras de CTX-M-2 já foram identificadas no Brasil como pertencentes à linhagem ST/CC 155/155 isoladas de frangos e carnes de frango ^(127,128). Novamente, na China, essa linhagem foi detectada causando ITU e produzindo CTX-M-

14 ⁽¹²⁰⁾. É interessante resumir que, o estudo de Cao e colaboradores (2014) ⁽¹²⁰⁾, caracterizando *E. coli* isoladas de infecções do trato urinário na China, identificou, além de outras, sete linhagens também detectadas neste estudo, como ST/CC 131/131, ST 224, ST/CC 354/354, ST/CC 405/405, ST/CC 648/648, ST 1284 e ST 2208. Isso indica que sua presença neste estudo no Brasil não é fortuita e, sim, corrobora o potencial patogênico de tais *E. coli* em causar ITU.

7 CONCLUSÕES

Foi investigada e avaliada *E. coli* resistentes a cefalosporinas de terceira geração isoladas de pacientes com ITU, permitindo concluir que a presença de linhagens *E. coli* produtora de ESBL e resistente à fluoroquinolonas está, principalmente, relacionada à microbiota de cada paciente.

Pela comparação do grupo filogenético e similaridade genética usando-se a tipagem molecular por análise do perfil de macrorrestrição do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE) e sequenciamento de multilocus (MLST), pôde comparar que as linhagens encontradas em São José do Rio Preto, SP, são as mesmas distribuídas em todo o mundo carreadoras dos mesmos genes *bla_{CTX-M}* e potenciais causadoras de ITU ou distribuídas em alimentos ou como comensais de animais, demonstrando sua ampla disseminação e facilidade de aquisição.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Totsika M, Moriel DG, Idris A, Rogers BA, Wurpel DJ, Phan MD, Paterson DL, Schembri MA. Uropathogenic *Escherichia coli* mediated urinary tract infection. **Curr Drug Targets**, 13(11):1386-99. 2012.
- 2- Bergeron CR, Prussing C, Boerlin P, Daignault D, Dutil L, Reid-Smith RJ, Zhanel GG, Manges AR. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. **Emerg Infect Dis**, 18(3):415-21. 2012.
- 3- Nicolle LE. Urinary tract infection. **Crit Care Clin**, 29(3):699-715. 2013.
- 4- Subashchandrabose S, Smith SN, Spurbeck RR, Kole MM, Mobley HL. Genome-wide detection of fitness genes in uropathogenic *Escherichia coli* during systemic infection. **PLoS Pathog**, 9(12):e1003788. 2013.
- 5- Teichmann A, Agra HN, Nunes Lde S, da Rocha MP, Renner JD, Possuelo LG, Carneiro M, Rieger A, Benitez LB, Valim AR. Antibiotic resistance and detection of the *sul2* gene in urinary isolates of *Escherichia coli* in patients from Brazil. **J Infect Dev Ctries**, 8(1):39-43. 2014.
- 6- Gupta K, Grigoryan L, Trautner B. Urinary Tract Infection. **Ann Intern Med**, 167(7):ITC49-ITC64. 2017.
- 7- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., and Hultgren, S. J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nat. Rev. Microbiol.** 13, 269–284. 2015.
- 8- Jakobsen L, Garneau P, Bruant G, Harel J, Olsen SS, Porsbo LJ, Hammerum AM, Frimodt-Møller N. Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 31(6):1121-9. 2012.
- 9- Nordstrom L, Liu CM, Price LB. Foodborne urinary tract infections: a new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness. **Front Microbiol**, 4:29. 2013.
- 10- Stapleton AE. Urinary tract infection pathogenesis: host factors. **Infect Dis Clin North Am**, 28(1):149-59. 2014.
- 11- Johnson JR, Russo TA. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **Int J Med Microbiol**, 295(6-7):383-404. 2005.

- 12-Chen SL, Wu M, Henderson JP, Hooton TM, Hibbing ME, Hultgren SJ, Gordon JI. Genomic diversity and fitness of *E. coli* strains recovered from the intestinal and urinary tracts of women with recurrent urinary tract infection. **Sci Transl Med**, 5(184):184ra60. 2013.
- 13-Sivick KE, Mobley HL. Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: winning back the urinary tract. **Infect Immun**, 78(2):568-85. 2010.
- 14-Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J Infect Dis**, 181(1):261-72. 2000.
- 15-Xia X, Meng J, McDermott PF, Zhao S. *Escherichia coli* from retail meats carry genes associated with uropathogenic *Escherichia coli*, but are weakly invasive in human bladder cell culture. **J Appl Microbiol**, 110(5):1166-76. 2011.
- 16-Subashchandrabose S, Mobley HL. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiol Spectr**, 3(4): 10.1128. 2015.
- 17-Poolman, J.T. Bacterial Vaccine Discovery & Early Development, Janssen, Leiden, The Netherlands. **Elsevier Inc.** 585-593, 2017.
- 18-Howard SJ, Hopwood S, Davies SC. Antimicrobial resistance: a global challenge. **Sci Transl Med**, 6(236):236ed10. 2014.
- 19-Brenner DJ, Farmer III JJ. Family I. Enterobacteriaceae. In: GARRITY, G. *et al.* (Eds.). . **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria**. 2nd. ed. New York, NY: Springer-Verlag New York Inc., 2005. p. 607–624.
- 20-PHE. **UK Standards for microbiology Investigations - Identification of Enterobacteriaceae**. London: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>>. 2015.
- 21-Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, S Gupta R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**. 66(12):5575-5599. 2016.

- 22-Robins-Browne RM, Holt KE, Ingle DJ, Hocking DM, Yang J, Tauschek M. Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? **Front Cell Infect Microbiol**, 6:141. 2016.
- 23-Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. **Curr Top Microbiol Immunol**, 358:3-32. 2013.
- 24-Koneman, E.W.; Winn Jr, W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C.; Winn, J.R.; Procop, G.; Woods, G. Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido. 6ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008. 1565p.
- 25-Drawz, S.M; Bonomo, R.A. Three decades of beta-lactamases inhibitors. **ClinMicrobiol Rev.** v.23, n.1 p.160-201, Jan. 2010.
- 26-Suárez, C; Gudiol, F. Antibióticos betalactámicos. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** v. 27, n.2, p.116-129, Feb. 2009.
- 27-Schneider T, Sahl HG. An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. **Int J Med Microbiol**, 300(2-3):161-9. 2010.
- 28-WHO. World Health Organization. Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. **WHO Regional Office for Europe**, Copenhagen: 88 p. 2011. Disponível em: <<http://www.euro.who.int/en/what-we-publish/full-list-of-books>>. Último acesso em 10 de junho de 2019.
- 29-OIE. World Organization for Animal Health. **List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance.** 2014. Disponível em <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/OIE_list_antimicrobials.pdf>. Acesso em: 23 abril 2019.
- 30-Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, Moran GJ, Nicolle LE, Raz R, Schaeffer AJ, Soper DE; Infectious Diseases Society of America; European Society for Microbiology and Infectious Diseases. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. **Clin Infect Dis**, 52(5):e103-20. 2011.
- 31-Minarini LA, Camargo IL, Pitondo-Silva A, Darini AL. Multilocus sequence typing of uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* isolated in a Brazilian community. **Curr Microbiol**, 55(6):524-9. 2007.

- 32-Thiébaud AC, Arlet G, Andremont A, Papy E, Sollet JP, Bernède-Bauduin C, Guillemot D, Schlemmer B; ColoRea Study Group. Variability of intestinal colonization with third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae and antibiotic use in intensive care units. **J Antimicrob Chemother**, 67(6):1525-36. 2012.
- 33-Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, 54(3):969-76. 2010.
- 34-Gutkind GO, Di Conza J, Power P, Radice M. β -lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. **Curr Pharm Des**, 19(2):164-208. 2013.
- 35-Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, 48(1):1-14. 2004.
- 36-Hawkey PM. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. **Publ J Pharmacol**, 153:S406-S413. 2008.
- 37-Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum β -lactamases. **Clin Microbiol Infect**, 14(suppl.1):42-52. 2008.
- 38-Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. **Clin Microbiol Rev**, 26(4):744-58. 2013.
- 39-Doi Y, Iovleva A, Bonomo RA. The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. **J Travel Med**. 2017 Apr 1;24(suppl_1):S44-S51.
- 40-Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, 18(5):294-298. 1990.
- 41-Rodríguez MM, Power P, Bauvois C, Di Conza J, Ayala JA, Galleni M, Gutkind G. Characterisation of KLUA-9, a β -lactamase from extended-spectrum cephalosporin-susceptible *Kluyvera ascorbata*, and genetic organisation of *bla*KLUA-9. **Int J Antimicrob Agents**, 29(3):332-337. 2007.
- 42-Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY β -lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, 50(9):3203-3206. 2006.

- 43-Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Crit Rev Microbiol**, 39(1):79-101. 2013.
- 44-Doublet B, Praud K, Nguyen-Ho-Bao T, Argudín MA, Bertrand S, Butaye P, Cloeckaert A. Extended-spectrum β -lactamase- and AmpC β -lactamase-producing D-tartrate-positive *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B from broilers and human patients in Belgium, 2008-10. **J Antimicrob Chemother**. 69(5):1257-1264. 2014.
- 45-Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. **Curr Opin Microbiol**, 9:466-475. 2006.
- 46-Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, Sirot J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240→Gly. **Antimicrob Agents Chemother**, 45(8):2269-2275. 2001.
- 47-Poirel L, Naas T, Le Thomas I, Karim A, Bingen E, Nordmann P. CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. **Antimicrob Agents Chemother**, 45(12):3355-3361. 2001.
- 48-Pitout JDD. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. **Expert Rev Anti Infect Ther**, 6:657-669. 2008.
- 49-Oliver A, Pérez-Díaz JC, Coque TM, Baquero F, Cantón R. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. **Antimicrob Agents Chemother**, 45(2):616-620. 2001.
- 50-Barlow M, Reik RA, Jacobs SD, Medina M, Meyer MP, McGowan JE Jr, Tenover FC. High rate of mobilization for *bla*CTX-Ms. **Emerg Infect Dis**, 14(3):423-428. 2008.
- 51-D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. **Int J Med Microbiol**, 303(6-7):305-17. 2013.
- 52-Dias VC, da Silva VL, Firmo Ede O, Bastos LQ, Bastos AN, Bastos RV, Diniz CG. Distribution of ESBL-producing enterobacteria associated to community-acquired monomicrobial urinary tract infections and antimicrobial susceptibility trends over a 9-year period. **J Chemother**, 24(3):178-81. 2012.

- 53-Abreu R, Castro B, Espigares E, Rodríguez-Álvarez C, Lecuona M, Moreno E, Espigares M, Arias A. Prevalence of CTX-M-Type Extended-Spectrum beta-Lactamases in *Escherichia coli* Strains Isolated in Poultry Farms. **Foodborne Pathog Dis**, 11(11):868-873. 2014.
- 54-Kassakian SZ, Mermel LA. Changing epidemiology of infections due to extended spectrum beta-lactamase producing bacteria. **Antimicrob Resist Infect Control**, 3(1):9. 2014.
- 55-MacVane SH, Tuttle LO, Nicolau DP. Impact of extended-spectrum β -lactamase-producing organisms on clinical and economic outcomes in patients with urinary tract infection. **J Hosp Med**, 9(4):232-8. 2014.
- 56-Rafaque Z, Dasti JI, Andrews SC. Draft genome sequence of a multidrug-resistant CTX-M-15 β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolate (ST131-O25b-H30) from Pakistan exhibiting high potential virulence. **J Glob Antimicrob Resist**. 15:164-165. 2018.
- 57-Ranjbar R, Karami A, Farshad S, Giammanco GM, Mammina C. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. **New Microbiol**, 37(1):1-15. 2014.
- 58-Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, 33(9):2233-9. 1995.
- 59-Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. **Infect Genet Evol**. 2013 Jun;16:38-53.
- 60-Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. **Clin Microbiol Rev**, 27(3):543-574. 2014.
- 61-Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, Bens M, Goujon J-M, Garry L, Clermont O, Denamur E, Arlet G, Vandewalle A. The CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* Clone O25b: H4-ST131 Has High Intestine Colonization and Urinary Tract Infection Abilities. **PLoS One**, 101371. 2012.
- 62-Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. **Int J Nephrol**, 2012:681473. 2012.

- 63-Ulett GC, Totsika M, Schaale K, Carey AJ, Sweet MJ, Schembri MA. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. **Curr Opin Microbiol**, 16(1):100-7. 2013.
- 64-Agarwal J, Srivastava S, Singh M. Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. **Indian J Med Microbiol**, 30(2):141-9. 2012.
- 65-Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Exp Mol Pathol**, 85(1):11-9. 2008.
- 66-Oelschlaeger TA, Hacker J. Uropathogenic *Escherichia coli* cytolysins. **Bacterial Protein Toxins**. Chapter 47. 2006.
- 67-Garcia EC, Brumbaugh AR, Mobley HL. Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. **Infect Immun**, 79(3):1225-35. 2011.
- 68-Črnigoj M, Podlesek Z, Budič M, Žgur-Bertok D. The *Escherichia coli* uropathogenic specific-protein-associated immunity protein 3 (Imu3) has nucleic acid-binding activity. **BMC Microbiol**, 14:16. 2014.
- 69-Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P. V.; Clark; D.P. **Microbiologia de Brock**. Traduzido de Brock Biology of Microorganisms. 12^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- 70-Sambrook, J.; Russel, D.W. **Molecular cloning**. A laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 71-Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**, 65:490-495. 2010.
- 72-Le Bouguénec C. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. **Int J Med Microbiol**, 295(6-7):471-8. 2005.
- 73-Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J Infect Dis**, 181(1):261-72. 2000.
- 74-Parham NJ, Pollard SJ, Desvaux M, Scott-Tucker A, Liu C, Fivian A, Henderson IR. Distribution of the Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae among Extraintestinal Clinical Isolates of *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, 43(8):4076-4082. 2005.
- 75-Mora A, Viso S, López C, Alonso MP, García-Garrote F, Dabhi G, Mamani R, Herrera A, Marzoa J, Blanco M, Blanco JE, Moulin-Schouleur M, Schouler C,

- Blanco J. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans. **Vet Microbiol**, 167(3-4):506-12. 2013.
- 76-Patricia Escobar-Páramo, Arnaud Le Menac'H, Tony Le Gall, Christine Amarin, Stéphanie Gouriou, et al.. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. **Environmental Microbiology**, Wiley-Blackwell, 2006, 8 (11), pp.1975-1984.
- 77-Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl Environ Microbiol**, 66(10):4555-8. 2000.
- 78-Doumith M, M. J. Day, a R. Hope, b J. Wain, a,c and N. Woodford. 2012. Improved Multiplex PCR Strategy for Rapid Assignment of the Four Major *Escherichia coli* Phylogenetic Groups. **Journal of Clinical Microbiology** p. 3108 –3110. 2012.
- 79-CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **Twenty-Fourth Informational Supplement M100-S24**. v.34, n.1. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014.
- 80-Correia S, Poeta P, Hébraud M, Capelo JL, Igrejas G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? **J Med Microbiol**, 66(5):551-559. 2017.
- 81-Moyo S; Aboud S; Kasubi M; Maselle SY. Bacterial isolated from blommstream infections at a tertiary hospital in Dar ES Salaam, Tanzania-antimicrobial resistance of isolates. **S Afr Med J**, 1; 100(12)8358. 2010.
- 82-Sultan B, White JÁ, Fish R, Carrick G, Brima N, Copas A, Robinson A, Gilson R, Mercey, D, Benn P. 2016. The “3 in 1” study: pooling self-taken pharyngeal, urethral, and rectal samples into a single sample for analysis for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in men Who have sex with men. **J Clin Microbiol**. 54:650-56. 2015.
- 83-Minarini LA, Darini AL. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. **Braz J Microbiol**. 43(4):1309-14. 2012.
- 84-Bonelli RR, Moreira BM, Picão RC. Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: history, current dissemination status and associated socioeconomic factors. **Drug Resist Updat**, 17(1-2):24-36. 2014.
- 85-Shenagari M, Bakhtiari M, Mojtahedi A, Atrkar Roushan Z. High frequency of mutations in *gyrA* gene associated with quinolones resistance in uropathogenic

- Escherichia coli* isolates from the north of Iran. **Iran J Basic Med Sci**, 21:1226-1231. 2018.
- 86-Van TT, Minejima E, Chiu CA, Butler-Wu SM. Don't Get Wound Up: Revised Fluoroquinolone Breakpoints for Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol**, pii: JCM.02072-18. 2019.
- 87-Fasugbba O, Gardner A, Mitchell BG, Mnatzaganian G. Ciprofloxacin resistance in community-and hospital-acquired *Escherichia coli* urinary tract infection: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **BMC Infect Dis**. 25; 15:545. 2015.
- 88-Medina-Polo J, Arrébola-Pajares A, Perez-Cadavid S, Benítez-Sala R, Sopeña-Sutil R, Lara-Isla A, et al. Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacterial in a Urology Ward: Epidemiology, Risk, Factors and Antimicrobial Susceptibility Patterns. **Urol Int**. 2015. 95(3):288-92.
- 89-Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**, 53(6):2227-2238. 2009.
- 90-McDanel J, Schweizer M, Crabb V, Nelson R, Samore M, Khader K, Blevins AE, Diekema D, Chiang HY, Nair R, Perencevich E. Incidence of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* Infections in the United States: A Systematic Literature Review. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 38(10):1209-1215. 2017.
- 91-Pilmis B, Cattoir V, Lecoindre D, Limelette A, Grall I, Mizrahi A, Marcade G, Poilane I, Guillard T, Bourgeois Nicolaos N, Zahar JR, Le Monnier A. Carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae in French hospitals: the PORTABLESE study. **J Hosp Infect**, 98(3):247-252. 2018.
- 92-Sampaio JL, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Braz J Microbiol**, 47 Suppl 1:31-37. 2016.
- 93-Rocha FR, Fehlberg LCC, Cordeiro-Moura JR, Ramos AC, de Paulo Teixeira Pinto V, Barbosa FCB. High Frequency of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Strains Isolated from a Teaching Hospital in Brazil. *Microb Drug Resist*. 2019. doi: 10.1089/mdr.2018.0142. [Epub ahead of print].
- 94-Dharmapalan D, Shet A, Yewale V, Sharland M. High Reported Rates of Antimicrobial Resistance in Indian Neonatal and Pediatric Blood Stream Infections. **J Pediatric Infect Dis Soc**. 6(3):e62-e68. 2017.

- 95-Abayneh M, Tesfaw G, Abdissa A. Isolation of Extended-Spectrum β -lactamase- (ESBL-) Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Patients with Community-Onset Urinary Tract Infections in Jimma University Specialized Hospital, Southwest Ethiopia. **Can J Infect Dis Med Microbiol**, 2018:4846159. 2018.
- 96-Hojabri Z, Mirmohammadkhani M, Darabi N, Arab M, Pajand O. 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. **Infect Drug Resist**, 12:893-903. 2019.
- 97-Reed TAN, Krang S, Miliya T, Townell N, Letchford J, Bun S, Sar B, Osbjør K, Seng S, Chou M, By Y, Vanchinsuren L, Nov V, Chau D, Phe T, de Lauzanne A, Ly S, Turner P; Cambodia Technical Working Group on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance in Cambodia: a Review. **Int J Infect Dis**. pii: S1201-9712(19)30244-9. 2019.
- 98-Tian L, Zhang Z, Sun Z. Antimicrobial resistance trends in bloodstream infections at a large teaching hospital in China: a 20-year surveillance study (1998-2017). **Antimicrob Resist Infect Control**, 8:86. 2019.
- 99-Casella T, Rodríguez MM, Takahashi JT, Ghiglione B, Dropa M, Assunção E, Nogueira ML, Lincopan N, Gutkind G, Nogueira MC. Detection of *bla*_{CTX-M}-type genes in complex class 1 integrons carried by Enterobacteriaceae isolated from retail chicken meat in Brazil. **Int J Food Microbiol**, 16;197:88-91. 2015.
- 100- Chong Y, Shimoda S, Shimono N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Infect Genet Evol**, 61:185-188. 2018.
- 101- Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: origin and diffusion. **Front Microbiol**, 3:110. 2012.
- 102- Pavoni Gomes Chagas T, da Silva Caldeira LF, Vidal Pedinotti Zuma A, Cassiano de Oliveira I, D'Alincourt Carvalho-Assef AP, Dutra Asensi M, Piffano Costa Pellegrino FL. CTX-M-15-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolates at Rio de Janeiro, Brazil: Molecular epidemiology and MALDI-TOF MS. **New Microbiol**, 42(2):121-124. 2019.
- 103- Tollentino, F.M.; Polotto, M.; Nogueira, M.L.; Lincopan, N.; Neves, P.; Mamizuka, E.M.; Remeli, G.A.; De Almeida, M.T.; Rúbio, F.G.; Nogueira, M.C. High prevalence of *bla*_{CTX-M} extended spectrum beta-lactamase genes in

- Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-31}, *bla*_{SHV-38}, and *bla*_{CTX-M-15} in Brazil. **Microb Drug Resist**, 17(1):7-16. 2011.
- 104- Cergole-Novella MC, Pignatari ACC, Castanheira M, Guth BEC. Molecular typing of antimicrobial-resistant Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC) in Brazil. **Res Microbiol**, 162(2): 117-123. 2011.
- 105- Belmar Campos C, Fenner I, Wiese N, Lensing C, Christner M, Rohde H, Aepfelbacher M, Fenner T, Hentschke M. Prevalence and genotypes of extended spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from human stool and chicken meat in Hamburg, Germany. **Int J Med Microbiol**, pii: S1438-4221(14)00048-4. 2014.
- 106- Valentin L, Sharp H, Hille K, Seibt U, Fischer J, Pfeifer Y, Michael GB, Nickel S, Schmiedel J, Falgenhauer L, Friese A, Bauerfeind R, Roesler U, Imirzalioglu C, Chakraborty T, Helmuth R, Valenza G, Werner G, Schwarz S, Guerra B, Appel B, Kreienbrock L, Käsbohrer A. Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. **Int J Med Microbiol**, 304(7):805-816. 2014.
- 107- Asadi Karam MR, Habibi M, Bouzari S. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic *Escherichia coli*. **Mol Immunol**, 108:56-67. 2019.
- 108- Arana DM, Sánchez A, Bautista V, Oteo-Iglesias J, Alós JI. ESBL-producing-multidrug resistant *E. coli* population from urinary tract infections is less diverse than non-ESBL-multidrug resistant population. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, pii: S0213-005X(19)30144-2. 2019.
- 109- Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M Beta-Lactamase: temporal and geographical shifts in genotype. **J Antimicrob Chemother**. 72(8):2145-2155. 2017.
- 110- Benerjee R, Johnson JR. A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of *Escherichia coli*. Sequence type 131. **Antimicrob Agents Chemother**. 58(9):4997-5004. 2014.
- 111- Bado I, Gutiérrez C, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Araújo Pirez L, Seija V, Bazet C, Rieppi G, Vignoli R. CTX-M-15 in combination with aac(6)-Ib-cr is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay. **J Glob Antimicrob Resist**, 6:5-9. 2016.

- 112- Potron A, Bernabeu S, Cuzon G, Pontières V, Blanchard H, Seringe E, Naas T, Nordmann P, Dortet L. Analysis of OXA-204 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae reveals possible endoscopy-associated transmission, France, 2012 to 2014. **Euro Surveill**, 22(49). 2017.
- 113- Sartori L, Fernandes MR, Ienne S, de Souza TA, Gregory L, Cerdeira L, Lincopan N. Draft genome sequences of two fluoroquinolone-resistant CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST90 (ST23 complex) isolated from a calf and a dairy cow in South America. **J Glob Antimicrob Resist**, 11:145-147. 2017.
- 114- Founou LL, Founou RC, Allam M, Ismail A, Essack SY. Draft genome sequence of an extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-15)-producing *Escherichia coli* ST10 isolated from a nasal sample of an abattoir worker in Cameroon. **J Glob Antimicrob Resist**, 14:68-69. 2018.
- 115- Falgenhauer L, Imirzalioglu C, Oppong K, Akenten CW, Hogan B, Krumkamp R, Poppert S, Levermann V, Schwengers O, Sarpong N, Owusu-Dabo E, May J, Eibach D. Detection and Characterization of ESBL-Producing *Escherichia coli* From Humans and Poultry in Ghana. **Front Microbiol**, 9:3358. 2019.
- 116- Kim S, Sung JY, Cho HH, Kwon KC, Koo SH. Characteristics of the Molecular Epidemiology of CTX-M-Producing *Escherichia coli* Isolated from a Tertiary Hospital in Daejeon, Korea. **J Microbiol Biotechnol**, 26(9):1643-9. 2016.
- 117- Aung MS, San N, Maw WW, San T, Urushibara N, Kawaguchiya M, Sumi A, Kobayashi N. Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase and Carbapenemase Genes in Clinical Isolates of *Escherichia coli* in Myanmar: Dominance of *bla*_{NDM-5} and Emergence of *bla*_{OXA-181}. **Microb Drug Resist**, 24(9):1333-1344. 2018.
- 118- Roy Chowdhury P, McKinnon J, Liu M, Djordjevic SP. Multidrug Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* ST405 With a Novel, Composite IS26 Transposon in a Unique Chromosomal Location. **Front Microbiol**, 9:3212. 2019.
- 119- Dagher C, Salloum T, Alousi S, Arabaghian H, Araj GF, Tokajian S. Molecular characterization of Carbapenem resistant *Escherichia coli* recovered from a tertiary hospital in Lebanon. **PLoS One**, 13(9):e0203323. 2018.

- 120- Cao X, Zhang Z, Shen H, Ning M, Chen J, Wei H, Zhang K. Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with urinary tract infections. **APMIS**, 122(11):1088-95. 2014.
- 121- Silva MM, Sellera FP, Fernandes MR, Moura Q, Garino F, Azevedo SS, Lincopan N. Genomic features of a highly virulent, ceftiofur-resistant, CTX-M-8-producing *Escherichia coli* ST224 causing fatal infection in a domestic cat. **J Glob Antimicrob Resist**, 15:252-253. 2018.
- 122- Aizawa J, Neuwirt N, Barbato L, Neves PR, Leigue L, Padilha J, Pestana de Castro AF, Gregory L, Lincopan N. Identification of fluoroquinolone-resistant extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-8)-producing *Escherichia coli* ST224, ST2179 and ST2308 in buffalo (*Bubalus bubalis*). **J Antimicrob Chemother**, 69(10):2866-9. 2014.
- 123- Dahmen S, Haenni M, Châtre P, Madec JY. Characterization of *bla*_{CTX-M} IncFII plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. **J Antimicrob Chemother**, 68(12):2797-801. 2013.
- 124- Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Crit Rev Microbiol**, 39(1):79-101. 2013.
- 125- Zhang J, Zheng B, Zhao L, Wei Z, Ji J, Li L, Xiao Y. Nationwide high prevalence of CTX-M and an increase of CTX-M-55 in *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset infections in Chinese county hospitals. **BMC Infect Dis**, 14:659. 2014.
- 126- Wang S, Zhao SY, Xiao SZ, Gu FF, Liu QZ, Tang J, Guo XK, Ni YX, Han LZ. Antimicrobial Resistance and Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Causing Bloodstream Infections in Three Hospitals in Shanghai, China. **PLoS One**, 11(1):e0147740. 2016.
- 127- Ferreira JC, Penha Filho RA, Andrade LN, Berchieri A Junior, Darini AL. Detection of chromosomal *bla*_{CTX-M-2} in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens. **Clin Microbiol Infect**, 20(10):O623-6. 2014.
- 128- Casella T, Haenni M, Madela NK, Andrade LK, Pradela LK, Andrade LN, Darini ALDC, Madec JY, Nogueira MCL. Extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from chickens and chicken meat in Brazil is associated with rare and complex resistance plasmids and pandemic ST lineages. **J Antimicrob Chemother**, 73(12):3293-3297. 2018.

Anexo1. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentado pelas *E. coli* isoladas de pacientes com ITU.

Isolados	Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos																
	AK	AMC	AMP	KF	FEP	CAZ	CRO	CIP	ETP	FOS	CN	IPM	MER	NTF	NOR	TZP	STX
A1	S	R	NT	NT	ESBL	ESBL	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R
A4	S	ESBL	R	ESBL	ESBL	ESBL	ESBL	R	S	NT	S	S	S	NT	NT	S	R
A13	S	S	R	ESBL	ESBL	ESBL	ESBL	R	S	NT	R	S	S	NT	NT	S	R
A14	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	NT	S	S	R	S	R
A17	S	I	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S
A20	S	I	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	NT	S	S	R	S	R
A21	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S
A23	S	R	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	NT	R	S	S	NT	NT	S	R
A24	S	I	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	NT	R	S	S	S	NT	I	R
A29	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
A32	S	S	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	NT	S	NT	S	NT	NT	S	S
A33	S	I	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R
A34	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	I	R	S	R
A50	S	R	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	NT	S	NT	S	NT	NT	I	S
A53	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	NT	S	S	NT	NT	S	R	S	S
A55	S	R	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	R	NT	S	S	NT	NT	S	R
A58	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R
A59	I	R	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	R	I	S
A61	S	R	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S
A74	S	R	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R
A82	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R
A91	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
A95	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S
A99	S	R	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	R	NT	R	S	R	NT	NT	R	R

A118	R	R	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	R	NT	S	R	R	NT	NT	R	R
A122	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R
A123	S	R	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
A145	S	R	NT	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	R	NT	R	R	R	NT	NT	R	R
A165	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S
A166	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R
A168	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S
A182	S	S	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	NT	S	S	S	NT	NT	S	R
A187	I	I	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
A188	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R
A191	S	R	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	NT	R	S	S	NT	NT	S	S
A202	S	I	NT	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	NT	R	S	S	NT	NT	R	R
A204	S	S	R	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R
A211	S	I	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	NT	R	S	S	NT	NT	S	S
A212	S	S	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	NT	R	S	S	NT	NT	S	R
A216	S	S	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	NT	S	NT	S	NT	NT	S	S
A217	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
A219	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
A220	S	I	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	NT	S	R
A221	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
A223	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
A229	S	S	N/T	N/T	ESBL	N/T	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
A233	S	R	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R
A234	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	NT	S	R	NT	NT	S	R	S	R
A242	R	I	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
A243	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
A254	S	R	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	NT	S	S	S	NT	NT	S	R

A258	S	I	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	NT	R	S	S	NT	NT	I	R
A259	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	R	S	NT	S	S	R	S	S
A262	S	R	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	NT	R	S	S	NT	NT	S	R
A263	S	S	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	NT	R	S	S	NT	NT	S	S
A264	S	R	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	R	I	R
A267	S	I	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R
A273	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
A274	S	I	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	S	NT	R	S	S	NT	NT	S	R
A283	S	I	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R
A287	S	I	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
A304	S	S	R	ESBL	ESBL	NT	ESBL	R	NT	NT	S	S	S	NT	NT	S	R
A311	S	I	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R
A323	S	S	NT	NT	ESBL	NT	ESBL	R	S	S	S	NT	S	S	R	S	S

AMP = ampicilina, AMC = amoxicilina/ácido clavulânico, KF = cefalotina, TZP = piperacilina/tazobactam, ETP = ertapenem, CAZ = ceftazidima, FEP = cefepima, AK = amikacina, CM = gentamicina, CS = colistina, STX = sulfâ/ trimetoprim, CIP = ciprofloxacina NOR = norfloxacina. R = resistente, S = sensível, I = intermediário. NT= não testado. ESBL = produtor de beta-lactamase de espectro estendido.