



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

**JÉSSICA FERNANDES DE SOUSA**

**PERFIL DE VIRULÊNCIA E FILOGENÉTICA DE ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *Escherichia coli* RESISTENTES A CARBAPENEM  
RECUPERADOS EM HOSPITAIS DE BRASÍLIA-DF**

BRASÍLIA, DF

2019

**JÉSSICA FERNANDES DE SOUSA**

**PERFIL DE VIRULÊNCIA E FILOGENÉTICA DE ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *Escherichia coli* RESISTENTES A CARBAPENEM  
RECUPERADOS EM HOSPITAIS DE BRASÍLIA-DF**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília para obtenção do grau de mestre.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Drº. Alex Leite Pereira

BRASÍLIA, DF

2019

Nome: Jéssica Fernandes De Sousa

Título: Perfil de virulência e filogenética de isolados clínicos de *Escherichia coli* resistentes a carbapenem recuperados em hospitais de Brasília-DF

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília para obtenção do grau de mestre

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### **Banca examinadora**

---

Prof.º Orientador: Drº. MScº. Alex Leite Pereira  
FCE/UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
Julgamento: \_\_\_\_\_

---

Prof.ª Drª. MScª. Larissa Fernandes Matos  
FCE/UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
Julgamento: \_\_\_\_\_

---

Profª. Drª. MScª. Daniela Castilho Orsi  
FCE/UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
Julgamento: \_\_\_\_\_

---

Profª. Drª Thais Alves da Costa Lamounier  
FCE/UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
Julgamento: \_\_\_\_\_

BRASÍLIA, DF

2019

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, minha avó Marilda, família, companheiro Dudu, amigos da vida e amigos da UnB.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a energia criadora do Universo e de todos os seres, pela possibilidade da compreensão de suas obras através do estudo. Agradeço também pela vida e pelas almas que foram escolhidas para me gerar e cuidar no mundo.

Agradeço aos meus pais por me oferecerem apenas seu melhor, me educando, amando, apoiando e me levantando todas as vezes que eu abaixei a cabeça. Acreditaram no meu potencial e força. Muito obrigada por terem feito de mim sua prioridade, e nunca terem desistido de mim. Vocês são meus exemplos de inteligência, coragem e força.

Agradeço a minha avó Marilda, que além de ter cuidado de seus filhos, também dedicou 27 anos de sua vida para cuidar e me educar como filha. Também agradeço por ter sido um exemplo, eu amo vê-la vestida de rosa todas as quintas, tenho certeza que todos da rede feminina te amam tanto quanto eu.

Agradeço ao meu namorado Dudu pela sua amizade, amor, apoio e cuidado que tem e teve comigo durante todos esses anos, por ser um amigo tão generoso com nossos amigos, por trocar comigo muitos ensinamentos e por me orgulhar com seu caráter, trabalho e dedicação. Ver o quanto você se descontrói para crescer e compreender as outras pessoas, me alegra profundamente.

Agradeço aos amigos que fiz na vida e os que roubei do Dudu, por estarem ao meu lado nos bons e maus momentos, por compartilharem suas vidas comigo, me ouvirem e me fazerem ouvir, por todo apoio, amor, carinho, lágrimas e sorrisos, vocês são essenciais. São minha segunda família.

Agradeço aos meus professores da faculdade por terem me ensinado não apenas sobre minha profissão, mas também sobre a vida. Agradeço também pela paciência, dedicação, amor, criatividade, persistência e amizade. Principalmente as professoras Tânia, Fernanda, Fabiola e professores Milton e Paulo.

Agradeço a Dr<sup>a</sup> Fátima Grossi, Dr<sup>a</sup> Nádia Parachin e Dr<sup>o</sup> Elibio Rech que me deram oportunidades para iniciar minha vida acadêmica e aprender sobre ciência.

Agradeço enormemente ao meu orientador professor Alex, pela grande oportunidade que me foi dada, por ter confiado em mim e ter me oferecido um projeto ao qual eu iria me entregar. Agradeço pela forma com a qual vem me guiando e pela amizade, agradeço pela sua dedicação e amor por seus alunos e por mudar nossas vidas diariamente. Você é único em todos os sentidos.

Agradeço as lindas amizades que fiz no laboratório, me ajudaram não apenas na execução desse trabalho como também me ajudaram trazendo luz e alegria para meus dias, tornando-os mais divertidos e leves. Vocês foram grandes achados nesse mundo, eu fui e sou muito feliz por ter tido a oportunidade de conviver com pessoas incríveis como vocês. As histórias doidas da Fabi, a doçura da Tiemi, o sorriso da Pamela, as esmagadas da Lorena, os olhos atentos da Érica, o companheirismo da Dani e a outra Dani por me ensinar a mexer no sequenciador. Aos poucos e muito divertidos e produtivos momentos com a Fernanda e os sorrisos safados do Ivo. Nunca esquecerei. Ao Célio que me ofereceu suas cepas e seu local de trabalho para executar experimentos. Muito obrigada!!!

Agradeço a todas e todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho. Denise que sempre cuidou da limpeza do nosso laboratório, Vilene e Helena que cuidam da portaria/segurança do nosso lab, dos técnicos Elias, Lauro, Érica, Fred, Fernanda (e dos outros que possa ter esquecido), que nos auxiliaram e facilitaram nosso trabalho na FCE.

Agradeço a UnB por me mostrar um novo Universo cheio de pessoas incríveis, descobertas pessoais e profissionais e por ter sido meu lar durante 2 anos.

Também agradeço a mim mesma. Agradeço por ter me esforçado e conseguido levantar todas as vezes que caí e ter aprendido (ou pelo menos tentando) com meus erros.

Finalmente agradeço a ciência por me mostrar um caminho de luz e por me dar uma ferramenta para mudar a vida a minha vida e de outras pessoas. A ciência muda todos os dias a forma como eu enxergo a vida, as pessoas e a mim mesma. Compreender, mesmo que um pouco sobre as ciências, me deixa muito feliz.

*Na vida, não há nada a se temer, apenas a ser compreendido.*

Marie Curie

Sousa, JF. Perfil de virulência e filogenética de isolados clínicos de *Escherichia coli* resistentes a carbapenem recuperados em hospitais de Brasília-DF [dissertação]. Brasília: Instituto de Biologia, Universidade de Brasília; 2019.

## RESUMO

A espécie *Escherichia coli* tem o intestino de humanos, como habitat primário, vivendo em relação de comensalismo. Contudo, a aquisição de fatores de virulência por cepas especializadas, permite o estabelecimento de tipos patogênicos (patotipos) de *E. coli*. Patotipos de *E. coli* são agentes de infecção de uma série de sítios extraintestinais incluindo o trato urinário, corrente sanguínea e sistema nervoso central. A emergência de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) portando genes de resistência a carbapenem *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>* é temerária, sendo importante saber qual o potencial de virulência destas cepas de *E. coli* portando os genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>* circulando no Distrito Federal. Isolados resistentes a carbapenem (carba-R) de *E. coli* mantidos pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-DF) foram caracterizados em função de filogrupo e tipo de sequência e quanto a presença fatores de virulência (n=19) e de genes de resistência a carbapenens (n=5) e cefalosporinas (n=5). Foram analisadas 36 cepas isoladas de amostras de swab retal, urina, sangue, escara, líquido peritoneal e aspirado traqueal. A maioria dos isolados carba-R (58%) foi definida como de filogrupos comensais (A ou B1). Os fatores de virulência do patotipo ExPEC foram os mais detectados [Fyua (44, %), Foca (44, %), Yfcv (33, 3%), Vat (27,7 %) e Chua (25 %)]. O gene *bla<sub>KPC</sub>* foi detectado em maior frequência (52,7%) do que o gene *bla<sub>NDM</sub>* (36,1%) e de forma excludente. Entretanto, cepas positivas para KPC ou NDM acumularam *bla<sub>IMP</sub>* e genes de ESBL. Foram detectados 11 complexos clonais (CC) entre as cepas de *E. coli* carba-R, incluindo o CC de potencial epidêmico 131. No DF, isolados carba-R de *E. coli* circulam majoritariamente como cepas comensais (filogrupos A e B1) acumulando genes de resistência (*bla<sub>KPC/NDM</sub>*+*bla<sub>CTX-M</sub>*) e integram uma diversidade de grupos clonais.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*; resistência antimicrobiana; KPC; NDM; genotipagem; filogenética.



Sousa, JF. Virulence profile and phylogenetics of clinical strains of *Escherichia coli* with carbapenem resistance at hospitals from Brasília-DF [masters essay]. Brasília: Biology Institute, Brasilia University; 2019.

### ABSTRACT

The specie *Escherichia coli* has the intestinal tract of humans as its main habitat, residing in a commensal relationship. However, the acquisition of virulence factors by specialized strains allows the establishment of pathogenic types (pathotype) of *E. coli*. *E. coli* strains are the etiological agents of infection of several extraintestinal sites including urinary tract, bloodstream and central nervous system. The emergence of extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) harbouring carbapenem resistance genes *bla<sub>KPC</sub>* and *bla<sub>NDM</sub>* it's temerarious, becoming important to know the virulence potential of those strains carrying the *bla<sub>KPC</sub>* and *bla<sub>NDM</sub>* genes circulating at Distrito Federal. *E. coli* carbapenem-resistant isolates maintained by the Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-DF) were characterized as phylogenetic group and sequence type and characterized the presence of virulence factors (n=19) and genes of antibiotic resistance to carbapenems (n=5) and cephalosporins (n=5). Thirty six strains of rectal swab, urine, blood, eschar, peritoneal fluid and tracheal aspirate samples were analyzed. Most carba-R isolates (58%) were defined as commensal phylogroups (A or B1). The virulence factors of the pathotype ExPEC were the most detected [Fyua (44,4%), Foca (44,4%), Yfcv (33.3%), Vat (27.7%) and Chua (25%)]. The *bla<sub>KPC</sub>* gene was more detected (52.7%) than the *bla<sub>NDM</sub>* gene (36.1%) and they both were not harboured at the same strain. However, positive strains for KPC or NDM also harboured *bla<sub>IMP</sub>* and ESBL genes. 11 clonal complexes (CC) were detected among the strains of *E. coli* carba-R, including the CC of epidemic potential 131. At DF, *E. coli* carba-R strains circulate mainly as commensal strains (phylogroups A and B1) accumulating resistance genes (*bla<sub>KPC</sub>/bla<sub>NDM</sub>* + *bla<sub>CTX-M</sub>*) which integrate a variety of clonal groups.

**Keywords:** *Escherichia coli*; antimicrobial resistance; KPC; NDM; genotyping; phylogenetic.

## **LISTA DE IMAGENS**

<b>Imagem 1</b> - Bexiga e rim colonizados por UPEC	9
<b>Imagem 2</b> - Chave dicotômica para identificação de filogrupos.	23

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Distribuição dos genes <i>bla<sub>KPC</sub></i> e <i>bla<sub>NDM</sub></i> por filogrupo	39
<b>Gráfico 2</b> - Frequência de fatores de virulência encontrado juntos aos genes de resistência <i>bla<sub>KPC</sub></i> e <i>bla<sub>NDM</sub></i>	41

## **LISTA DE FLUXOGRAMA**

**Fluxograma 1** - Representação esquemática resumida da metodologia aplicada no trabalho.

26

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Patotipos de <i>Escherichia coli</i> , quadro clínico, genótipo associado, e classificação etiológica em função dos quadros clínicos associados.	6
<b>Tabela 2</b> - Principais antibióticos utilizados na prática clínica no mundo.	11
<b>Tabela 3</b> - Genes pesquisados e oligonucleotídeos iniciadores para identificação de genes de virulência associados a patotipos de <i>Escherichia coli</i> .	22
<b>Tabela 4</b> - Oligonucleotídeos iniciadores para identificação de filogrupos.	23
<b>Tabela 5</b> - Oligonucleotídeos iniciadores para identificação de resistência bacteriana.	24
<b>Tabela 6</b> - Oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento de <i>loci</i> .	25
<b>Tabela 7</b> - Lista de cepas de <i>Escherichia coli</i> resistentes a carbapenem e data de isolamento agrupadas por amostra clínica.	28
<b>Tabela 8</b> - Filogrupo de cepas de <i>Escherichia coli</i> resistentes a carbapenem agrupadas por amostra clínica.	30
<b>Tabela 9</b> - Fatores de virulência detectados e distribuição em filogrupos.	34
<b>Tabela 10</b> - Quantidade de fatores de virulência por amostra biológica e por filogrupo.	35
<b>Tabela 11</b> - Genótipo e filogrupo por amostra clínica.	37
<b>Tabela 12</b> - Genótipo de patotipo, filogrupo e perfil de resistência bacteriana por cepa e amostra clínica.	42
<b>Tabela 13</b> - Perfil ST, complexo clonal (CC) e gene de resistência associado.	45

## LISTA DE SIGLAS

Carba- R	Resistência a carbapenem
CC	Complexo clonal
CEFAS	Cefalosporinas
DAEC	<i>E. coli</i> de aderência difusa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
ESBL	Beta lactamase de espectro estendido.
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EXPEC	<i>E. coli</i> patogênica extra intestinal
IMP	Imipenase
ITU	Infecção do trato urinário
KPC	Carbapenemase de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LB	Luria bertani
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MNEC	<i>E. coli</i> associada a meningite
NDM	Nova Delhi metalo-beta-lactamase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacillina metalo-beta-lactamases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
ST	<i>Sequence typing</i>
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênica
VIM	Metallo-beta-lactamase codificada pelo integron verona
IPEC	<i>Intestinal Pathogenic Escherichia coli</i>

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Escherichia coli</i>	1
1.2 FILOGENÉTICA DE <i>Escherichia coli</i> e PATOTIPOS	2
1.2.1 Filogrupos	2
1.2.2 <i>Multilocus sequence typing</i>	3
1.3 PATOTIPOS DE <i>Escherichia coli</i>	5
1.3.1 <i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal (EXPEC)	7
1.3.2 <i>Escherichia coli</i> associada a meningite	8
1.3.3.2 <i>Escherichia coli</i> uropatogênica	8
1.4 ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS	9
1.4.1 Carbapenem	12
1.4.2 Cefalosporinas	12
1.5 Antibióticos aminoglicosídeos	12
1.6 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS	13
1.6.1 Resistência a beta-lactâmicos em <i>Escherichia coli</i>	14
1.7 BETA-LACTAMASES	15
1.7.1 Carbapenemases	15
1.7.2 Genes de carbapenemase de importância epidemiológica	16
1.7.2.6 Genes de <i>esbl</i> (beta-lactamase de espectro estendido) de importância epidemiológica	17
1.7.3 Gene para resistência a aminoglicosídeos	18
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVO	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 COLETA DE AMOSTRAS	19
4.2 BACTERIOTECA	20
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL BACTERIANO	20
4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR	21
4.5 ANÁLISE DE ELETROFORESE	21

4.6 ANÁLISE MOLECULAR DE FATORES DE VIRULÊNCIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE PATOTIPO DE <i>Escherichia coli</i>	23
4.7 ANÁLISE DE FILOGRUPO	23
4.8 ANÁLISE DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	23
4.9 <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST)	24
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	26
5.1 CEPAS DE <i>Escherichia coli</i>	26
5.2 ANÁLISE DE FILOGRUPO EM CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> CARBA-R	29
5.3 ANÁLISE DE FATORES DE VIRULÊNCIA	31
5.4 PREDITOR DE UROPATOGENICIDADE EM CEPAS CARBA-R	36
5.5 DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA	37
5.6 DEFINIÇÃO DE ST	42
6. CONCLUSÃO	46
7. PERSPECTIVAS	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *ESCHERICHIA COLI*

Descoberta por Theodore Escherich (1857 – 1911), a espécie *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa comensal da microbiota intestinal de animais de sangue quente, incluindo humanos. É a enterobactéria mais regularmente isolada em laboratório clínico e a mais popularmente estudada. *E. coli* é uma espécie versátil, possui alta habilidade de adaptação a diversos nichos, sendo isolada em ambiente comunitário e nosocomial (ROBINS-BROWNE *et al*, 2016; SCHEUTZ; STROCKBINE, 2015; ROBINS-BROWNE, 1987).

Enquanto comensal no intestino humano, a *E. coli* propicia benesses ao hospedeiro como por exemplo, cooperação na produção de vitamina K. Porém, algumas cepas são patogênicas, podendo gerar doenças diarreicas, como também podem colonizar sítios extraintestinais, podendo gerar doenças extraintestinais. Esta patogenicidade ocorre devido a presença de fatores de virulência que propiciam a adaptação e crescimento no hospedeiro e o desenvolvimento de sintomas (ALVES *et al*, 2017; BROWNE *et al*, 2017; MILANI *et al*, 2017; REYGAERT, 2017; ROBINS-BROWNE *et al*, 2016; DELMA *et al*, 2015).

Quadros diarreicos em crianças menores de 5 anos e de viajantes de países emergentes são constantemente associados a *E. coli*, sendo este também, o agente etiológico predominante em casos de infecção do trato urinário (ITU) (KARAMI *et al*, 2016; ROBINS-BROWNE *et al*, 2016). O ITU é o quadro infeccioso mais frequentemente diagnosticado em humanos. Estima-se que de todas as infecções que pacientes do sexo feminino tenham durante a vida, 50% sejam infecção urinária (WHO, 2018). Além de ser importante agente infeccioso em infecções comunitárias, *E. coli* é também um importante patógeno nosocomial. Estima-se que 40% das infecções nosocomiais sejam ITU, sendo que mais da metade destes casos, decorrem de internações de curto prazo. Em internações de longo prazo, a estimativa é de que dentre as infecções nosocomiais, 25% seja ITU gerada por *E. coli* (WHO, 2018).

Para definir o potencial patogênico de *E. coli* como agente infeccioso causador de doenças intestinais ou extraintestinais, é analisada a presença de genes que codificam fatores de virulência.

Fatores de virulência proporcionam vantagens adaptativas aos isolados de *E. coli*, facilitando assim, sua colonização em tecidos que antes não seriam colonizados,

modulando sua sobrevivência fora do trato intestinal (DONNENBERG, 2013; KAPER *et al.*, 2004). Quando constantemente associados a quadros clínicos específicos, conjuntos de fatores de virulência, caracterizam genotipicamente os patotipos de *E. coli* (DONNENBERG, 2013; KAPER *et al.*, 2004). Em virtude das trocas genéticas, a espécie *E. coli* pode adquirir e perder fatores de virulência com frequência, tornando possível a origem de novos patotipos (DONNENBERG, 2013; KAPER *et al.*, 2004).

Estudos filogenéticos de *E. coli*, estabelecem 4 filogrupos principais: A, B1, B2 e D. Essa caracterização, prediz a qual linhagem um isolado de *E. coli* pertence, indicando, de acordo com sua ancestralidade, a qual nicho adequa-se e qual seu potencial em causar doenças. Desta forma, atualmente, são reconhecidos filogrupos que frequentemente agregam isolados de *E. coli* comensais (filogrupos A e B1) ou patogênicos (filogrupos B2 e D) (CLERMONT *et al.*, 2000).

Pela notável competência em realizar transferência genética horizontal, e por dispor de aproximadamente 40.000 genes acessórios reportados em seu pangenoma, a espécie *E. coli* é caracterizada por sua capacidade de adaptação, colonização e sobrevivência (YANG *et al.*, 2018). Além de genes codificadores de fatores de virulência, genes para resistência a antimicrobianos são facilmente adquiridos por *E. coli*, atribuindo grande vantagem de sobrevivência, não apenas, a mudanças de nicho, como também, a recursos terapêuticos antimicrobianos (ALVES *et al.*, 2017; TORTORA *et al.*, 2017, p. 229; DONNENBERG, 2013; EVANS; EVANS, 1996;). O aumento da ocorrência de enfermidades provocadas por bactérias resistentes a antimicrobiano, tem dobrado os custos com tratamento e aumentou o número de óbitos (ALAM *et al.*, 2009).

## **1.2FILOGENÉTICA DE *E. coli* e PATOTIPOS**

### **1.2.1Filogrupo**

Com base em uma bacterioteca com isolados de *E. coli* de grupos filogenéticos distintos, e o estudo de um fragmento com função desconhecida que está presente nas cepas de vários casos de meningite neonatal, pesquisadores identificaram *loci* que poderiam ser utilizados para identificar filogrupos: *chuA*, gene para um sideróforo pertencente a cepa O157:H (descoberto no sequenciamento da cepa K12); *yjaA*, gene ativo durante estresse provocado por ácidos e por peróxido de hidrogênio em *E. coli*;

e o fragmento de DNA sem função conhecida nomeado TSPE.4C2 (CLERMONT *et al*, 2000; LEE *et al*, 2009).

Para confirmar os dois genes e o TSPE.4C2 conhecidos como marcadores filogenéticos, Clermont e colaboradores, realizaram análise de filogrupo de 230 cepas de diversas localidades geográficas e de diversos nichos, e reportaram que as cepas de *E. coli* agrupavam-se em 4 grandes linhagens, A, B1, B2 e D (CLERMONT *et al*, 2000). Este método permite a classificação das bactérias de acordo com a linhagem evolutiva, caracterizando-as como bactérias comensais ou patogênicas, assim identificando o potencial de virulência do isolado de *E. coli*. Os filogrupos A e B1 são majoritariamente comensais; o B2 é majoritariamente patogênico e predominantemente associado a doenças extraintestinais; enquanto o filogrupo D, também considerado patogênico, é isolado em menor número em infecções extraintestinais (CLERMONT *et al*, 2000).

Vários estudos epidemiológicos corroboram o predomínio dos filogrupos A e B1 entre isolados comensais recuperados de fezes de humanos saudáveis. Em estudo brasileiro realizado por Stoppe e colaboradores, foram analisadas 116 cepas de *E. coli* que foram isoladas de pessoas de ambos os sexos, moradores de São Paulo, com idade entre 19 e 79 anos, submetidos a dieta ocidental (majoritariamente onívoro) e com índice de massa corporal de 26. De todos os isolados analisados, 48.3% eram definidos como filogrupo A, 30,2% como filogrupo D, 16.4% como filogrupo B2 e, 5.2% como filogrupo B1 (STOPPE *et al*, 2017).

Em contrapartida, isolados de *E. coli* recuperados de infecção do trato urinário mostram o predomínio dos filogrupos B2 e D (MOSTAFAVI *et al*, 2018). Analisando 258 cepas de *E. coli* isoladas de infecções extraintestinais (ITU, bacteremia, pneumonia, infecção pós-cirúrgica, infecção peritoneal e infecção de mucosa) ocorridas em Brasília-DF, Lara e colaboradores relataram que 43% dos isolados pertenciam ao filogrupo B2, e 38% dos isolados pertenciam ao filogrupo D (LARA *et al*, 2017).

;

### **1.2.2 Multilocus sequence typing**

*Multilocus sequence typing* (MLST) traduz-se para o português em tipagem por sequenciamento de múltiplos *loci*, e seu protocolo está baseado na definição de perfis

alélicos que podem ser analisados e comparados com os perfis de linhagens já registrados em bancos de dados (MADIGAN *et al*, 2016, p. 371).

Há três bancos de dados de MLST para *E. coli*: um criado por Thomas Whittam e implantado pela Universidade Estadual de Michigan, o EcMLST; um criado pelo Mark Acthman e implantado pela Escola de Medicina de Warwick e um criado por Sylvain Brisse e Erick Denamur e implantado pelo Instituto Pasteur (CLERMONT *et al*, 2015). Cada um possui um quadro de genes que são utilizados para classificar a espécie *E. coli* filogeneticamente, sendo que apenas o gene *icd* é compartilhado por todos os bancos de dados. O Instituto Pasteur utiliza genes com maior variabilidade genética e possui maior poder de discriminação (CLERMONT *et al*, 2015). Por esta razão, foi o protocolo empregado neste trabalho.

Estudos na América do Norte em 2001, sugeriram que isolados de *E. coli* que causavam ITU, outras doenças extraintestinais e epidemias na comunidade, pertenciam ao grupo clonal A (CgA). Cepas de *E. coli* pertencentes ao CgA são detectadas principalmente em ITU adquiridas em ambiente comunitário, possuindo ampla distribuição no ocidente (JOHNSON *et al*, 2011). Esse grupo clonal também é caracterizado como filogrupo D e multirresistente a antibióticos (SKJØT-RASMUSSEN *et al*, 2013). A definição como filogrupo D é importante, pois, a maior parte das cepas causadoras de infecção extraintestinal são caracterizadas como filogrupo B2, entretanto, CgA foge à regra. Outra característica marcante do CgA é seu perfil MLST classificar seu grupo clonal como pertencente ao 69 (JOHNSON *et al*, 2011).

O complexo clonal 69, é conhecido por possuir perfil de virulência ExPEC conservado e é globalmente reportado em casos de ITU comunitários e nosocomiais (RILEY, 2014; SKJØT-RASMUSSEN *et al*, 2013). Esse grupo clonal também é conhecido por agregar isolados resistentes a trimetropima e sulfonamida, associação terapêutica comum em casos de ITU (RILEY, 2014; SKJØT-RASMUSSEN *et al*, 2013). Entretanto, não há muitas descrições por expressar beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) (RILEY, 2014).

Além do complexo clonal 69, outro muito descrito e estudado é o 131. Este complexo clonal é reportado mundialmente em estudos epidemiológicos e filogenéticos de cepas isoladas de quadros infecciosos, principalmente ITU, além de ser frequentemente reportado como portador de  $\beta$ -lactamases (RILEY, 2014; CALHAU *et al*, 2013). Em estudo nacional realizado na Espanha, 500 isolados de *E.*

*coli* foram coletados por Blanco e colaboradores de 5 hospitais, e após análise de filogenia, descreveram a presença majoritária de três STs. O ST131 filogrupo B2 foi mais frequentemente identificado, totalizando 59 (12%) cepas; seguido pelo ST69 filogrupo D, detectado em 22 (4%) isolados; e por fim, o ST393 filogrupo B2, detectado em 16 (3%) isolados. Destas três linhagens, o ST131 foi estatisticamente mais prevalente nos 5 hospitais pesquisados (BLANCO *et al*, 2011).

Em investigação realizada no Canadá entre os anos 2002 e 2004, Johnson e colaboradores avaliaram 199 isolados de ITU e reportaram que 23% das cepas pertenciam ao ST131 (JOHNSON *et al*, 2009). Já em outro estudo realizado nos Estados Unidos em 2007, Johnson e colaboradores, recuperaram 127 cepas de ExPEC com presença de beta-lactamase ESBL, identificando o filogrupo B2 em mais de 50% das cepas, e o ST131 em 70% das cepas (JOHNSON *et al*, 2010).

Outro dado relevante quanto ao ST69 e ST131, é a capacidade dessas linhagens em adensar genes de resistência a antibiótico. Um estudo realizado por Blanco e colaboradores reportou percentual de 37% (n=185) de resistência a associação de antibiótico trimetropim+sulfa, 34% (n=170) eram resistentes a ciprofloxacina e 30% (n=150) multirresistentes. Neste estudo, os isolados ST131 representaram 23% (n=59) das cepas multirresistentes (BLANCO *et al*, 2011).

Resultado equivalente foi encontrado no estudo de Johnson e colaboradores, mostrando que mais de 50% das cepas identificadas como ST131 apresentavam resistência a trimetropim+sulfa, ciprofloxacina e aminoglicosídeo, sendo considerado multirresistente (BLANCO *et al*, 2011; JOHNSON *et al*, 2009).

### **1.3 PATOTIPOS DE *Escherichia coli***

A espécie *E. coli* é uma enterobactéria comensal ao trato intestinal humano e animal, entretanto, dispõe de habilidade para gerar doenças. Essa capacidade se deve a adaptação de algumas linhagens da espécie que adquirem em transferência horizontal, genes de virulência que possibilita a adaptação da *E. coli* a diversos nichos (KAPER *et al*, 2004).

A mobilidade desses fatores de virulência gera combinações que, quando detectadas de forma persistente em isolados de *E. coli* e associadas a quadros clínicos, identificam patotipos de *E. coli* (tabela 1). Esses patotipos, eficientes para causar doenças em pessoas saudáveis, são classificados em IPEC (IPEC - do inglês,

*intestinal pathogenic E. coli*), o qual possui 6 grupos descritos, *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (Tabela 1) (KAPER *et al*, 2004).

Além destas 6 categorias, também há patótipos de *E. coli* que possuem aptidão para colonizar e gerar doenças em sítios extraintestinais (ExPEC, do inglês *extraintestinal pathogenic E. coli*). ExPEC, é o agente etiológico mais importante de infecções do trato urinário, também causando infecções importantes no peritônio, meninges, pulmão e septicemia. Em função do sítio de infecção, os isolados de ExPEC são definidos como *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada a meningite neonatal (MNEC) e *E. coli* associada a sepse (SEPEC) (Tabela 1) (KAPER *et al*, 2004).

**Tabela 1:** Patótipos de *E. coli*, quadro clínico, genótipo associado, e classificação etiológica em função dos quadros clínicos associados.

PATOTIPO	INFECÇÃO ASSOCIADA	GENÓTIPO	CLASSIFICAÇÃO
DAEC	Diarreia	<i>AFA/Dr</i> (operon)	IPEC
EAEC	Diarreia Aquosa e/ou Persistente em criança e em soro positivo para HIV.	<i>pAA</i> (plasmídeo) <i>aggR</i> (Regulador transcricional) <i>pic</i> (mucinase) <i>pet</i> (toxina)	IPEC
EHEC	Diarreia sangüinolenta Síndrome Urêmica Hemolítica	<i>Stx</i> 1/2 (toxina de shiga) <i>eae</i> (adesina)	IPEC
EPEC	Diarreia infantil em menores de 2 anos	<i>bfp</i> (fímbrias) <i>eae</i> (adesina intimina) EAF (plasmídeo)	IPEC
ETEC	Diarreia do Viajante	<i>ST</i> (toxina) <i>LT</i> (toxina)	IPEC
MNEC	Meningite neonatal, sepse	<i>sfa</i> (fimbria) <i>cnf</i> (fator necrosante citotóxico)	ExPEC

**Tabela 1:** Patotipos de *E. coli*, quadro clínico, genótipo associado, e classificação etiológica em função dos quadros clínicos associados.

Continuação

PATOTIPO	INFECÇÃO ASSOCIADA	GENÓTIPO	CLASSIFICAÇÃO
UPEC	Cistite, pielonefrite, sepse	<i>fyua</i> (sideróforo) <i>chua</i> (sideróforo) <i>yfcv</i> ( <i>fimbria</i> ) <i>vat/sat</i> (toxina) <i>pap</i> ( <i>fimbria</i> ) <i>focA</i> ( <i>fimbria</i> )	ExPEC

### 1.3.1 *Escherichia coli* patogênica extraintestinal (exPEC)

Cepas de *E. coli* extraintestinais são definidas de acordo com qual doença é associada, como *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada a meningite neonatal (MNEC) e *E. coli* associada a sepse (SEPEC). Entretanto, após estudos, estes termos caíram em desuso após constatado que, na realidade, cepas de UPEC, MNEC e SEPEC podiam produzir infecções em múltiplos sítios anatômicos (DALE; WOODFORD, 2015). Desta forma, no ano 2000 os pesquisadores Russo e Johnson, identificaram como ExPEC todas as cepas de *E. coli* que não fossem comensais e capazes de causar doenças extraintestinais (DALE; WOODFORD, 2015; RUSSO; JOHNSON, 2000). Descreve-se como não comensal, as cepas que em sítios anatômicos que não sendo o trato intestinal podem provocar doenças usando fatores de virulência (DALE; WOODFORD, 2015).

Geralmente, ExPEC é associado a ITU, por *E. coli* ser o agente infeccioso mais isolado de quadros de ITU comunitário e pielonefrite. Porém, outras doenças presentes no trato urinário como prostratite e ITU nosocomial (associado à cateter), também podem ser gerados por *E. coli*. Enquanto doenças em tecidos moles, meningite neonatal e pneumonia nosocomial, ocorrem em menor frequência devido a infecção por *E. coli* (DALE; WOODFORD, 2015).

ExPEC ainda tem potencial de causar sepse, devido a invasão das cepas à corrente sanguínea do hospedeiro, podendo levar a óbito na ausência de tratamento adequado (DALE; WOODFORD, 2015).

Este patotipo ainda possui inúmeros fatores de virulência, os quais oferecem vantagens frente a colonização, metabolismo bacteriano e invasão de tecidos, o que mantém a importância dos estudos que realizam experimentações de associações de fatores de virulência e sítios de colonização (DALE; WOODFORD, 2015).

### **1.3.2 *Escherichia coli* associada a meningite**

MNEC é o mais importante causador de meningite neonatal, estima-se que em torno de 40% destes quadros levem a óbito (CROXEN; FINLAY, 2010; KAPER *et al*, 2004). Esse patotipo ocupa junto ao UPEC o grupo ExPEC, ambos compartilham fatores de virulência, não possuindo um genótipo que seja específico (KAPER *et al*, 2004).

A patogenia desse patotipo se baseia na travessia das bactérias pelo intestino para assim caírem na corrente sanguínea e serem levadas até o cérebro, onde atravessam a barreira hemato-encefálica para então colonizarem as meninges (CROXEN; FINLAY, 2010).

Evidências experimentais demonstram que as cepas desse patotipo possuem uma cápsula antifagocítica que permite sua passagem pelo sangue sem sofrer com os ataques do sistema imune do hospedeiro (CROXEN; FINLAY, 2010). Quando no cérebro, fímbrias do tipo S (Sfa) atuam na adesão bacteriana ao endotélio vascular e células epiteliais do plexo coroide e ventricular, o fator necrosante citotóxico (CNF), juntamente com as fímbrias de tipo 1 FimH e proteínas de membrana (OMP) atuam na invasão da bactéria na barreira hemato-encefálica (CROXEN; FINLAY, 2010; DONNENBERG, 2013).

### **1.3.3 *Escherichia coli* uropatogênica**

A UPEC é comumente isolada de ITU, causando 80% destas infecções em humanos, e quando não tratado, pode causar pielonefrite aguda (CROXEN; FINLAY, 2010; KAPER *et al*, 2004).

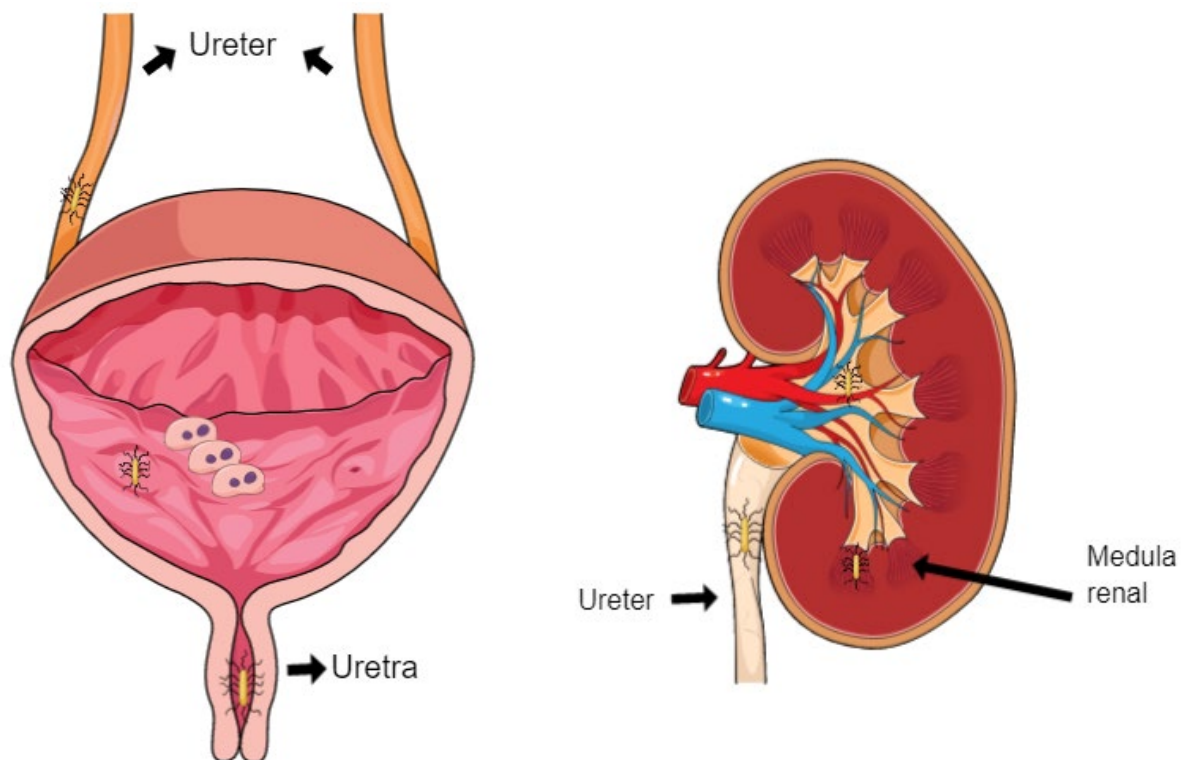
Após ascender para a bexiga, as cepas desse patotipo se aderem às manoses dos receptores de uroplaquinas nas células epiteliais a partir da presença de fímbrias FimH, essa aderência provoca migração de células polimorfonucleares causando assim esfoliação celular (CROXEN; FINLAY, 2010; KAPER *et al*, 2004). Para a sua sobrevivência no trato urinário, estas cepas também possuem sideróforos chamados



FYUA e CHUA, os quais se encarregam de captar ferro do hospedeiro (KAPER *et al*, 2004).

Já para a colonização do trato renal, após ascender a uretra, as UPEC possuem fímbrias PAP (do inglês, *pyelonephritis associated pili*) e o pilus FOCA. Também há a atuação da toxina vacuolizante SAT/VAT nesse tecido, provocando lesões nos glomérulos (DONNENBERG, 2013; KAPER *et al*, 2004). Há ainda tipos de fímbrias chamadas de putativas, uma delas é a YFCV, presente em torno de 70% dos das ITUs (DONNENBERG, 2013).

**Imagem 1:** Bexiga e rim colonizados por UPEC.



**Legenda:** As cepas de UPEC possuem fímbrias que auxiliam a *E. coli* ascender do ânus para a uretra. Quando na bexiga, as cepas se aderem ao epitélio da bexiga, sobrevivendo a presença da urina, provocando inflamação pela liberação de citocinas e esfoliação celular. Fímbrias P, auxiliam na ascensão da cepa para os rins, fixando-se nos glomérulos, túbulos e endotélio renal.

**Fonte:** Mind the graph.

## 1.4 ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS

São classificados como beta-lactâmicos, os antimicrobianos que contêm em sua estrutura química um anel de amida cíclica, porém, a subclassificação do

antibiótico é definida de acordo com a junção de outros anéis que lhe é adicionado (GOLAN *et al*, 2014; TAVARES, 2009).

Toda essa classe de antimicrobianos (Tabela 2) tem mesmo alvo, e atividade sob a parede celular bacteriana, provocando uma ruptura celular osmótica (GOLAN *et al*, 2014; PAPP-WALLACE *et al*, 2011; TAVARES, 2009).

A parede bacteriana é formada por um polímero, o peptidoglicano, composto por unidades estruturais de ácido N-acetilmurâmico e carboidrato N-acetilglicosamina, como também aminoácidos que constituem tetrapeptidoglicano - responsáveis pela junção das cadeias cruzadas-, este complexo estrutural configura o arcabouço celular. Esse polímero é sintetizado, alongado e ligado através da atividade de enzimas transglicosidase, transpeptidase, carboxipeptidase e endopeptidase, conhecidas como proteínas de ligação de penicilina (PBP) (MADIGAN *et al*, 2016; TAVARES, 2009).

Esse esqueleto celular é frequentemente sintetizado e lisado pela bactéria por conta do crescimento celular, isso se dá pela formação de septo na fissão binária e necessidade de estabilidade celular. Sendo assim, as PBPs exercem atividade catalisadora e uma enzima autolítica chamada hidrolase, realiza a lise do peptidoglicano de forma que essas duas ações ocorram em complementaridade (TAVARES, 2009). Além de atuar como catalisadora, as PBPs também possuem afinidade por drogas que contenham anel beta-lactâmico, isso se deve pela correspondência do anel de amida cíclica com o eixo dipeptídico D-Ala-D-Ala terminal, sítio da PBP transpeptidase. Assim sendo, após o antibiótico adentrar a célula através de proteínas de membrana externa (OMP), há interação entre os beta-lactâmicos e as PBPs (TAVARES, 2009).

A interação entre os PBPs e o antibiótico, inativa a atividade de catálise de peptidoglicano das enzimas, porém, o processo biológico celular é inalterado e as hidrolases continuam atuando sob o complexo estrutural, lisando-o, por conta parede fragilizada não suporta a pressão osmótica intracelular (PAPP-WALLACE *et al*, 2011; TAVARES, 2009).

**Tabela 2:** Principais antibióticos utilizados na prática clínica no mundo.

SUBCLASSE DE BETA-LACTÂMICOS	ANTIBIÓTICOS
Penicilinas	Penicilina G (Benzil-penicilina) Penicilina V
Cefalosporinas	1ª geração: Cefalexina, cefadroxil, Cefalotina, Cefazolina 2ª geração: Cefoxitina, cefuroxime, Cefaclor 3ª geração: Ceftriaxone, Cefotaxime 3ª geração anti-Pseudomonas: Ceftazidime 4ª geração: Cefepime
Monobactâmicos	Aztreonam
Carbapenêmicos	Imipenem Meropenem Ertapenem Dorapenem

Fonte: Modificado de material do curso básico de antimicrobianos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

#### 1.4.1 Carbapenem

Hoje, no Brasil, Europa e Estados Unidos, imipenem, meropenem e ertapenem são os carbapenens mais aplicados na clínica. Sendo que há um novo carbapenem no mercado internacional, o doripenem foi o último carbapenem a ser aprovado e está passando por processo de licenciamento no Brasil (Tabela 2) (2007) (ANVISA, 2018; PENIDO, 2018; GOLAN *et al*, 2014; HILAS *et al*, 2008).

Por sua eficácia bactericida, boa difusão no organismo, inclusive no sistema nervoso central, e resistência a enzimas antimicrobianas, é adotado restritamente para Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde (IRAS) como última opção para pacientes cujas infecções são provocadas por bactérias multirresistentes (PENIDO, 2018; KATZUNG, TREVOR, 2017; PAPP-WALLACE *et al*, 2011).

Isso se deve por esse antimicrobiano ter atividade em amplo espectro por sua estrutura possuir junção de um anel petangonal não-saturado com um radical carbono na posição 1 no anel betalactâmico e ter fixidez perante a beta-lactamase, por conta da presença de uma cadeia de hidroxietila (TAVARES, 2009).

#### **1.4.2 Cefalosporinas**

Essa subclasse de beta-lactâmicos é uma das que possui o maior número de representantes juntamente a penicilina. Estruturalmente ela é um anel beta-lactâmico unido a um anel di-hidrotiazina, porém, com modificações na cadeia lateral, também se modificou o espectro de ação, separando-as então em gerações. Cada geração é potencialmente melhor e de maior espectro do que a anterior (Tabela 2) (TAVARES, 2009).

Sendo assim, as cefas de primeira geração têm melhor atividade contra bactérias Gram positivas e não tanto contra Gram negativos, entretanto, a segunda geração apresenta boa ação contra Gram negativos em detrimento dos Gram positivos. A terceira geração ampliou o espectro de ação contra as bactérias Gram negativas e a quarta e quinta melhoraram a atuação contra Gram positivos (TAVARES, 2009).

#### **1.5 ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS**

Aminoglicosídeos são antibióticos naturais eficientes contra bactérias Gram negativas, e com média atuação contra Gram positivos, sendo utilizados como recurso terapêutico desde 1944. Aminoglicosídeos apresentam alguns efeitos adversos como nefrotoxicidade, e não atravessam a barreira hematoencefálica. Sua ação é bactericida e é muito utilizado em combinações por atuar bem em sinergismo, principalmente com antibióticos beta-lactâmicos. Sendo que sua concentração é mais importante do que sua exposição a célula bacteriana (BOLLELA, 2019; RIBEIRO, 2017).

Estruturalmente, todos os antibióticos desta classe são formados pela presença do anel aminociclitol com ligações glicosídicas a açúcares aminados (BOLLELA, 2019; RIBEIRO, 2017).

A ação bactericida, ocorre após a passagem do antibiótico pela proteína de membrana externa (OMP do inglês, *outer membrane protein*), quando dentro da célula

bacteriana essa classe se liga a subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, impedindo assim a síntese proteica (ANVISA, 2019; BOLLELA, 2019; RIBEIRO, 2017).

A classe de aminoglicosídeos é um importante recurso terapêutico em casos de infecções por enterobactérias que sejam resistentes a carbapenem, mais precisamente que tenha o gene *blaKPC*. O antibiótico é utilizado em combinação com a polimixina em casos de pneumonia, bacteremia e infecções de ossos e articulação (HOSPITAL DAS CLÍNICAS, 2019).

## **1.6 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS**

A resistência antimicrobiana é a aptidão das bactérias em sobreviver à ação de antimicrobianos. A resistência a antibióticos pode ser resultante de mutações espontâneas, como modificações de sítio de ligação de antibiótico, ou oriunda da aquisição de genes de resistência (ALVES *et al*, 2017). Mecanismos de resistência a antibióticos são expressos por genes localizados, geralmente, em elementos móveis como transposons, integrons e plasmídeos. Estes componentes podem ser difundidos entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes, em um processo chamado de transferência horizontal de genes (ALVES *et al*, 2017).

A resistência antimicrobiana ocorre naturalmente, contudo, torna-se cada vez mais frequente em consequência das atividades humanas, que com o uso equivocado de antibióticos gera pressão seletiva em bactérias, eliminando os microrganismos suscetíveis e poupando os que possuem mecanismos de sobrevivência (ALVES *et al*, 2017; MADIGAN *et al*, 2016, p. 819).

O uso despropositado de antibióticos, seja em aplicação terapêutica, profilática ou como promotor de crescimento no setor pecuário, tem impulsionado a emergência da resistência bacteriana em escala mundial. Este cenário tem aumentado drasticamente os custos com medicação e internação de pacientes, além de ocasionar aumento no número de óbitos (REYGAERT, 2017). Em estudo operado pelo governo do Reino Unido sobre resistência antimicrobiana, os pesquisadores reportaram que em torno de 700.000 pessoas morrem anualmente em razão de infecção por microrganismos multirresistentes (ALVES *et al*, 2017; EMNA NASRI *et al*, 2017), e que atualmente, o parâmetro global do impacto da crescente frequência de casos de resistência, leva a estimativa de 10 milhões de óbitos no ano de 2050 (AMR, 2018).

A resistência a antibiótico processa-se de quatro formas principais, (i) a alteração na permeabilidade da membrana externa em bactérias Gram negativas, que ocorre mediada por proteínas que selecionam as substâncias que serão transportadas para dentro da célula, (ii) a alteração de sítios de ação dos antibióticos, os quais são estruturas proteicas ou glicoproteicas que reconhecem e interagem com moléculas, (iii) a formação de bombas de efluxo que bombeiam substâncias do espaço periplásmico para fora da bactéria e (iv) por fim a produção de enzimas, as quais hidrolisam a estrutura química do medicamento, inativando-o (ANVISA, 2018b).

### **1.6.1 Resistência a beta-lactâmicos em *E. coli***

A classe de antibióticos beta-lactâmicos é a mais aplicada clinicamente no mundo, prescrita em torno de 60% dos casos de infecção. Parte do predomínio em prescrições se dá pelo fato de que beta-lactâmicos possuem amplo espectro de ação exercido por 4 subclasses: penicilinas, que já foram os antibióticos mais consumidos no mundo; as cefalosporinas, que possuem 5 gerações; monobactams e os carbapenems (ANVISA, 2018; PENIDO, 2018; GOLAN *et al*, 2014; POOLE, 2004).

Todas as subclasses atuam na parede bacteriana de Gram negativos e Gram positivos. Contudo, cada um dos medicamentos possuem um espectro de ação no qual atua com maior eficácia. Por exemplo, o carbapenem é um antibiótico sintético de amplo espectro e atua efetivamente na parede bacteriana Gram negativa e Gram positiva, no entanto, seu maior êxito de aplicabilidade é em bacilos Gram negativos (PAPP-WALLACE *et al*, 2011, RANG *et al*, 2004, p. 726 e 730).

Atualmente, carbapenems são considerados a última escolha de tratamento para infecções por bacilos Gram negativos em ambiente nosocomial, colocando as infecções geradas por *E. coli* resistentes a carbapenem num patamar temerário (BAJAJ *et al*, 2016).

Os patótipos de *E. coli* sempre foram relevantes para saúde pública, e eram eficientemente tratados com antibióticos beta-lactâmicos, porém, enzimas hidrolíticas têm reduzido a eficácia destes antimicrobianos (BAJAJ *et al*, 2016). Doenças diarreicas provocadas por patótipos intestinais são autolimitantes, utilizando-se apenas de recursos para a reidratação do paciente. Porém, em patótipos extraintestinais, o melhor recurso terapêutico é a classe beta-lactâmico de antibióticos (BAJAJ *et al*, 2016). Conforme essa classe de antibióticos era prescrita e utilizada na

clínica, muitos foram os casos descritos de resistência antimicrobiana, sendo que os primeiros estudos retratavam resistência do tipo Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL do inglês, *extended-spectrum B-lactamases*). Os ESBLs mais observados eram variantes de TEM-1, TEM-2, SHV-1 e CTX-M, porém, logo surgiram outras enzimas hidrolíticas para subclasses de antibiótico como carbapenem (carbapenemases) (BAJAJ *et al*, 2016).

Em *E. coli*, além das enzimas ESBL, já foi reportado a presença de genes de carbapenemase de importância epidemiológica: KPC (carbapenemase de *Klebsiella pneumoniae*); NDM (Nova Delhi metalo-beta-lactamase); IMP (Imipenase); VIM (metalo-beta-lactamase codificada pelo integron verona) e OXA (oxacillina metalo-beta-lactamases).

Estudos genotípicos demonstram que há linhagens que são predominantemente associadas ao fenótipo de cepa multirresistente, como o ST131 de *E. coli*, que já foi conhecido por disseminar resistência do tipo CTX-M, porém, agora também é reconhecido como disseminador de resistência a carbapenem mediada pela carbapenemase KPC (BAJAJ *et al*, 2016).

## **1.7 BETA-LACTAMASES**

### **1.7.1 Carbapenemases**

Carbapenemase é uma variedade dentro da categoria dos mecanismos enzimáticos de resistência do tipo beta-lactamase, que inativa o antibiótico hidrolisando o anel beta-lactâmico de carbapenem, bem como de outros beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e monobactams). Esses mecanismos podem ser codificados em genes presentes no cromossomo ou em genes presentes nos plasmídeos, e podem ser classificados molecularmente (Classe de Amber) (QUEENAN; BUSH, 2007).

A classificação molecular das carbapenemases é baseada em homologia proteica, categorizando-se assim quatro grupos, A, B, C e D, sendo que as classes A, C e D são enzimas que utilizam serina para a hidrólise do anel beta-lactâmico e a classe B, que são metalo-beta-lactamases, que necessitam de  $Zn^{2+}$  para essa função (QUEENAN; BUSH, 2007).

As carbapenemases de dispersão mundial e importância epidemiológica são agrupadas em apenas 3 classes. Na classe A encontra-se a enzima KPC, a

carbapenemase mais detectada em ambientes nosocomiais (JEON *et al*, 2015; QUEENAN; BUSH, 2007). Na classe B encontram-se as carbapenemases VIM, IMP e NDM que na última década emergiu do subcontinente indiano e dispersou-se mundialmente. E na classe D encontra-se a carbapenemase OXA-48 que emergiu em espécies de *Acinetobacter* (bacilo Gram negativo não fermentador) e vem sendo transferida para enterobactérias (JEON *et al*, 2015; QUEENAN; BUSH, 2007).

### 1.7.2 Genes de carbapenemase de importância epidemiológica

O gene *bla*<sub>KPC</sub> (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) foi identificado em 1996 na Carolina do Norte nos Estados Unidos inicialmente na espécie de enterobactéria *Klebsiella pneumoniae*, sendo atualmente detectada em uma diversidade de enterobactérias e bacilos não fermentadores. O gene *bla*<sub>KPC</sub> integra o transposon Tn4401 e é associado a vários clones epidêmicos e de dispersão mundial, sendo os principais o ST258 de *K. pneumoniae* e ST131 de *E. coli*. É importante salientar que *bla*<sub>KPC</sub> é conhecido por ser predominante em ambientes nosocomiais, sendo raramente detectado em casos de infecção comunitária. Estima-se que infecções causadas por bactérias *bla*<sub>KPC</sub> positivas, tenham o prognóstico de óbito em mais de 50% dos casos (JEON *et al*, 2015; NORDMAN *et al*, 2011; QUEENAN; BUSH, 2007).

O gene *bla*<sub>NDM</sub> (New Delhi metalo- $\beta$ -lactamases) foi relatado simultaneamente nas espécies *K. pneumoniae* e *E. coli* em Estocolmo, capital da Suécia em 2008. O paciente também tinha *E. coli* na microbiota intestinal com *bla*<sub>NDM</sub>. O paciente relatou uma internação hospitalar prévia ocorrida na Índia. Desde então, vem sendo detectado em vários países. Diferentemente de *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> não é associado a linhagens clonais específicas, porém, já foi identificado no ST131 de *E. coli* e é constantemente detectado em isolados nosocomiais e de circulação comunitária de *K. pneumoniae* e *E. coli* (LAHEY, 2018; JEON *et al*, 2015; NORDMAN *et al*, 2011; QUEENAN; BUSH, 2007). *E. coli* carregando NDM é a maior causa de doenças diarreicas comunitárias recorrentes no subcontinente indiano (BAJAJ *et al*, 2016).

Graças a presença de outros genes de resistência que são concomitantemente carregados junto ao plasmídeo que carrega o gene *bla*<sub>NDM</sub>, a *E. coli* deste fenótipo multirresistente destaca-se por sua seleção e disseminação em escala global (BAJAJ *et al*, 2016).



O gene *bla*<sub>IMP</sub> (Imipenase) foi detectado pela primeira vez no Japão em 1991, na espécie de Gram negativo *Serratia marcescens*. É uma enzima codificada em integron, um cassete de genes que apresenta diversas funções genéticas. A enzima IMP é capaz de hidrolisar todos os antibióticos β-lactâmicos, exceto o aztreonam (LAHEY, 2018; JEON *et al*, 2015; NORDMAN *et al*, 2011; QUEENAN; BUSH, 2007).

O gene *bla*<sub>VIM</sub> (Verona Integron-encoded metalo-β-lactamases) foi descrito em Verona, na Itália em 1997 pela primeira vez. Foi inicialmente detectado na espécie de Gram negativo *Pseudomonas aeruginosa*. Este gene é codificado por integron (LAHEY, 2018; JEON *et al*, 2015; NORDMAN *et al*, 2011; QUEENAN; BUSH, 2007).

O gene *bla*<sub>OXA-48</sub> (Oxalinase) foi primeiro identificado na Turquia em 2003 na espécie de Gram negativo *K. pneumoniae*, embora o primeiro alelo de *bla*<sub>OXA</sub> tenha sido detectado em 1993 na espécie *Acinetobacter baumannii*. (LAHEY, 2018; JEON *et al*, 2015; NORDMAN *et al*, 2011; QUEENAN; BUSH, 2007).

### **1.7.2.1 Genes de ESBL (beta-lactamase de espectro estendido) de importância epidemiológica**

Enzimas do tipo ESBL são majoritariamente categorizadas como pertencentes a classe A de Amber. Foram nomeadas como ESBL por produzirem resistência a um amplo espectro de antibióticos da classe β-lactâmicos como penicilinas, cefalosporina de primeira, segunda e terceira geração, e aztreonam; excetuando carbapenens. É uma das classes com maior número de genes, totalizando mais de 150 (LAHEY, 2018; BONNET, 2004; PATERSON; BONOMO, 2005; BRADFORD, 2001).

O gene *bla*<sub>CTX-M</sub> (Cefotaxime) foi identificado pela primeira vez na França em 1987, codificado num plasmídeo carregado por *K. pneumoniae*. No início da década de 1990, alguns alelos de *bla*<sub>CTXM</sub>, notadamente CTX-M-1, CTX-M-14 e CTX-M-15, sofreram processo de dispersão em escala global carregados pela linhagem de *E. coli* ST131 (JOHNSON *et al*, 2010). Enzimas CTX-M são eficazes contra os antibióticos cefalosporinas de terceira geração cefotaxime e ceftazidime. Por algum motivo não estudado, a família *bla*<sub>CTX-M</sub> é prevalente na América do Sul, e Leste Europeu (LAHEY, 2018; BONNET, 2004; PATERSON; BONOMO, 2005; BRADFORD, 2001).

O gene *bla*<sub>toho</sub> foi primeiro descrito no hospital universitário de Toho no Japão, o gene plasmidial *bla*<sub>TOHO</sub> foi encontrado em *E. coli*. É muito parecido estruturalmente

ao CTX-M, inclusive, sua ação é melhor contra os antibióticos cefotaxime e ceftazidime, semelhante a ação do CTXM. (LAHEY, 2018; BONNET, 2004; PATERSON & BONOMO, 2005; BRADFORD, 2001).

O gene *bla<sub>SHV</sub>* (Sulphydryl variable) é codificado em cromossomo na espécie *K. pneumoniae* e em plasmídeo na espécie *E. coli*. Foi descrito pela primeira vez na Alemanha, encontrado em *Klebsiella ozaenae* (LAHEY, 2018; BONNET, 2004; PATERSON; BONOMO, 2005; BRADFORD, 2001).

### **1.7.3 Gene para resistência a aminoglicosídeos**

O gene *aac(6')-Ib-cr* codifica para uma enzima modificadora de aminoglicosídeo caracterizada como uma acetil transferase (6' N-acetiltransferase). É um gene codificado em plasmídeo que induz resistência bacteriana a antibióticos do tipo aminoglicosídeo e também podem atuar contra antibióticos quinolonas. Este gene foi descoberto em *E. coli* (LOVERING *et al*, 1987) e impede a ação dos antibióticos através da acetilação do composto (RAHERISON *et al*, 2017).

## **2.JUSTIFICATIVA**

Levando-se em conta a frequência com a qual a espécie *E. coli* desponta portando genes de resistência a antimicrobianos, faz-se necessário definir a linhagem e potencial de virulência das cepas com resistência a carbapenem que circulam no Distrito Federal.

Pela versatilidade apresentada por *E. coli* e seus patótipos, sua aptidão em habitar qualquer nicho ecológico e sua capacidade em realizar transferência genética, a caracterização filogenética dessas cepas permitirá maior previsibilidade sobre possíveis nichos ecológicos e quadros clínicos ligados a cepas resistentes a carbapenem.

Ao definir o patótipo das cepas de *E. coli* resistentes a carbapenem, este estudo pretende esclarecer pela primeira vez, qual é o potencial de virulência as cepas de *E. coli* portadoras de genes de resistência isoladas no Distrito Federal.

## **3.OBJETIVO**

### **3.1OBJETIVO GERAL**

Realizar genotipagem e estudo filogenético em isolados clínicos de *E. coli* enviados ao Laboratório Central de Saúde Pública por hospitais e laboratórios públicos e privados do Distrito Federal.

### 3.2.OBJETIVO ESPECÍFICO

- Definir bacterioteca de isolados clínicos de *E. coli* resistentes a carbapenem (carba-R).
- Definir o filogrupo das cepas *E. coli* carba-R.
- Definir os patotipos das cepas de *E. coli* por genotipagem.
- Investigar a presença de genes de resistência a carbapenem *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub>.
- Investigar a presença de genes adicionais de resistência a beta-lactamases de espectro estendido *bla*<sub>CTXM</sub>, *bla*<sub>TOHO</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>.
- Investigar a presença de genes adicionais de resistência a aminoglicosídeos *bla*<sub>aac(6)-Ib-cr</sub>.
- Analisar correlação entre o patotipo da *E. coli* e os genes de resistência.
- Determinar o tipo de sequência (ST) e complexo clonal das cepas de *E. coli*.

## 4.MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1COLETA DE AMOSTRAS

Os isolados de *E. coli* foram enviados ao Laboratório Central de Saúde do Distrito Federal LACEN-DF como parte de um programa de vigilância de resistência a carbapenem para confirmação do padrão de resistência e identificação de espécie. As cepas de *E. coli* foram coletadas, semeadas e isoladas por profissionais da saúde de 12 laboratórios de hospitais públicos e privados do Distrito Federal no período de 2010 a 2017. Os isolados foram enviados para o setor de bacteriologia do LACEN, identificados com um código, sexo, idade, tipo de amostra biológica e local de coleta.

As cepas tiveram então a espécie confirmada pela plataforma Vitek MS<sup>®</sup> e seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos definido pela plataforma Microscan<sup>®</sup>. Os isolados foram mantidos em congeladores a -70° (+-2°C) em criopreservante glicerol.

A recuperação destas cepas foi realizada em meio básico de crescimento líquido Luria-Bertani, composto por 1g de peptona, 1g de NaCl (cloreto de sódio), 0,5g de extrato de levedura e quantidade de água destilada suficiente para volume de 100

mL de caldo. O pH foi ajustado para 7,2 (+-2). Após a preparação, o meio foi autoclavado a 120°C por 15 minutos. Após o semeio, os isolados cresceram durante 24h em estufa ajustada em temperatura de 37°C (+-1 °C).

#### **4.2 BACTERIOTECA**

Após a recuperação das cepas em meio LB, estas foram semeadas em tubos cilíndricos plásticos para armazenamento de amostra com o mesmo preparo de meio, porém, com adição de 0,8g de ágar para semi solidificação. Essa coleção foi mantida acondicionada em armário a temperatura ambiente, sem incidência direta de luz e identificada com a designação original do LACEN e por uma numeração sequencial de 1 a 36 para melhor manejo dentro do laboratório.

#### **4.3 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL BACTERIANO**

O método de extração foi baseado em lise celular por fervura, não havendo adição de substâncias químicas e nem remoção de ácidos graxos, proteínas, polímeros e outras estruturas celulares como pili e fímbrias. Para extração de DNA, as cepas foram semeadas em meio líquido LB e cresceram durante 24h em estufa ajustada em temperatura de 37°C (+-1 °C). O meio foi homogeneizado de forma delicada e então foi retirado 1ml para dispor em um tubo de microcentrífuga de 1,5mL estéril e identificado.

Este tubo foi centrifugado a 3000g por 3 minutos em temperatura de 10°C para sedimentação das células bacterianas. O sobrenadante foi descartado e então foi adicionado 1ml de água deionizada à suspensão celular, homogeneizada de forma vigorosa em agitador do tipo vórtex. A suspensão celular foi centrifugada novamente nas mesmas condições da fase anterior, logo após a centrifugação o sobrenadante foi descartado.

Ao precipitado celular foi adicionado 1ml de tampão TRIS 10 mmol pH 8.5 para melhor preservação do DNA, e colocado em banho maria a 100°C (+-2°C) durante 15 minutos, após este período o microtubo novamente foi centrifugado a 11200g por 3 minutos a 10°C. Após o término deste processo, foi retirado o volume de 600 µL do sobrenadante e transferido para um novo microtubo estéril e mantido em geladeira a 10°C (+- 1°C).

#### **4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR**

Para a realização da PCR (*polymerase chain reaction*) foram utilizados os reagentes nas seguintes concentrações, água deionizada em quantidade suficiente para uma reação de 30 µL, tampão de reação adicionado de MgCl<sub>2</sub> na concentração final de 1X (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 a 25 °C; 0,01% de gelatina; KCl 500 mM), desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP) na concentração final 0,2mM, oligonucleotídeos iniciadores *forward* e *reverse* na concentração final 0,2mM, taq polimerase na concentração final de 1 unidade por reação. Foi utilizado o volume de 7 µL de DNA para todas as reações.

No termociclador o protocolo utilizado foi o mesmo para todas as reações, alterando somente a temperatura de anelamento. O protocolo utilizado foi 94°C durante 1 minuto para desnaturação, seguido de 30 ciclos programados com os seguintes passos: temperaturas de 94°C para desnaturação por 45 segundos, temperatura de anelamento por 45 segundos e 72°C para extensão durante 45 segundos. Por fim, uma fase final de extensão de 72°C por 1 minuto.

#### **4.5 ANÁLISE DE ELETROFORESE**

Os fragmentos de DNA amplificados, foram então separados por meio da eletroforese em gel de agarose a 1%, submerso em tampão TAE em concentração final 1X. A solução estoque de TAE 50X é composta por tris base a 242g, ácido acético a 57,1 mL, EDTA (5mmol) 100mL e água destilada em quantidade suficiente para 1000 mL.

Após a migração, o gel foi colocado em uma solução com brometo de etídio em concentração de 1mg/mL (diluição 1:10 de solução 10 mg/mL – Sigma-Aldrich). E analisado por meio de transiluminação com luz ultravioleta.

#### **4.6 ANÁLISE MOLECULAR DE FATORES DE VIRULÊNCIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE PATOTIPO DE *E. coli***

Foram analisados fatores de virulência para identificar 7 patotipos, sendo eles *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* de agregação difusa (DAEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* de meningite neonatal (MNEC), como também cepas para controle positivo de reação (Tabela 3). Os fatores de

virulência analisados foram toxinas, plasmídeos, fímbrias, sideróforos e regulador transcricional que estão intimamente relacionados aos patótipos.

**Tabela 3:** Genes pesquisados e oligonucleotídeos iniciadores para identificação de genes de virulência associados a patótipos de *E. coli*.

PATÓTIPO	GENE	DESCRIÇÃO	INICIADORES	TAMANHO (BP)	TEMPERATURA DE ANELAMENTO	CEPA CONTROLE POSITIVO
DAEC	<i>afaB-C</i>	Operon AFA- Dr	5' CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG 3' 3' GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC 5'	792 bp	55°C	030 e k552
EAEC	<i>pCVD432</i>	locus do Plasmídeo pAA	5' CTGGCGAAAGACTGTATCAT 3' 3' CCATGTATAGAAATCCGCTGTT 5'	630 bp	55° C a 60° C	EAEC 042
	<i>aggR</i>	Ativador transcricional	5' CTAATTGTACAATCGATGTA 3' 3' CTGAAGTAATTCTTGAAT 5'	324 bp	50° C	
	<i>pic</i>	Mucinase	5' TTCAGCGGAAAGACGAA 3' 3' TCTGCGCATTACCA 5'	500 bp	55°C a 60° C	
	<i>pet</i>	Toxina codificada por plasmídeo	5' CCGCAATGGAGCTGCAAC 3' 3' CGAGTTTTCCGCCGTTTTTC 5'	1133bp	59°C	
EHEC	<i>stx 1/2</i>	Toxina de Shiga	5' TTTACGATAGACTTCTCGAC 3' 3' CACATATAAATTATTTTCGCTC 5'	227 bp	48°C a 51°C	EHEC 933
	<i>Eae</i>	Adesina intimina	5' CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC 3' 3' CCCGGATCCGCTCGCCAGTATTCG 5'	877 bp	52°C a 60°C	
EPEC	<i>EAF</i>	Plasmídeo	5' CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA 3' 3' TATGGGGACCATGTATTATCA 5'	396 bp	52°C	EPEC 11 e 23
	<i>Eae</i>	Adesina	5' CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC 3' 3' CCCGGATCCGCTCGCCAGTATTCG 5'	877 bp	52°C a 60°C	
ETEC	<i>ST</i>	Toxina	5' CAGGATGCTAAACAGTAGAGT 3' 3' CCCACGATAATTATTATTTCCCT 5'	174 bp	60°C	ETEC H10407
	<i>LT</i>	Toxina	5' GGCACAGATTATACCGTGC 3' 3' CTGTATATTTGCTTAAGCC 5'	696 bp	50°C	
MNEC	<i>SFA</i>	Fímbria	5' CGGAGGAGTAATTACAACCTGGCA 3' 3' CATTCTACGTGGTCAAGAGGCCCTC 5'	410 bp	60°C	FV34 E FVL2
	<i>CNF</i>	Fator necrosante citotóxico	5' GTGAAGCTCAACGAGACTAT 3' 3' TCAGTAGCTCCTCTCATCA 5'	826 bp	53°C	
UPEC	<i>FyuA</i>	Sideróforo	5' TGAGTGGGAAATACACCACC 3' 3' TTACCCGATTGCTTAATGTC 5'	725 bp	54°	FV34 E FVL2
	<i>chuA</i>	Sideróforo	5' TAACTGTCATAGCGGGTTCC 3' 3' AGTCTCTGAGCGTTTAGTG 5'	439 bp	55°C	
	<i>yfc</i>	Fímbria	5' ATCCGTGTTGGCTGGC 3' 3' GGTCATGGCGCAGTT 5'	244 bp	54°C	
	<i>vat</i>	Toxina autotransportadora vacuolizante	5' CAGAACATTTGCTCCCTTGT 3' 3' ACACGTTCCAGGATTCAGT 5'	978 bp	53°C	
	<i>Pap</i>	Fímbria P	5' GACGGCTGACTGCAGGGTGTGGCG 3' 3' ATAACGTAGGACGCTTTTCCTATA 5'	328 bp	60°C	
	<i>focA</i>	Fímbria F	5' GAAAGTAGATGGAGCTAAAAGCAAT 3' 3' CATGACATGCCAGTGGTTTC 3'	472 bp	54°C	

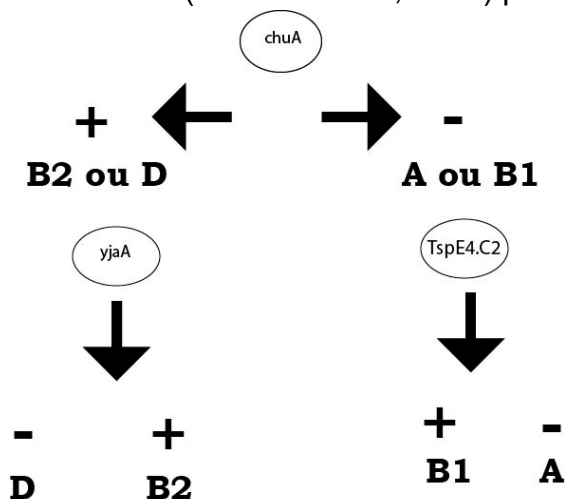
#### 4.7 ANÁLISE DE FILOGRUPO

A análise molecular de filogrupos foi feita a partir da amplificação de três *loci* (Tabela 4) para identificar a linhagem bacteriana seguindo protocolo estabelecido por Clermont e colaboradores (CLERMONT *et al.*, 2000). Os filogrupos foram definidos de acordo com a chave dicotômica (imagem 4) proposta por Clermont. O esquema sugere que cepas de *E. coli* positivadas para *chuA* e que também sejam positivas para *yjaA*, são do filogrupo B2, enquanto as cepas negativas para *yjaA*, pertencem ao filogrupo D. Já as cepas que foram negativas para *chuA* e positivas para TSPE4.C2, são caracterizadas como filogrupo B1, enquanto as negativas são filogrupo A. Para controle de reação, foram utilizados os protótipos EAEC 042 para filogrupo D e protótipo EAEC 17.2 para filogrupo A.

**Tabela 4:** Oligonucleotídeos iniciadores para identificação de filogrupos.

GENE	INICIADORES	TAMANHO (BP)	TE ANELAMENTO
<i>chuA</i>	5' ATGATCATCGCGGCGTGCTG 3'	281 bp	60°C
	3' AAACGCGCTCGCGCCTAAT 5'		
<i>yjaA</i>	5' TGTTTCGCGATCTTGAAAGCAAACGT 3'	216 bp	62°C
	3' ACCTGTGACAAACCGCCCTCA 5'		
TSPE4.C2	5' GCGGGTGAGACAGAAACGCG 3'	152 bp	60°C
	3' TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG5'		

**Imagem 2:** Chave dicotômica (Clermont et al, 2013) para identificação de filogrupos.



#### 4.8 ANÁLISE DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A caracterização molecular dos determinantes da resistência bacteriana a antimicrobianos, foi executada por meio de amplificação (PCR) de fragmentos de DNA

alvo (Tabela 5). A presença do gene de resistência não necessariamente possibilita o fenótipo de resistência. Pode haver positividade do gene, porém, não ter ocorrido transcrição ou tradução, não manifestando essa característica. Não foram realizadas análises de sensibilidade *in vitro*. Os primers para os genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>IMP</sub>*, foram desenhados no propósito de se identificar mais de um alelo.

**Tabela 5:** Oligonucleotídeos iniciadores para identificação de resistência bacteriana.

GENE	DESCRIÇÃO	INICIADORES	TAMANHO (BP)	TE ANELAMENTO	CONTROL E POSITIVO
<i>aac(6)-Ib-cr</i>	Codificador de aminoglicosídeo N-acetiltransferase	5' AACAGCAACGATTCCGTCAC 3' 3' GGTTACGGTACCTTGCTCT 5'	477 bp	57°C	
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase	5' TGTCACTGTATCGCCGTC 3' 3' CTCAGTGCTCTACAGAAAACC 5'	1011 bp	57°C	C11 895946
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	Nova Delhi metalo-β-lactamase	5' GGTGGCGATCTGGTTTC 3' 3' GGCCTTGCTGCTTATGC 5'	512 bp	57°C	1
<i>bla<sub>OXA</sub></i>	Oxalinas	5' GCGTGGTTAAGGATGAACAC 3' 3' ATCATCAAGTTCAACCAACC 5'	440 bp	58°C	
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	Verona metalo-β-lactamase	5' GATGGTGTGGTTCGCATATC 3' 3' CTCGATGAGAGTCCTTAGAG 5'	332 bp	55°C	
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	Imipenase	5' CATTCCATAGCGACAGCAC 3' 5' AACACGGTTTGGTGGTTCTT 3'	309 bp	57°C	
		3' GGACTTGGCCAAGCTTCTA 5'	440 bp		
<i>bla<sub>CTXM-1</sub></i>	ESBL CTX-M grupo 1	5' GACGATGTCCTGGCTGAGC 3' 3' AGCCGCCGACGCTAATACA 5'	499 bp	59°C	
<i>bla<sub>TOHO</sub></i>	ESBL CTX-M grupo 2	5' GCGACCTGGTTAACTACAATCC 3' 3' CGGTAGTATTGCCCTTAAGCC 5'	351 bp	51°C	<i>K. pneumoniae</i>
<i>bla<sub>CTXM82</sub></i> 5	ESBL CTX-M grupo 3	5' CGCTTGGCCATGTGCAGCACC 3' 3' GTCCAGTACGATCGAGCC 5'	307 bp	61°C	IOC-Fiocruz
<i>bla<sub>CTXM91</sub></i> 4	ESBL CTX-M grupo 4	5' GCTGGAGAAAAGCAGCGGAG 3' 3' GTAAGCTGACGCAACGTCTG 5'	474 bp	58°C	CCBH 4955.
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	Beta-lactamases de espectro estendido	5' CGCCTGTGTATTATCTCCCT 3' 3' CGAGTAGTCCACCAGATCCT 5'	294 bp	57°C	

#### 4.9 Multilocus sequence typing (MLST)

A tipagem de sequência multiloci (MLST) foi feita de acordo com o protocolo do Instituto Pasteur (<http://bigsd.b.pasteur.fr/ecoli/ecoli.html>). Para o sequenciamento foi realizada reação de amplificação (PCR) com volume de 40 µL por reação para a posterior purificação dos fragmentos de DNA. A purificação para o sequenciamento foi realizada com o kit *Reliaprep® DNA Clean-up and concentration system* seguindo as recomendações do fabricante.



O amplicon purificado foi distribuído no volume de 2,5 µL em placa e adicionado um mix para junção de nucleotídeos fluorescentes. O kit utilizado foi o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems™) para a posterior identificação pela plataforma *ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer 3500* (Applied Biosystems™).

Os primers utilizados para reação de PCR são de 8 genes conservados na espécie *E. coli*, (tabela 6) de acordo com o indicado pelo instituto Pasteur, (i) *dinB*, responsável pela proteína DNA polimerase, (ii) *icdA*, responsável pela proteína isocitrato desidrogenase; (iii) *pabB*, responsável pela proteína p-aminobenzoato sintase; (iv) *polB*, responsável pela síntese da proteína DNA polimerase II; (v) *putP*, responsável pela proteína prolona, permease; (vi) *trpA*, responsável pela proteína triptofano sintase subunidade A; (vii) *trpB*, responsável pela proteína triptofano sintase subunidade B e finalmente (viii) o gene *uidA*, responsável pela proteína beta-glucoronidase.

Os STs definidos pelo protocolo Pasteur, tiveram seus complexos clonais definidos, para então serem confrontados em estudo de Clermont e colaboradores (CLERMONT *et al*, 2015) para se identificar grupos clonais correspondentes no protocolo Warwick, por ser amplamente mais utilizado que o Pasteur. Grupos clonais permitem o estudo da relação epidemiológica entre as cepas de *E. coli*.

Os grupos clonais foram definidos como isolados com alelos idênticos em 6 loci.

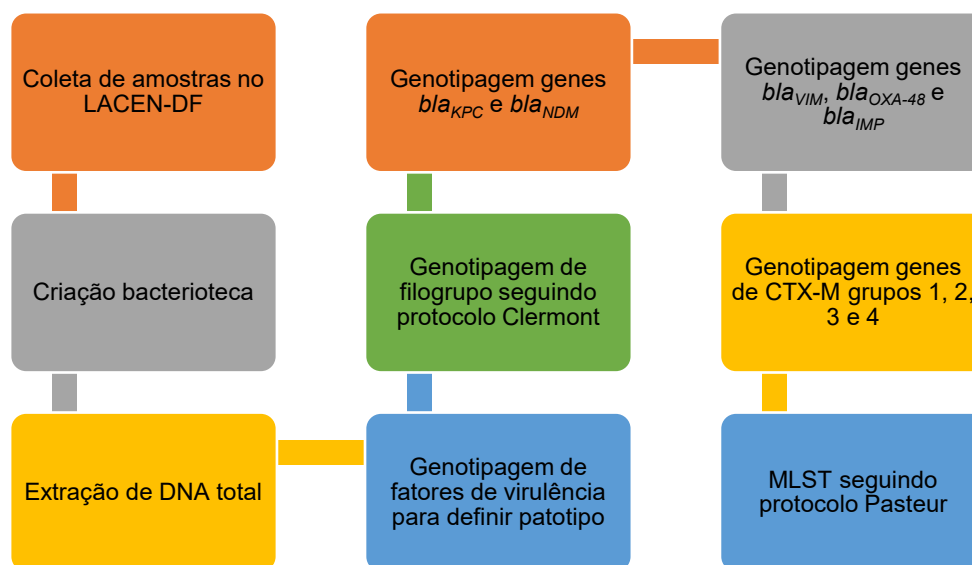
**Tabela 6:** Oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento de *loci*.

GENÓTIPO	INICIADORES	TAMANHO DE FRAGMENTO (BP)	TE ANELAMENTO
<i>dinB</i>	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAGAGGTGAGCAATGCGTA 3' 3' TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGTAGCCCCATCGCTTCCAG 5'	450 bp	
<i>icdA</i>	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAATTCGCTTCCCGGAACATTG 3' 3' TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATGATCGCGTCACCAAAYTC 5'	516 bp	
<i>pabB</i>	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAATCCAATATGACCCGCGAG 3' 3' TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGTTCCAGTTCGTCGATAAT 5'	468 bp	
<i>polB</i>	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGCGGCTATGTGATGGATTTC 3' 3' TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGTTGGCATCAGAAAACGGC 5'	450 bp	
<i>putB</i>	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAGTGTAAACCCGTGGATTGC 3' 3' TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGATCGGCCTCGGCAAAGCG 5'	456 bp	55°C
<i>trpA</i>	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGCTACGAATCTCTGTTGCC 3' 3' TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGTTTCATCGTTGTACAAA 5'	561 bp	
<i>trpB</i>	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACACTATATGCTGGGCACCGC 3' 3' TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTCGTCTTCAAATATC 5'	594 bp	

<i>uidA</i>	5' GTTTTCCAGTCACGACGTTGTACATTACGGCAAAGTGTGGGTCAAT 3' TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCATCAGCACGTTATCGAATCCTT 5'	600 bp
Sequenciamento	5' GTTTTCCAGTCACGACGTTGTA 3' 3' TTGTGAGCGGATAACAATTC 5'	

No fluxograma 1, são exibidos de forma cronológica e resumida as etapas de execução deste trabalho.

**Fluxograma 1:** Representação esquemática resumida da metodologia aplicada no trabalho.



## 5.RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1 CEPAS DE *E. COLI*

Um total de 36 cepas de *E. coli*, sem duplicatas, resistentes a carbapenem (carba-R), encaminhadas ao LACEN-DF por hospitais entre os anos de 2010 e 2017 foram avaliadas neste estudo. Foram isoladas cepas de hospitais nas regiões administrativas do Plano Piloto (Lago Sul), Taguatinga, Samambaia, Ceilândia e Guará.

Os isolados foram coletados de 6 tipos de amostras biológicas: 13 (36,1%) cepas de amostra de swab retal, 12 (30,5%) cepas de amostra de urina, 3 cepas de amostra de sangue (8,3%), 2 (5,5%) cepas isoladas de aspirado traqueal, 2 (5,5%) cepas de amostra de escara e 1 (2,7%) amostra de líquido peritoneal (Tabela 7). Para 3 (8,3%) das cepas, não foi possível obter informação sobre o local de coleta da amostra biológica.

Nos anos 2010, 2011 e 2012, o LACEN recebeu os primeiros isolados de *E. coli* carba-R, o número não foi expressivo durante estes 3 anos, apenas 5 cepas foram isoladas nos hospitais. Porém, a partir do ano 2013, percebe-se crescimento no número de isolados no DF, apenas no ano 2013, 4 cepas foram isoladas. Em 2014 a quantidade aumentou para 7 isolados, entretanto, 2015 foram coletados a mesma quantidade de isolados que em 2013. Ocorreu um aumento significativo a partir do ano 2016, mantendo esta mesma proporção em 2017, exibindo um alto potencial de disseminação das cepas de *E. coli* carba-R no Distrito Federal (Tabela 7).

Em estudo conduzido por Faria Junior e colaboradores no DF de 2011 a dezembro de 2013, foram isoladas 7 cepas de *E. coli* identificadas como resistentes ao antibiótico carbapenem, o pesquisador em questão já previa o aumento na quantidade de isolamentos, e alertava a respeito do risco das cepas de *E. coli* carba-R (FARIA JUNIOR, 2014).

**Tabela 7:** Lista de cepas de *E. coli* resistentes a carbapenem e data de isolamento agrupadas por amostra clínica.

CEPA (N=36)	DATA DE COLETA	AMOSTRA CLÍNICA	% POR AMOSTRA CLÍNICA (N=36)
8	29/10/2013	Swab retal	36,1 (n=13)
9	21/01/2014		
15	23/01/2014		
2	05/06/2014		
5	16/09/2014		
4	23/03/2015		
32	25/04/2016		
23	15/06/2016		
26	23/05/2017		
33	10/10/2017		
34	10/10/2017		
36	10/10/2017		
20	N/I		
12	06/05/2010	Urina	30,5 (n=12)
19	08/07/2011		
10	13/04/2013		
6	13/09/2013		
14	12/02/2014		
1	30/05/2014		
3	16/06/2014		
22	17/05/2016		
29	15/06/2016		
21	26/10/2016		
25	26/10/2016		
35	13/12/2017		
16	14/01/2013	Sangue	8,3 (n=3)
31	30/09/2015		
24	01/07/2016		
11	11/01/2012	Aspirado endotraqueal	5,5 (n=2)
7	13/11/2015	Fragmento de Escara	5,5 (n=2)
13	06/12/2011		
28	07/02/2017	Liquido peritoneal	2,7 (n=1)
27	03/04/2017		
18	07/10/2010	N/I	8,3 (n=3)
17	13/04/2015		
30	05/02/2016		

\*N/I – A amostra biológica não teve sua procedência definida.

A presença de *E. coli* nas amostras de urina, sangue, líquido peritoneal, escara e aspirados traqueal, define infecção, considerando que, a espécie *E. coli* tem por habitat o trato intestinal (ROBINS-BROWNE *et al*, 2016). As bactérias isoladas de swab retal de pacientes assintomáticos demonstram o papel do intestino humano

como potencial reservatório de cepas de *E. coli* resistentes a carbapenem (STOPPE *et al*, 2017).

## **5.2 ANÁLISE DE FILOGRUPO EM CEPAS DE *E. COLI* CARBA-R**

As cepas de *E. coli* foram classificadas por PCR multiplex para a definição de filogrupos seguindo protocolo estabelecido por Clermont e colaboradores (CLERMONT *et al.*, 2000). A definição de filogrupo mostrou um predomínio de linhagens comensais do trato intestinal (filogrupo A e B1) entre as cepas resistentes a carbapenem (carba-R). Das 36 cepas carba-R, 12 (33,3%) foram caracterizadas como filogrupo A, 9 (25%) do filogrupo B1, 9 (25%) como filogrupo B2 e 6 (16,6%) do filogrupo D (Tabela 8).

De acordo com a literatura (CLERMONT *et al*, 2000), as linhagens A e B1 são definidos majoritariamente como comensais, oferecendo baixo risco patogênico. Não obstante, a detecção no presente estudo de 10 cepas caracterizadas como filogrupo A e B1 em amostras de sangue, urina, escara e líquido peritoneal, comprova o potencial oportunista das cepas de *E. coli* carba-R pertencentes aos filogrupos A ou B1 (KARAMI *et al*, 2017).

Divergindo da literatura, em nossa coleção os isolados de ITU foram definidos de forma equitativa nos filogrupos A (25%), B1 (25%), B2 (25%) e D (25%) (tabela 8), sinalizando que parte dos quadros infecciosos são oportunistas. A literatura imputa como facilitador da maioria dos casos de ITU o ambiente nosocomial, o uso de cateteres aliado à precariedade de higiene na região perianal e genital (LACOVELLI *et al*, 2014; STAMM & COUTINHO, 1999), o que facilitaria o desenvolvimento de infecções por linhagens comensais.

Em estudos realizados na Mongólia, México e Brasil com isolados bacterianos de ITU, foi descrita a prevalência relevante do filogrupo B2, seguido em menor número pelo filogrupo D e então pelo A e B1 (MIRANDA-ESTRADA *et al*, 2017; MUNKHDELGER *et al*, 2017; LARA, 2017). Em outro estudo realizado na Suécia, com isolados de *E. coli* de swab retal e de urina de crianças, foi identificado que as cepas uropatogênicas eram majoritariamente filogrupo B2 e em menor número filogrupo D, enquanto as cepas de swab retal, majoritariamente filogrupo A e em menor número filogrupo B1 (KARAMI *et al*, 2017).

Enquanto, a definição de filogrupos A e B1 nos isolados de swab retal, corroboram com a literatura, confirmando o baixo potencial patogênico e comensalismo das mesmas (Tabela 8) (KARAMI *et al*, 2017). A presença de uma cepa B2 também dialoga com a literatura, que indica a presença desse filogrupo em cepas que são transientes no trato intestinal (KARAMI *et al*, 2017).

**Tabela 8** – Filogrupo de cepas de *E. coli* resistentes a carbapenem agrupadas por amostra clínica.

CEPA (N=36)	AMOSTRA	FILOGRUPO	NICHO DO FILOGRUPO (% POR AMOSTRA) (N=36)
9	Swab retal	A	Comensal intestinal (76,9%) (n=10)
2		A	
23		A	
26		A	
36		A	
20		A	
15		B1	
5		B1	
4		B1	
33		B1	
8	B2	Patógeno extraintestinal (23,0%) (n=3)	
32	D		
34	D		
1	Urina	A	Comensal intestinal (50,0%) (n=6)
21		A	
25		A	
19		B1	
10		B1	
35		B1	
14		B2	Patógeno extraintestinal (50,0%) (n=6)
3		B2	
29		B2	
12		D	
6	D	Comensal intestinal (33,3%) (n=1)	
22	D		
31	A		
16	Sangue	B2	Patógeno extraintestinal (66,6%) (n=2)
24		B2	
11	Aspirado endotraqueal	A	Comensal intestinal (50,0%) (n=1)
7		B2	

**Tabela 8** – Filogrupos de cepas de *E. coli* resistentes a carbapenem agrupadas por amostra clínica.

		Continuação	
28	Fragmento escara	B1	Comensal intestinal (50,0%) (n=1)
13		B2	Patógeno extraintestinal (50,0%) (n=1)
27	Líquido peritoneal	B1	Comensal intestinal (100%) (n=1)
17	N/I	A	Comensal intestinal (33,3%) (n=1)
18		B2	Patógeno extraintestinal (66,6%) (n=2)
30		D	

### 5.3 ANÁLISE DE FATORES DE VIRULÊNCIA

Foram analisados 18 genes de fatores de virulência relevantes para definição de patótipos InPEC e ExPEC (Tabela 9). Os fatores de virulência presentes em doenças diarreicas são determinantes para a caracterização do patótipo, diferentemente dos fatores de virulência preditores de ExPEC, que não possui um conjunto de fatores de virulência decisório para UPEC ou MNEC (DONNENBERG, 2013).

Os fatores de virulência que categorizam o grupo ExPEC, prevalecem de forma expressiva 88% (n=32/36), mesmo dentre os isolados de swab retal (Tabela 10), indicando o trato intestinal como possível reservatório de cepas virulentas e o possível foco de progressão para quadros infecciosos em casos de imunidade comprometida. Dois dentre os fatores de virulência testados (*fyuA* e *focA*) foram igualmente frequentes entre as cepas de *E. coli* carba-R. Os fatores *fyuA*, importante receptor de sideroforo, e *focA*, fimbria da família F1C, foram os fatores detectados em maior número, presentes em 16 cepas (44,4%) (tabela 9). *FyuA* (do inglês, *Ferric yersinia uptake*) é necessário para a progressão da infecção do trato urinário, atua como receptor de captação de ferro do tipo yersiniabactina para sobrevivência em ambientes com escassez de ferro livre (HABIBI *et al*, 2017). Este gene codifica para um receptor de membrana externa que se conecta com o sideroforo yersiniabactina.

Este sideroforo capta ferro férrico (Fe<sup>3</sup>) do hospedeiro, para que a *E. coli* utilize como co-fator enzimático para seu metabolismo (JACOBI *et al*, 2001). Estudos sugerem que *fyuA* é necessário para a formação de biofilme não apenas em ITU ocasionadas pela presença de dispositivos hospitalares, como também em ITU não-

nosocomial, possibilitando a sobrevivência da cepa meio a urina (HANCOCK *et al*, 2008). Das cepas positivas para *fyuA*, 62,5% (n=10/16) foram classificadas como B2 ou D, distribuídas nas amostras urina, sangue, aspirado traqueal, escara e não identificado (Tabela 10). Porém, 37,5% (n=6/16) das cepas com *fyuA* são comensais (A e B1), e foram isoladas das amostras swab retal, urina, sangue, líquido peritoneal e escara (tabela 11). A maior prevalência do gene *fyuA* é em amostras de urina.

Embora detectado com a mesma frequência que *fyuA* (44,4%), 75% (n=12) das cepas *focA*-positivas se concentraram nos filogrupos intestinais A e B1. *focA* é um gene que codifica uma subunidade de fímbria, este gene faz parte do operon *focAICDFGH* que codifica fimbrias. A fímbria FocA encontra receptores na bexiga e no rim, mediando a aderência dos microrganismos ao epitélio da bexiga e endotélio renal. FocA fixa-se aos túbulos distais, glomérulo e endotélio vascular dos rins (DONNENBERG, 2013). Um dos principais pontos a respeito da aderência dessa fímbria às células renais, é sua capacidade em gerar respostas do organismo hospedeiro, liberando interleucina 8, gerando inflamação renal (ROOS *et al*, 2006). As ações mediadas pelas fimbrias FocA mostram o potencial de virulência que cepas carba-R de *E. coli* caracterizadas como comensais (filogrupos A e B1) podem albergar.

Nossos dados epidemiológicos mostram a ocorrência de 7 destas cepas comensais isoladas de infecções de urina, líquido peritoneal, fragmento de escara, e amostra não identificada (Tabela 10). Apenas 4 cepas definidas como potencialmente patogênicas possuem FocA, sendo 1 cepa isolada de swab retal de filogrupo D, duas cepas isoladas de urina de filogrupo D e uma cepa isolada de escara, filogrupo B2. Outra fímbria identificada, a YFCV, foi detectada em 33,3% (n=12) das cepas (Tabela 9). Sabe-se que *yfcv* codifica para subunidades da fímbria e pertencente ao operon *yfcOPQRSUV* (DONNENBERG, 2013; SPURBECK *et al*, 2012) Entretanto, há muito a ser elucidado a respeito de sua efetiva participação na colonização de sítios extraintestinais (KOREA *et al*, 2010). YFCV foi predominantemente isolado de cepas potencialmente patogênicas 75% (n=9), sendo identificada majoritariamente em cepas filogrupo B2 (n=8), enquanto 25% (n=3) foram isolados de cepas comensais (Tabela 10). Este gene foi encontrado de forma predominante (n=4) em cepas isoladas de amostras de urina (Tabela 10).

Também identificamos a presença de uma toxina, a *vat/sat*. Este gene foi detectado em 27,7% (n=10) das cepas de *E. coli* carba-R. Esta toxina é uma serina



protease pertencente ao grupo SPATE (do inglês, *serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae*). *Vat* é uma toxina autotransportadora vacuolizante, que provoca efeito citopático causando vacúolos no citoplasma de células não apenas da bexiga, como também dos rins (GUYER *et al*, 2002). *Vat* facilita a colonização da bexiga em modelo animal e é expresso durante o crescimento em urina humana (SPURBECK *et al*, 2012). O gene *vat* foi identificado predominantemente em cepas de filogrupos extraintestinais 80% (n=8), sendo distribuído de forma equivalente nos filogrupos B2 (n=4) e D (n=4). O gene *vat* foi em maior número, isolado de amostras de swab retal, demonstrando mais uma vez o potencial da microbiota intestinal como reservatório para cepas carba-R virulentas.

Outro sideróforo identificado nas cepas de *E. coli* carba-R foi o gene *chuA*. Este gene foi detectado em 25% (n=9) cepas de *E. coli*. Sua presença não é relevante para quadros de pielonefrite, porém, é importante em quadros de ITU. *CHUA* sequestra ferro diretamente do complexo heme da hemoglobina do hospedeiro (DONNENBERG, 2013). O gene *chuA* foi detectado apenas em cepas de filogrupo intestinal B2 (n=5) e D (n=4), sendo distribuído de forma uniforme. Esse achado corrobora com a literatura (NÈGRE *et al*, 2004). *CHUA* foi identificado de forma equivalente nas amostras de swab retal e urina, detectado em 3 amostras cada.

Outros genes detectados, porém, com menor frequência foram *cnf* 11,1% (n=4), *pap* 8,3% (n=3), *afa* 2,7% (n=1), *sfa* 2,7% (n=1) e *eae* 2,7% (n=1). *CNF* ou fator necrosante citotóxico, provoca inflamação do epitélio da bexiga e tem participação na invasão da barreira hemato-encefálica sendo importante para o desenvolvimento de meningites (BADGER *et al*, 2000). Corroborando com a literatura, foi isolado de cepas de filogrupo extraintestinal (DONNENBERG, 2013; HOFMAN *et al*, 2000).

O operon *pap* (do inglês, *pyelonephritis associated pili*), foi isolado de três cepas filogrupo B2. Essa fimbria é muito eficiente da colonização não apenas do trato urinário, como também do epitélio renal, sendo associado tanto a ITU como pielonefrite aguda (WULLT *et al*, 2001).

As amostras biológicas que possuíram cepas com maior número de fatores de virulência são urina e swab retal (Tabela 10), sendo que, em swab retal as cepas de filogrupos comensais (76.9% - n=10) acumularam mais fatores de virulência do que cepas de filogrupo patogênico (23% - n=3). Esses resultados evidenciam que cepas

de *E. coli* comensais do trato intestinal atuam como reservatórios de fatores virulência. Já em urina, as cepas de filogrupo patogênico (50% -6) albergaram mais fatores de virulência do que as cepas comensais. Em estudos reportados na literatura, cepas de *E. coli* de filogrupos B2 e D isoladas de sítios extraintestinais, portaram mais fatores de virulência do que os filogrupos A e B1 (FRÖMMEL *et al*, 2013; NOWROUZIAN *et al*, 2006; JOHNSON *et al*, 2002).

**Tabela 9:** Fatores de virulência detectados e distribuição em filogrupos.

FATORES DE VIRULÊNCIA	FREQUÊNCIA (N = 36)	DISTRIBUIÇÃO EM FILOGRUPO (%)
<i>fyua</i> (sideróforo)	44,4% (n=16)	A – 12.5% (n=2) B1 – 25% (n=4) B2 – 50% (n=8) D – 12.5% (n=2)
<i>focA</i> (fímbria)	44,4% (n=16)	A – 37.5% (n=6) B1 – 37.5% (n=6) B2 – 6% (n=1) D- 19% (n=3)
<i>yfcv</i> (fímbria)	33,3% (n=12)	A – 17% (n=2) B1 – 8% (n=1) B2 – 67% (n=8) D – 8% (n=1)
<i>vat/sat</i> (toxina)	27,7% (n=10)	A – 20% (n=2) B1 – 40% (n=4) B2 – 40% (n=4)
<i>chua</i> (sideróforo)	25% (n=9)	B2 – 56% (n=5) D – 44% (n=4)
<i>Cnf</i> (fator necrosante citotóxico)	11,1% (n=4)	B2 – 75% (n=3) D – 25% (n=1)
<i>pap</i> (fímbria)	8,3% (n=3)	B2 – 100% (n=3)
<i>afa/dr</i> (operon)	2,7% (n=1)	B1 – 100% (n=1)
<i>sfa</i> (fímbria)	2,7% (n=1)	B2 - 100% (n=1)
<i>eae</i> (adesina)	2,7% (n=1)	B1 – 100% (n=1)

Quanto a distribuição de fatores de virulência por filogrupos, o filogrupo B2, conhecido como extraintestinal e potencialmente patogênico, acumula a maior quantidade de fatores de virulência, totalizando 33. Seguindo o filogrupo B2, o filogrupo B1 alberga 17 genes para fatores de virulência, apenas 5 fatores a mais que o filogrupo A (n=12) e 6 a mais que o filogrupo D (n=11) (Tabela 10). Este resultado está de acordo com a literatura, onde no estudo de Kumar e colaboradores, demonstrou-se a maior capacidade de cepas do filogrupo B2 albergarem maior número de fatores de virulência, o que pode ser explicado pela sua necessidade de adaptar-se, colonizar e sobreviver a sítios extraintestinais (KUMAR *et al*, 2017).

**Tabela 10:** Quantidade de fatores de virulência por amostra biológica e por filogrupo.

<b>AMOSTRA CLÍNICA (N=36)</b>	<b>FILOGRUPO</b>	<b>DISTRIBUIÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA</b>
Swab retal (n=21)	A=6	<i>fyuA</i> (1), <i>vat</i> (2), <i>focA</i> (3), <i>yfcv</i> (1)
	B1=4	<i>fyuA</i> (1), <i>vat</i> (2), <i>focA</i> (2) <i>AFA</i> (1), <i>eae</i> (1)
	B2=1	<i>chuA</i> , <i>yfcv</i> , <i>vat</i>
	D=2	<i>cnf</i> (1), <i>chuA</i> (2), <i>focA</i> (1)
Urina (n=23)	A=3	<i>yfcv</i> (1), <i>focA</i> (2)
	B1=3	<i>fyuA</i> (1), <i>vat</i> (2), <i>focA</i> (2)
	B2=3	<i>fyuA</i> (3), <i>cnf</i> (1), <i>chuA</i> (2), <i>yfcv</i> (2), <i>pap</i> (1), <i>vat</i> (1)
	D=3	<i>fyuA</i> (1), <i>chuA</i> (1), <i>yfcv</i> (1), <i>focA</i> (2)
Sangue (n=9)	A=1	<i>fyuA</i>
	B2=2	<i>fyuA</i> (2), <i>cnf</i> (1), <i>chuA</i> (1), <i>yfcv</i> (2), <i>vat</i> (1), <i>pap</i> (1)
Aspirado traqueal (n=8)	A=1	0
	B2=1	<i>fyuA</i> , <i>sfa</i> , <i>cnf</i> , <i>chuA</i> , <i>yfcv</i> , <i>vat</i> , <i>pap</i> , <i>focA</i>
Líquido peritoneal (n=2)	B1=1	<i>fyuA</i> , <i>yfcV</i> , <i>focA</i>
Escara (n=4)	B1=1	<i>fyuA</i> , <i>focA</i>
	B2=1	<i>fyuA</i> , <i>yfcv</i> ,
Nenhum (n=5)	A=1	<i>focA</i>
	B2=1	<i>fyuA</i> , <i>yfcv</i>
	D=1	<i>fyuA</i> , <i>chuA</i>

#### 5.4 PREDITOR DE UROPATOGENICIDADE EM CEPAS CARBA-R

Em estudo executado por Spurbeck e colaboradores, dentre 23 fatores de virulência de *E. coli*, *fyuA* despontou como o melhor preditor positivo do potencial uropatogênico em *E. coli*. O gene *fyuA* quando combinado com dois dos genes *yfcv*, *chuA* ou *vat*, diferencia UPEC de *E. coli* diarreioogênicas e comensais (SPURBECK *et al*, 2012). Os autores também definiram que a presença exclusiva de *vat* é preditor negativo do potencial uropatogênico. Diante dessa abordagem, 16 (44,4%) das 36 cepas carba-R foram assinaladas como potencialmente uropatogênicas. Destas, 12 foram isolados de amostras clínicas de quadro infeccioso e 2 de swab retal, sendo que 4 cepas possuem a presença de *fyuA* mais dois genes. Sendo que 8 destas amostras são definidas como filogrupo patogênico e 4 definidas como comensais. Assim, cepas de filogrupos extraintestinais e com potencial uropatogênico respondem por 22,2%% (8/36) das cepas de *E. coli* carba-R (Tabela 11).

Das cepas carba-R que não atendiam o critério de uropatogenicidade de Spurbeck (n=20), 10 foram isoladas de swab retal mostrando a importância de cepas comensais intestinais como reservatório de mecanismos de resistência (Tabela 11).

Tabela 11: Genótipo e filogrupos por amostra clínica.

CEPA	AMOSTRA CLÍNICA	GENÓTIPO	FILOGRUPO
11	Aspirado traqueal	N/I	A
7	Aspirado traqueal	<i>fyuA-chuA-vat-focA-cnf-pap-sfa</i>	B2
13	Fragmento Escara	<i>fyuA-yfcv</i>	B2
28	Fragmento escara	<i>fyuA-focA</i>	B1
27	Liq peritoneal	<i>fyuA-yfcv-focA</i>	B1
18	N/I	<i>fyuA-yfcv</i>	B2
17	N/I	<i>focA</i>	A
30	N/I	<i>fyuA-chuA</i>	D
16	Sangue	<i>fyuA-yfcv</i>	B2
24	Sangue	<i>fyuA-yfcv-chuA-vat-cnf-pap</i>	B2
31	Sangue	<i>fyuA</i>	A
8	Swab retal	<i>yfcv-chuA-vat</i>	B2
15	Swab retal	<i>fyuA-vat-focA</i>	B1
32	Swab retal	<i>chuA-focA-cnf</i>	D
36	Swab retal	<i>fyuA</i>	A
26	Swab retal	<i>focA</i>	A
9	Swab retal	<i>vat</i>	A
20	Swab retal	<i>focA</i>	A
5	Swab retal	<i>eae</i>	B1
23	Swab retal	<i>focA</i>	A
2	Swab retal	<i>yfcv-vat</i>	A
4	Swab retal	<i>vat</i>	B1
33	Swab retal	<i>focA</i>	B1
34	Swab retal	<i>chuA</i>	D
19	Urina	<i>vat-focA</i>	B1
14	Urina	<i>fyuA-yfcv-cnf-pap</i>	B2
10	Urina	<i>vat</i>	B1
12	Urina	<i>focA</i>	D
25	Urina	<i>focA</i>	A
1	Urina	N/I	A
21	Urina	<i>focA</i>	A
3	Urina	<i>fyuA-chuA</i>	B2
6	Urina	N/I	D
35	Urina	<i>fyuA-focA</i>	B1
22	Urina	<i>fyuA-yfcv-chuA-focA</i>	D
29	Urina	<i>fyuA-yfcv-chuA-vat</i>	B2

## 5.5 DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA

As cepas de *E. coli* carba-R foram testadas para a presença de dez genes de beta-lactamase incluindo cinco genes de carbapenemases (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>OXA-48</sub>*) e cinco genes de ESBL (*bla<sub>CTX-M</sub>* 1 a 4 e *bla<sub>SHV</sub>*). Também foram testadas para presença de *acc* (resistência a aminoglicosídeo), por este ser opção terapêutica em casos de infecções por enterobactérias com resistência a carbapenem.

As cepas 22 e 29 de *E. coli* não apresentaram resultados positivos para nenhum gene de resistência testado. O gene *bla<sub>KPC</sub>* foi detectado em 52,7% das cepas (n=19), *bla<sub>NDM</sub>* em 36,1% (n=13) e *bla<sub>IMP</sub>* em 36,1% (n=17) (Tabela 12). Genes para as carbapenemases *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>OXA-48</sub>* não foram detectados.

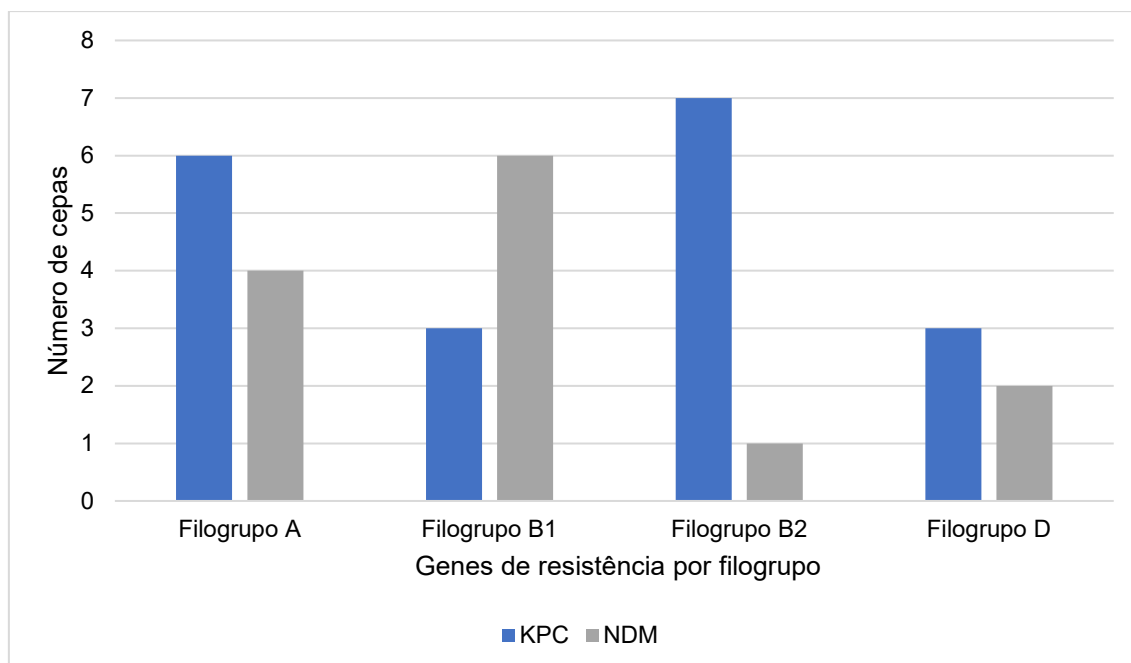
A ocorrência dos genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>* nas cepas de *E. coli* foi detectada de forma excludente. Contudo, das 19 cepas positivas para *bla<sub>KPC</sub>*, 47,3% (n=9) apresentavam resultado positivo para *bla<sub>IMP</sub>* e de 17 cepas positivas para *bla<sub>NDM</sub>*, 35,2% (n=6) apresentavam resultado positivo para *bla<sub>IMP</sub>* (Tabela 12). Um total de 15 cepas albergam duas carbapenemases.

Quanto aos genes ESBL, as cepas que albergam os genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* e *bla<sub>IMP</sub>*, também portavam genes *bla<sub>CTX-M</sub>* ou *bla<sub>SHV</sub>*. Quatro cepas *bla<sub>KPC</sub>*-positivas albergavam CTXM grupo 1, duas cepas albergavam CTXM grupo 2 e uma cepa, portava o gene *bla<sub>SHV</sub>*. Sendo que, duas cepas possuem o genótipo *bla<sub>KPC</sub>-bla<sub>IMP</sub>-bla<sub>CTX-M-1</sub>* e duas possuem o genótipo *bla<sub>KPC</sub>-bla<sub>IMP</sub>-bla<sub>CTX-M-2</sub>*, acumulando assim duas carbapenemases e um gene ESBL. Já dentre as cepas *bla<sub>NDM</sub>*-positivas, três também possuíam CTXM grupo 1 e uma possui CTXM grupo 4, corroborando com a literatura que reporta que cepas de *E. coli* *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>*-positivo, são multirresistentes, albergando inúmeros genes de resistência, entre carbapenemases, genes ESBL e outros como de aminoglicosídeo (FU *et al*, 2019; PORRES-OSANTES *et al*, 2014; CUZON *et al*, 2013).

Adicionalmente, o gene para resistência a aminoglicosídeos *bla<sub>aac(6')-Ib-cr</sub>* foi detectado em 7 cepas carba-R. Cinco das 7 cepas *aac(6')-Ib-cr*-positivas acumulavam também genes *bla<sub>CTX-M</sub>*.

De todas as 36 cepas carba-R, 14 (40%) pertenciam aos filogrupos B2 (64,2% - n=9) e D (35,1% - n=3), e 21 (60%) pertenciam aos filogrupos A (57,1% - n=12) e B1 (42,8% - n=9). Este estudo mostrou que cepas positivas para *bla<sub>KPC</sub>*, se distribuíram de forma uniforme entre os filogrupos A (n=6) e B2 (n=7) e, de forma igual nos filogrupos B1 (n=3) e D (n=3) (Gráfico 1). Já entre cepas *bla<sub>NDM</sub>*-positivas, apenas 2 foram do filogrupo D e 1 filogrupo B2, as outras 10 cepas foram classificadas como filogrupos A (n=4) e B1 (n=6) (Tabela 12, Gráfico 1).

**Gráfico 1:** Distribuição dos genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>* por filogrupos.



A distribuição heterogênea dentre os filogrupos comensais e patogênicos dos genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>*, demonstram tendência de cepas comensais albergarem plasmídeos que contenham o *bla<sub>NDM</sub>* (Gráfico 1). Este resultado é corroborado por estudos realizados na Itália por Giufré e colaboradores, na França por Cuzon e colaboradores e na Inglaterra, Paquistão e Índia, por Mushtaq e colaboradores, estes estudos mostraram cepas de *E. coli* albergando NDM que foram isoladas de pacientes com ITU e definidas como filogrupos A (GIUFRE *et al*, 2018; CUZON *et al*, 2013; MUSHTAQ *et al*, 2011).

No presente estudo, 8 destas cepas foram isoladas de swab retal, mostrando que os isolados de *E. coli* comensais do Distrito Federal comportam-se como depósitos do gene *bla<sub>NDM</sub>*.

No mesmo estudo de Mushtaq e colaboradores e em outro estudo na Itália realizado por Coppo e colaboradores, foi reportado a presença 39% (n=7) de isolados de *E. coli bla<sub>NDM</sub>*-positivas pertencentes ao filogrupos D (COPPO *et al*, 2014; MUSHTAQ *et al*, 2011). Porém, este filogrupos ocorre em menor número no presente estudo. Estes resultados mostram que cepas de *E. coli bla<sub>NDM</sub>*-positivas isoladas no DF, comportam-se de forma similar às cepas isoladas na Europa e Ásia.

Com relação as cepas *bla<sub>KPC</sub>*-positivas, estudo na Tunísia realizado por Tanfous e colaboradores, reportou cepas de *E. coli* dos filogrupos A e B1, (TANFOUS *et al*,

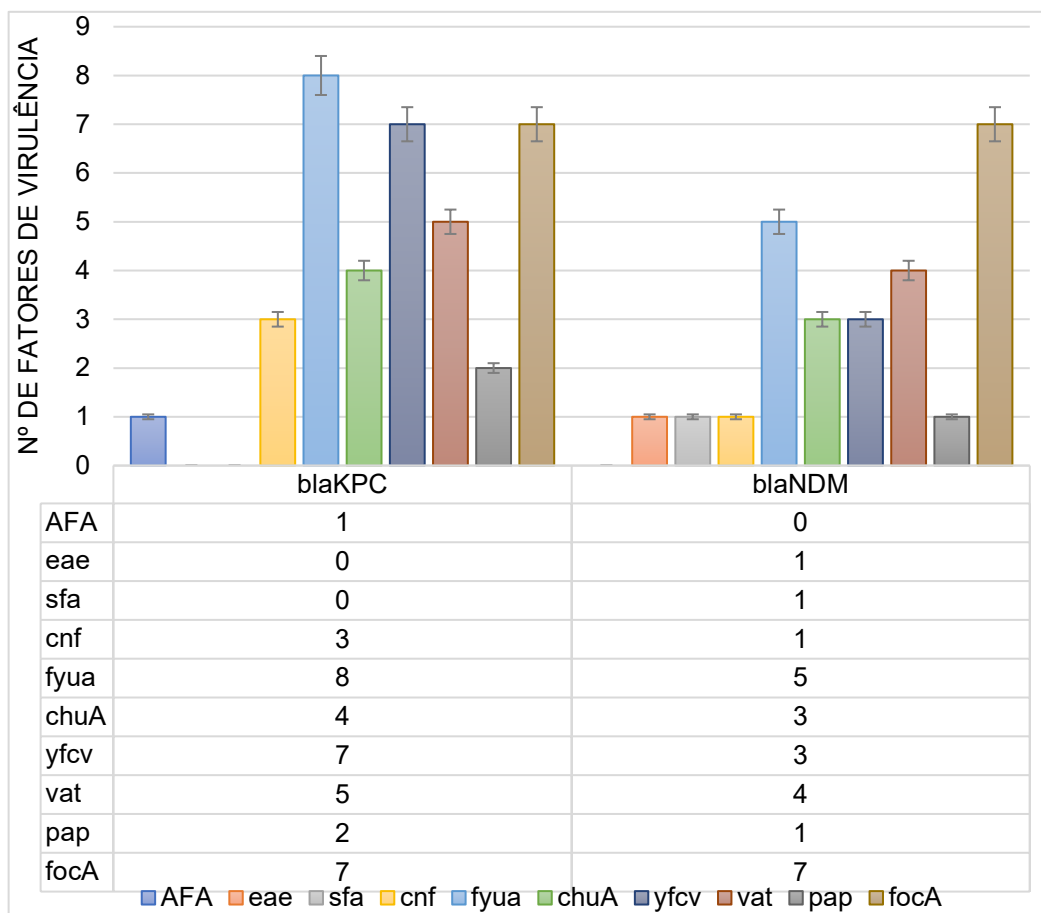
2017). Porém, no estudo de Hazen e colaboradores, houve enorme diversidade de filogrupos entre isolados de *E. coli* *bla*<sub>KPC</sub>-positivo, encontrando-se cepas B1, B2 e D, sendo que o filogrupo B2 foi o mais bem representado (Gráfico 1), dando robustez ao presente estudo (gráfico 1), determinando que apesar da diversidade de filogrupo, são as cepas majoritariamente patogênicas as maiores responsáveis por albergar KPC (HAZEN *et al*, 2018).

Quando considerada a distribuição dos genes de resistência em função do potencial uropatogênico, cepas de filogrupo comensal (A ou B1) e negativas para preditores de Spurbeck (n =32) apresentaram em média 2,3 genes de resistência por cepa. Acumulando menor número de genes de resistência por cepa, as cepas de filogrupo extraintestinais (B2 ou D) e positivas para preditores de uropatogenicidade (n = 4) apresentaram média de genes de resistência igual a 1,7.

As cepas de *E. coli* carba-R, além de albergarem genes de resistência a beta-lactâmicos, também atuam como reservatórios de genes de fatores de virulência (Gráfico 2). Cepas *bla*<sub>KPC</sub>-positivo, portam maior quantidade de fatores de virulência do que cepas *bla*<sub>NDM</sub>-positivo, porém, ambas possuem fatores de virulência de ExPEC, demonstrando que é a presença de fatores ExPEC é indiferente ao gene de resistência, porém, cepas *bla*<sub>KPC</sub>-positivo possuem em média 2 fatores por isolado, enquanto cepas *bla*<sub>NDM</sub>-positivo possuem em média 1.5.



**Gráfico 2:** Frequência de fatores de virulência encontrado junto aos genes de resistência blaKPC e blaNDM



No estudo de Grundmann e colaboradores sobre *Enterobacteriaceae* produtora de carbapenemase de 2017, *E. coli* demonstrou ainda baixa positividade para genes *blaKPC* comparada a *K. pneumoniae* (GRUNDMANN *et al*, 2017). Entretanto, estudos como de Kim e colaboradores, demonstraram que há emergência na disseminação deste gene, como também, algumas destas cepas albergam genes ESBL, corroborando com o presente estudo (KIM *et al*, 2012).

**Tabela 12:** Genótipo de patotipo, filogrupos e perfil de resistência bacteriana por cepa e amostra clínica. Tabela em ordem de presença de gene *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>*.

CEPA	AMOSTRA CLÍNICA	GENÓTIPO*	FILOGRUPO	BLAKPC	BLANDM	BLAIMP	BLACTXM-1	BLACTXM-2	BLACTXM-3	BLACTXM-4	BLASHV	BLAACC
19	Urina	<i>vat-focA</i>	B1	+		+		+				+
14	Urina	<i>fyuA-yfcv-cnf-pap</i>	B2	+		+	+					+
10	Urina	<i>vat</i>	B1	+		+		+				
16	Sangue	<i>fyuA-yfcv</i>	B2	+		+	+					
11	Aspirado traqueal	N/I	A	+		+						
13	Fragmento Escara	<i>fyuA-yfcv</i>	B2	+		+						
18	N/I	<i>fyuA-yfcv</i>	B2	+		+						
8	Swab retal	<i>yfcv-chuA-vat</i>	B2	+		+						
12	Urina	<i>focA</i>	D	+		+						
25	Urina	<i>focA</i>	A	+			+					+
15	Swab retal	<i>fyuA-vat-focA</i>	B1	+								+
1	Urina	N/I	A	+							+	
21	Urina	<i>focA</i>	A	+			+					
17	N/I	<i>focA</i>	A	+								
24	Sangue	<b><i>fyuA-yfcv-chuA-vat-cnf-pap</i></b>	B2	+								
32	Swab retal	<i>chuA-focA-cnf</i>	D	+								
36	Swab retal	<i>fyuA</i>	A	+								
3	Urina	<i>fyuA-chuA</i>	B2	+								
6	Urina	N/I	D	+								
26	Swab retal	<i>focA</i>	A			+		+	+			+
9	Swab retal	<i>vat</i>	A		+	+						+
7	Aspirado traqueal	<b><i>fyuA-chuA-vat-focA-cnf-pap-sfa</i></b>	B2		+	+						
31	Sangue	<i>fyuA</i>	A			+						
20	Swab retal	<i>focA</i>	A		+		+					+
5	Swab retal	<i>eae</i>	B1		+					+		
27	Liq peritoneal	<i>fyuA-yfcv-focA</i>	B1		+		+					
23	Swab retal	<i>focA</i>	A		+		+					
28	Fragmento escara	<i>fyuA-focA</i>	B1		+							
30	N/I	<i>fyuA-chuA</i>	D		+	+						
2	Swab retal	<i>yfcv-vat</i>	A		+							
4	Swab retal	<i>vat</i>	B1		+							
33	Swab retal	<i>focA</i>	B1		+	+						
34	Swab retal	<i>chuA</i>	D		+	+						
35	Urina	<i>fyuA-focA</i>	B1		+	+						
22	Urina	<b><i>fyuA-yfcv-chuA-focA</i></b>	D									
29	Urina	<b><i>fyuA-yfcv-chuA-vat</i></b>	B2									

\*Em negrito, o genótipo utilizado como preditor de potencial uropatogênico de acordo com Spurbeck *et al*, 2012.

N/I: nenhum fator de virulência foi detectado.

## 5.6 DEFINIÇÃO DE ST

Os STs foram definidos de acordo com o quadro de *housekeeping* do instituto Pasteur. Na literatura o protocolo Warwick é o mais frequentemente reportado para *E. coli*, portanto, este trabalho remeteu-se ao grupo clonal Warwick (Tabela 13). Embora

o conjunto de genes explorados nos protocolos Pasteur e Warwick sejam diferentes, Clermont e colaboradores já demonstraram correspondência entre grupos clonais definidos pelos dois protocolos (CLERMONT *et al*, 2000),

Dentre os 36 isolados, 10 CCs foram definidos, mostrando relevante diversificação dentre os perfis presentes no Distrito Federal: CC2 (n=5), CC43 (n=3), CC3 (n=2), CC83 (n=2), CC88 (n=2), CC33 (n=1), CC36 (n=1), CC58 (n=1), CC66 (n=1), CC910 (n=1) e CC 305 (N=1) (Tabela 13). Entre os principais STs identificados estão presentes os STs que formam o complexo clonal 43 (CC WARWICK 131) (N=3). Essa linhagem possui distribuição mundial, e é o grupo clonal mais comumente reportado em quadros infecciosos extraintestinais (NICOLAS-CHANOINE *et al*, 2014).

Uma característica habitual, porém, relevante, é a deste complexo clonal ter como classificação filogenética o grupo B2, conhecido mundialmente como patogênico e predominante em casos de ITU (NICOLAS-CHANOINE *et al*, 2014).

Estudos realizados em vários países indicam que este grupo clonal está fortemente relacionado a resistência antimicrobiana do tipo ESBL, além de possuir resistência a quinolonas, entretanto, essa linhagem possui algumas diferenças em relação a resistência antimicrobiana de acordo com a localização geográfica como a predominância do CTX-M-15 nos Estados Unidos e sua ausência em pacientes assintomáticos na França (NICOLAS-CHANOINE *et al*, 2014; RILEY, 2014).

Depois da descoberta do gene *bla<sub>KPC</sub>* em *E. coli* nos Estados Unidos, é crescente sua presença a nível global, já tendo sido reportada em todos os continentes. Muitos são os estudos relatando a linhagem ST131 com a presença de *bla<sub>KPC</sub>* em ambiente nosocomial e comunitário (CAI *et al*, 2014; KIM *et al*, 2012).

Quando descritos, os isolados com *bla<sub>KPC</sub>* apresentaram em seu plasmídeo a presença dos genes de resistência ESBL, sendo sempre relatados como uma linhagem multirresistente (KIM *et al*, 2012).

Apesar do ST131 ser conhecido graças a disseminação de resistência do tipo CTXM, há vários relatos que associam fortemente essa linhagem a distribuição da também preocupante *bla<sub>KPC</sub>*. Essa linhagem também é reportada como carreador do gene *aac(6')-Ib-cr* (MATHERS *et al*, 2015).

Nossos dados estão em acordo com literatura corrente sobre o CC<sub>P</sub>43 (CC<sub>w</sub>131). As 3 cepas do CC<sub>w</sub>131 foram classificadas como filogrupo B2 e portam

*bla<sub>KPC</sub>*, e 3 delas acumulam *bla<sub>CTX-M</sub>*. Em uma destas cepas do CC131, ainda foi detectado *aac(6')-Ib-cr* (genótipo *bla<sub>KPC</sub>-bla<sub>IMP</sub>-bla<sub>CTX-M1</sub>-aac(6')-Ib-cr*).

As cepas CCw131 também apresentam habilidade para albergar fatores de virulência. Em estudo realizado nos Estados Unidos, identificaram 54 isolados do CC131, possuindo perfil de virulência extraintestinal, principalmente uropatogênico, sendo os fatores Pap, Fyua e Sat/Vat os mais detectados. De acordo com este estudo, nosso trabalho demonstrou que as 3 cepas CCw131, possuem o fator Fyua. (Tabela 13).

As cepas do CCw88, não encontradas na literatura, foram definidas como filogrupo B1, além de ambas albergarem o gene *bla<sub>KPC</sub>*, também albergam IMP e ESBL, demonstrando a capacidade de albergar múltiplos genes de resistência deste grupo.

Já em relação ao gene *bla<sub>NDM</sub>*, este foi primeiramente isolado num paciente sueco que estava viajando na Índia, em vários estudos, a maior parte dos isolados que apresentavam este gene, foram de pacientes que viajaram a Ásia (PEIRANO *et al*, 2011). Diferentemente do *bla<sub>KPC</sub>*, o *bla<sub>NDM</sub>* não é associado de forma precisa a um clone em específico, muito menos a um plasmídeo, tornando sua presença numa linhagem de ampla distribuição importante para estudo (NORDMANN *et al*, 2012).

Assim como os clones que carregam o *bla<sub>KPC</sub>*, os clones com *bla<sub>NDM</sub>* também acumulam de genes de resistência, também sendo considerado multirresistentes, porém, em menor quantidade (WANG *et al*, 2016; NORDMANN *et al*, 2012).

O gene *bla<sub>NDM</sub>*, CCw43 majoritariamente está presente no CCw43, acumulando em menor quantidade outros genes de resistência, sendo que apenas a cepa 9, acumula a carbapenemase *bla<sub>IMP</sub>* e o gene *acc*. As 5 cepas do CCw43 são definidas como filogrupos comensais A e B1, sendo A predominante. Os complexos CCw597 (n=2) e CCw83 (n=2) também carregam o gene *bla<sub>NDM</sub>* exclusivamente, sendo que respectivamente os dois primeiro CCw são definidos como filogrupo D e os dois últimos B1.

**Tabela 13:** Perfil ST, complexo clonal (CC) e gene de resistência associado.

CEPA	GENÓTIPO*	FILOGRUPO	ST p	CCp	CCw	BLAKPC	BLANDM	BLAIMP	BLACTXM-1	BLACTXM-2	BLACTXM-3	BLACTXM-4	BLASHV	BLAACC
17	<i>focA</i>	A	2	CC2	CC43	+								
1		A	833	CC2	CC43	+							+	
2	<i>Yfcv</i> <i>vat</i>	A	837	CC2	CC43		+							
4	<i>vat</i>	B1	2	CC2	CC43		+							
9	<i>vat</i>	A	833	CC2	CC43		+	+						+
30	<i>fyuA</i> <i>chuA</i>	D	3	CC3	CC597		+							
34	<i>chuA</i>	D	3	CC3	CC597		+							
12	<i>focA</i>	D	305	CC305			+	+						
24	<i>fyuA</i> <i>yfcv</i> <i>chuA</i> <i>vat</i> <i>cnf</i> <i>pap</i>	B2	33	CC33	CC127		+							
7	<i>fyuA</i> <i>chuA</i> <i>vat</i> <i>foca</i> <i>cnf</i> <i>pap</i> <i>sfa</i>	B2	36	CC36				+	+					
13	<i>fyuA</i> <i>yfcv</i>	B2	43	CC43	<b>CC131</b>		+		+					
14	<i>fyuA</i> <i>yfcv</i> <i>cnf</i> <i>pap</i>	B2	267	CC43	<b>CC131</b>		+		+	+				+
3	<i>fyuA</i> <i>chuA</i>	B2	9	CC43	<b>CC131</b>		+							
15	<i>fyuA</i> <i>vat</i> <i>focA</i>	B1	58	CC58			+							+
31	<i>fyuA</i>	A	74	CC66					+					
33	<i>focA</i>	B1	83	CC83			+							
35	<i>fyuA</i> <i>focA</i>	B1	83	CC83			+							
10	<i>vat</i>	B1	88	CC88			+	+		+				
19	<i>Vat</i> <i>focA</i>	B1	88	CC88			+	+		+				+
6		D	910	CC910			+							

**Tabela 13:** Perfil ST, complexo clonal (CC) e gene de resistência associado.

Continua

8	<i>yfcv</i> <i>chuA</i> <i>vat</i>	B2	149	Singlet on		+		+	
27	<i>fyuA</i> <i>yfcv</i> <i>focA</i>	B1	341	Singlet on			+		+
5	<i>eae</i>	B1	399	Singlet on			+		+
11		A				+		+	
18	<i>fyuA</i> <i>yfcv</i>	B2				+		+	
16	<i>fyuA</i> <i>yfcv</i>	B2				+		+	+
32	<i>chuA</i> <i>focA</i> <i>cnf</i>	D				+			
36	<i>fyuA</i>	A				+			
21	<i>focA</i>	A				+		+	
25	<i>focA</i>	A				+		+	+
28	<i>fyuA</i> <i>focA</i>	B1					+		
20	<i>focA</i>	A				+		+	+
23	<i>focA</i>	A				+		+	
26	<i>focA</i>	A						+	+
22	<i>fyuA</i> <i>yfcv</i> <i>chuA</i> <i>focA</i>	D							
29	<i>fyuA</i> <i>yfcv</i> <i>chuA</i> <i>vat</i>	B2							

\*Genótipo uropatogênico com base em Spurbeck, 2012.

\*STp – ST pasteur

\*CCp – Complexo clonal Pasteur

\*CCw – Complexo clonal Warwick

## 6.CONCLUSÃO

Desde 2010, quando os primeiros isolados foram enviados ao LACEN, o número de isolados de *E. coli* carba-R vêm aumentando consideravelmente. Sua presença em swab retal, é indicio de que o trato intestinal atua como reservatório de cepas portando genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>*. O fato de encontramos cepas comensais em amostras de infecções no trato urinário e sangue, demonstra o potencial de isolados de *E. coli* como patógeno oportunista. A presença maciça de fatores de virulência

ExPEC nas cepas carba-R de *E. coli* isoladas dos hospitais do Distrito Federal, indica o potencial destas cepas em causar infecções em sítios anatômicos extraintestinais. Dentre as 36 cepas estudadas, 16 cumprem os requisitos de Spurbeck e colaboradores como alto potencial uropatogênicos, destas, 8 foram definidas como patogênicas e albergam mais de um gene de resistência a antimicrobiano.

Das cepas avaliadas neste estudo, apenas 2 não albergam genes de resistência, as outras não apenas carregam, como acumulam genes de carbapenemase, algumas ESBL e resistência a aminoglicosídeo. Esta situação é preocupante, levando-se em conta que a classe de antibióticos carbapenem é utilizada como última escolha em casos de infecção por bactérias com resistência a antimicrobianos. Nestes casos, o aminoglicosídeo é associado a polimixina no propósito de se combater enterobactérias que estejam com KPC/NDM, porém, 7 cepas também albergam o gene de resistência a este antibiótico, diminuindo então os recursos terapêuticos possíveis para o tratamento do paciente. Percebe-se destas cepas um certo padrão, o qual o gene *bla<sub>NDM</sub>* é albergado majoritariamente por cepas comensais, enquanto cepas *bla<sub>KPC</sub>*-positivas foram mais detectadas em filogrupo B2.

Dos isolados, 3 das 36 cepas de *E. coli* foram identificadas como do complexo clonal 131, filogrupo B2, albergando *bla<sub>KPC</sub>*. Indicando que há a presença desta linhagem de disseminação mundial no Distrito Federal, entretanto, ainda em menor número.

Dentre as linhagens detectadas, notou-se grande diversidade, as quais ainda possuem poucos relatos na literatura, todavia, a partir destes dados temos a previsibilidade de que poucos são os quadros clínicos gerados pelo CCw131 (CCp43), porém, outras linhagens como CCw43 predominam entre isolados de *E. coli* carba-R recuperados no DF.

Com base neste trabalho, profissionais da saúde poderão de antemão saber que as cepas de *E. coli* carba-R circulando no DF são em sua maioria definidos como exPEC, além de albergarem mais de um gene de resistência. Neste sentido, pode-se lançar mão de protocolos para terapia e para evitar a disseminação.

## **7.PERSPECTIVAS**

- Realizar estudo genotípico e filogenético comparando isolados de *E. coli* susceptíveis e resistentes a carbapenem.
- Produzir dendrograma que defina o posicionamento filogenético assumido por cepas de *E. coli* carba-R.



## 8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alam, M. F.; Cohen, D.; Butler, C.; Dunstan, F.; Roberts, Z.; Hillier, S.; Palmer, S. The additional costs of antibiotics and re-consultations for antibiotic-resistant *Escherichia coli* urinary tract infections managed in general practice. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Reino Unido. v.33 n.3 p. 255 – 257, 2009.
2. Alves, H. C.; Cruz, F. P.N.; Assis, P. C. P.; Pessoa, J. D. C.; Trevelin, L. C.; Leal, A. M. O.; Sousa, C. P. Antibiotic Resistance among *Escherichia coli*: Isolates and Novel Approaches to the Control of *E. coli* Infections. SAMIE, A. (Org.). **Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications**. IntechOpen, 2017. p.99 – 122.
3. Andriole, V. T. The quinolones: past, present and future. **Clinical Infectious Diseases**. Estados Unidos. v. 41, p. s113- 119, 2005.
4. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos: base teórica e uso clínico**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/carbapenens.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/carbapenens.htm) Acesso em: 20 de mar. de 2018a.
5. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos - principais grupos disponíveis para uso clínico**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/aminoglicosideos3.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/aminoglicosideos3.htm). Acesso em: 17 de jan. de 2019.
6. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resistência antimicrobiana: mecanismos e impacto clínico**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo3/mecanismos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm) Acesso em: 20 de nov. de 2018b.
7. Badger, J. L.; Wass, C. A.; Weissman, S. J.; Kim, K. S. Application of signature-tagged mutagenesis for identification of *Escherichia coli* K1 genes that contribute to invasion of human brain microvascular endothelial cells. **Infection and Immunity**. v.68, n.9, p.5056-5061, 2000.
8. Bajaj, P.; Singh, N. S.; Viridi, J. S. *Escherichia coli*  $\beta$ -Lactamases: What Really Matters. **Frontiers in Microbiology**. v.7, n.417, 2016.
9. Ben tanfous, F.; Alonso, C. A.; Achour, W.; Ruiz-ripa, L.; Torres, C.; Ben hassen, A. First Description of KPC-2-Producing *Escherichia coli* and ST15 OXA-48-Positive *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia. **Microbial Drug Resistance**. v.23, n.3, p.365-375, 2017.
10. Benson, A. S. The Bacterial Outer Membrane and Surface Permeability. In: Bittar, E.; Bittar, N. (Org.). **Principles of Medical Biology**. 1997. p.15-22.
11. Benson, A. S. Ultrastructure of Bacteria. In: BITTAR, E.; BITTAR, N. (Org.). **Principles of Medical Biology**. 1997. p.1-14.
12. BioCyc Database Collection. Disponível em: **ECOCYC** <https://biocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=EG11206>. Acesso em: 29 de dez. 2017.
13. Blanco, J.; Mora, A.; Mamani, R.; López, C.; Blanco, M.; Dahbi, G.; Herrera, A.; Blanco, J. E.; ALONSO, M. P.; García-garrote, F.; Chaves, F.; Orellana, M. Á.; Martínez-martínez, L.; Calvo, J.; Prats, G.; Larrosa, M. N.; González-lópez, J. J.; López-cerero, L.; Rodríguez-baño, J.; Pascual, A. National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.66, n.9, p.2011–2021, 2011.

14. Bollela, V. **Aminoglicosídeos**. Curso básico de antimicrobianos. Divisão de MI - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, 2018. Acesso em: 17 de jan. de 2019.
15. Bonnet, R. Growing Group of Extended-Spectrum Beta-Lactamases: the CTX-M Enzymes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 48, n. 1., p. 1- 14, 2004.
16. Bradford, P. A. Extended-Spectrum Beta-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. **Clinical microbiology reviews**. v. 14, n. 4, p. 933 – 951, 2001.
17. Browne, H. P., Neville, A.; Forster, S. C.; Lawley, T. D. Transmission of the gut microbiota: spreading of health. **Nature Reviews Microbiology**, v.15, p.531-543, 2017.
18. Cai, J. C.; Zhang, R.; Hu, Y. Y.; Zhou, H. W.; Chen, G. X. Emergence of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates producing KPC-2 carbapenemase in China. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.58, n.2, p.1146 – 1152, 2014.
19. Calhau, V.; Ribeiro, G.; Mendonça, N. Jorge da Silva, G. Prevalent combination of virulence and plasmidic-encoded resistance in ST 131 *Escherichia coli* strains. **Virulence**. V.4, n. 8, p. 726-729, 2013.
20. Centers For Disease Control and Prevention. **Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to I.M. Healthy Brand SoyNut Butter** (Final Update). <https://www.cdc.gov/ecoli/2017/o157h7-0317/index.html> Acesso em: 27 de jan. 2018.
21. Centers For Disease Control and Prevention. **Reports of selected *E. coli* outbreak investigations**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>. Acesso em: 27 de jan. de 2018.
22. Clermont, O.; Bonacorsi, S.; Bingen, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and environmental microbiology**. Paris, v. 66, n. 10, p. 4555 – 4558, out. 2000.
23. Clermont, O.; Gordon, D.; Denamur, E. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. **Microbiology**. v.161, p.980 – 988, 2015.
24. Cooke, N. M.; Smith, S. G.; Kelleher, M.; Rogers, T. R. Major differences exist in frequencies of virulence factors and multidrug resistance between community and nosocomial *Escherichia coli* bloodstream isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v.48, n.4, p.1099–104, 2010.
25. Coppo, E.; Del Bono, V.; Ventura, F.; Camera, M.; Orengo, G.; Viscoli, C.; Marchese, A. Identification of a New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-4 (NDM-4)-producing *Escherichia coli* in Italy. **BMC microbiology**. v.14, n.148, 2014.
26. Croxen, M. A.; Finlay, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews of Microbiology**. v.8, n.1, p.26 - 38, 2010.
27. Cuzon, G.; Bonnin, R. A.; Nordmann, P. First identification of novel NDM carbapenemase, NDM-7, in *Escherichia coli* in France. **Plos One**. v.8, n.4, 2013.
28. De Kraker, M. E. A.; Stewardson, A. J.; Harbarth, S. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? **PLoS Medicine**. v.13, n.11, 2016.
29. Delmas, J; Dalmasso, G.; Bonnet, R. *Escherichia coli*: The good, the bad and the ugly. **Clinical microbiology**. França, v. 4, n. 2, p.195, abr. 2015. R4
30. Duin, D. V.; Doi, Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Virulence**, v.8, n.4, p. 460-469, 2017.
31. EBC - Empresa Brasil de Comunicação. **OMS estima 2 milhões de mortes por comida e água contaminadas**. <http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2015->

04/omsestima-2-milhoes-de-mortes-por-comida-e-agua-contaminadas-todos-os-anos. Acesso em: 27 de jan. 2018.

32. Emna Nasri, E.; Subirats, J.; Sanchez-Melsió, A.; Ben Mansour, H.; Borrego, C. B.; Balcazar, J. L. Abundance of carbapenemase genes (*blaKPC*, *blaNDM* and *blaOXA-48*) in wastewater effluents from Tunisian hospitals). **Environmental Pollution**. v. 229, p. 371 -374, 2017

33. Evans, D. G. & Evans Jr, D. J. Capítulo 25 - *Escherichia Coli* in Diarrheal Disease. In: Samuel Baron. **Medical Microbiology**. 4ª edição. Estados Unidos: University of Texas Medical Branch, 1996.

34. Faria junior, C. **Caracterização de cepas de Enterobacteriaceae resistentes a carbapenems isoladas no Distrito Federal**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, 2014.

35. Frömmel, U.; Lehmann, W.; Rödiger, S.; Böhm, A.; Nitschke, J.; Weinreich, J.; Groß, J.; Roggenbuck, D.; Zinke, O.; Ansorge, H.; Vogel, S.; Klemm, P.; Wex, T.; Schröder, C.; Wieler, L. H.; Schierack, P. Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origins. **Applied and Environmental Microbiology**. v.79, n.19, p. 5814-5829, 2013.

36. Fu, L.; Wang, S.; Zhang, Z.; Yan, X.; Yang, X.; Zhang, L.; LI, Y.; Wang, G.; Zhao, K.; Zhou, Y. Co-carrying of KPC-2, NDM-5, CTX-M-3 and CTX-M-65 in three plasmids with serotype O89: H10 *Escherichia coli* strain belonging to the ST2 clone in China. **Microbial pathogenesis**. v.128, p.1-6, 2019.

37. Gibreel, T. M.; Dodgson, A. R.; Cheesbrough, J.; Fox, A. J.; Bolton, F. J.; Upton, M. Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.67, p.346–356, 2012.

38. Giufrè, M.; Errico, G.; Accogli, M.; Monaco, M.; Villa, L.; Distasi, M. A.; Del Gaudio, T.; Pantosti, A.; Carattoli, A.; Cerquetti, M. Emergence of NDM-5-producing *Escherichia coli* sequence type 167 clone in Italy. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.52, n.1, p.76-81, 2018.

39. Golan, D. R.; Tashjian, A. H; Armstrong, E. J.; Armstrong, A. W. **Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy**. 3ª ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2014.

40. Gomes, G. C.; Lopes, C. C.; Marona, H. R. N. Quinolonas: aplicações clínicas. **Revista Brasileira de Medicina**. p.57-64, 2003.

41. Gordon, M. D. The ecology of *Escherichia coli*. In: DONNENBERG, M. (Org.). **Escherichia coli Pathotypes and Principles of Pathogenesis**. 2ª edição. Elsevier, 2013.

42. Grundmann, H.; Glasner, C.; Albiger, B.; Aanensen, D. M.; Tomlinson, C. T.; Andrasević, A. T.; Cantón, R.; Carmeli, Y.; Friedrich, A. W.; Giske, C. G.; Glupczynski, Y.; Gniadkowski, M.; Livermore, D. M.; Nordmann, P.; Poirel, L.; Rossolini, G. M.; Seifert, H.; Vatopoulos, A.; Walsh, T.; Woodford, N.; Monnet, D. L. European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) Working Group. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. **Lancet Infectious Diseases**. v.17, n.2. p.153-163, 2017.

43. Guentzel, M. N. Capítulo 26 - *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter*, and *Proteus*. In: Samuel Baron. **Medical Microbiology**. 4ª edição. Estados Unidos: University of Texas Medical Branch, 1996.
44. Guyer, D. M.; Radulovic, S.; Jones, F. E.; Mobley, H. L. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. **Infection and Immunity**. v.70, n.8, p.4539-4546, 2002.
45. Habibi, M.; Asadi Karam, M. R.; Bouzari, S. Evaluation of prevalence, Immunogenicity and efficacy of FyuA iron receptor in uropathogenic *Escherichia coli* isolates as a vaccine target against urinary tract infection. **Microbial Pathogenesis**. v.110, p.477-483, 2017.
46. Hancock, V.; Ferrières, L.; Klemm, P. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. **Microbiology**. v.154, parte 1, p.167-175, 2008.
47. Hancock, V.; Nielsen, E. M.; Krag, L.; Engberg, J.; Klemm, P. Comparative analysis of antibiotic resistance and phylogenetic group patterns in human and porcine urinary tract infectious *Escherichia coli*. **APMIS**. v.117, n.11. p.786-790, 2009.
48. Hardman, J. G.; Limbird, L. E. Tradução: Carla de Mello Vorsatz *et al.* **Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica**. 10ª edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.
49. Hazen, T. H.; Mettus, R.; McElheny, C. L.; Bowler, S. L.; Nagaraj, S.; Doi, Y.; Rasko, D. A. Diversity among bla<sub>KPC</sub>-containing plasmids in *Escherichia coli* and other bacterial species isolated from the same patients. **Scientific Reports**. v.8, n.1, p.10291, 2018.
50. Hilas, O.; Ezzo, D. C.; Jodlowski, T. Z. Doripenem (Doribax), a new carbapenem antibacterial agent. **Pharmacy and therapeutics**. v. 33, n. 3, p. 134-136, 2008.
51. Hofman, P.; Le Negrate, G.; Mograbi, B.; Hofman, V.; Brest, P.; Alliana-Schmid, A.; Flatau, G.; Boquet, P.; Rossi, B. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1) increases the adherence to epithelia and the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes but decreases bacteria phagocytosis. **Journal of Leukocyte Biology**. v.68, n.4, p.522-528, 2000.
52. Hospital das Clínicas, USP. **Guia de utilização de anti-infecciosos e recomendações para a prevenção de infecções hospitalares**. Disponível em: [http://www.sbp.com.br/fileadmin/user\\_upload/pdfs/Anti-infecciosos\\_Infec\\_Hospitalar.pdf](http://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/pdfs/Anti-infecciosos_Infec_Hospitalar.pdf). Acesso em: 17 de jan. de 2019.
53. Iacovelli, V.; Gaziev, G.; Topazio, L.; Bove, P.; Vespasiani, G.; Finazzi agrò, E. Nosocomial urinary tract infections: A review. **Urologia**. v.81, n.4, p.222-227, 2014.
54. Information centre. **Cauda UTI**. World Health Organization. Disponível em: [https://www.who.int/gpsc/information\\_centre/cauda-uti\\_eccmid.pdf](https://www.who.int/gpsc/information_centre/cauda-uti_eccmid.pdf). Acesso em: 2 de dez. 2018.
55. Jacobi, C. A.; Gregor, S.; Rakin, A.; Heesemann, J. Expression analysis of the yersiniabactin receptor gene *fyuA* and the heme receptor *hemR* of *Yersinia enterocolitica* in vitro and in vivo using the reporter genes for green fluorescent protein and luciferase. **Infection and Immunity**. v.69, n.12, p.7772-7782, 2001.
56. Jeon, J. H.; Lee, J. H.; Lee, J. J.; Park, K. S.; Karim, A. M.; Lee, C. R.; Jeong, B. C.; Lee, S. H. Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. **International Journal of Molecular Sciences**. v.16, p.9654-9692, 2015.

57. Johnson, J. R.; Menard, M. E.; Lauderdale, T-L.; Kosmidis, C.; David Gordon, D.; Collignon, P.; Maslow, J. N.; Andrašević, A. T.; Kuskowski, M.A.; The Trans-Global Initiative For Antimicrobial Resistance Analysis Investigators. Global Distribution and Epidemiologic Associations of *ESCHERICHIA COLI* Clonal Group A, 1998–2007. **Emerging Infectious Diseases**. v.17, n.11, p.2001-2009.
58. Johnson, J. R.; Murray, A. C.; Gajewski, A. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.47, p. 2161–2168, 2003.
59. Johnson, J. R.; Johnston, B.; Clabots, C.; Kuskowski, M. A.; Castanheira, M. *Escherichia coli* Sequence Type ST131 as the Major Cause of Serious Multidrug-Resistant *E. coli*. Infections in the United States, **Clinical Infectious Diseases**. v. 51, n. 3, p. 286–294, 2010.
60. Johnson, J. R.; Menard, M.; Johnston, B.; Kuskowski, M. A.; Nichol, K.; Zhanel, G. G. Epidemic Clonal Groups of *Escherichia coli* as a Cause of Antimicrobial-Resistant Urinary Tract Infections in Canada, 2002 to 2004. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.53, n.7, p.2733-2739, 2009.
61. Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. Baltimore, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004.
62. Karami, N.; Wold, A. E.; Adlerberth, I. Antibiotic resistance is linked to carriage of papC and iutA virulence genes and phylogenetic group D background in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* from infants and young children. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v.36, p.721-729, 2017.
63. Katzung, B. G.; Trevor, A. J. Tradução: Ademar Valadares Fonseca *et al.* **Farmacologia básica e clínica**. 13<sup>a</sup> ed. Porto Alegre, AMGH, 2017.
64. Keller, R.; Ordoñez, J. G.; De Oliveira, R. R.; Trabulsi, L. R.; Baldwin, T. J.; Knutton, S. Afa, a diffuse adherence fibrillar adhesin associated with enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**. v.70, n.5, p.2681-2689, 2002.
65. Kim, Y. A.; Qureshi, Z. A.; Adams-haduch, J. M.; Park, Y. S.; Shutt, K. A.; Doi, Y. Features of infections due to *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Escherichia coli*: emergence of sequence type 131. **Clinical Infectious Disease**. v.55, n.2, p. 224 – 231, 2012.
66. Korea, C. G.; Badouraly, R.; Prevost, M. C.; Ghigo, J. M.; Beloin, C. *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. **Environmental Microbiology**. v.12, n.7, p. 1957-1977, 2010.
67. Kumar, N.; Nahid, F.; Zahra, R. Association of virulence factors, phylogenetic groups and antimicrobial resistance markers in *Escherichia coli* from Badin city, Pakistan. **Journal of Chemotherapy**. v.29, n.1, p.8-13, 2017.
68. Lara, F. B. M.; Nery, D. R.; De Oliveira, P. M.; Araujo, M. L.; Carvalho, F. R. Q.; Messias-Silva, L. C. F.; Ferreira, L. B.; Faria-Junior, C. & Pereira, A. L. Virulence Markers and Phylogenetic Analysis of *Escherichia coli* Strains with Hybrid EAEC/UPEC Genotypes Recovered from Sporadic Cases of Extraintestinal Infections. **Frontiers in Microbiology**. v.8, n.146, 2017.
69. Lau, S. H.; Reddy, S.; Cheesbrough, J.; Bolton, F. J.; Willshaw, G.; Cheasty, T.; Fox, A. J.; Upton, M. Major uropathogenic *Escherichia coli* strain isolated in the northwest of England identified by multilocus sequence typing. **Journal of Clinical Microbiology**. v.46, p.1076–1080, 2008.

70. Lee, J.; Hiibel, S. R.; Reardon, K. F. & Wood, T. K. Identification of stress-related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. **Journal of Applied Microbiology**. v.108, p.2088 – 2102, 2009.
71. Lovering, A. M.; White, L. O.; Reeves, D. S. AAC(1): a new aminoglycoside-acetylating enzyme modifying the C1 aminogroup of apramycin. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v.20, n.6, p.803-813, 1987.
72. Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Bender, K. S.; Buckley, D. H.; Stahl, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2016.
73. Manges, A. R.; Tabor, H.; Tellis, P.; Vincent, C.; Tellier, P. P. Endemic and epidemic lineages of *Escherichia coli* that cause urinary tract infections. **Emerging Infectious Diseases**. v.14 p.1575–1583, 2008.
74. Mathers, A. J.; Peirano, G.; Pitout, J. D. *Escherichia coli* ST131: The quintessential example of an international multiresistant high-risk clone. **Advances in Applied Microbiology**. v.90, p.109-154, 2015.
75. Microbe Canvas. **Microbiology on the go**. Disponível em: <http://microbe-canvas.com/>. Acesso em: 11 de dez. 2018.
76. Milani, C.; Duranti, S.; Bottacini, F.; Casey, E.; Turrone, F.; Mahony, J. Belzer, C.; Delgado, S.; Arbolea, S. M.; Mancabelli, L.; Lugli, G. A.; Rodriguez, J. M.; Bode, L.; De Vos, W.; Gueimonde, M.; Margolles, A.; Van Sinderen, D.; Ventura, M. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.81, n.4, 2017.
77. Miranda-Estrada, L. I.; ruíz-Rosas, M.; Molina-López, J.; Parra-Rojas, I.; González-Villalobos, E.; Castro-Alarcón, N. Relationship between virulence factors, resistance to antibiotics and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* in two locations in Mexico. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. V.35, v.7, p.426-433, 2017.
78. Mokady, D.; Gophna, U.; Ron, E. Z. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. **International Journal of Medical Microbiology**. v.295, n. (6-7), p.455-462, 2005.
79. Mostafavi, S. K. S.; Najar- Peerayeh, S.; Mobarez, A. M.; Parizi, M. K. Detection of virulence factors, phylogroups, serogroups and biofilm formation among CTX-M-1 positive *Escherichia coli* isolated from patients with pyelonephritis. **Biomedical Research**. v.29, n.8, p.1543-1549, 2018.
80. Munkhdelger, Y.; Gunregjav, N.; Dorjpurev, A.; Juniichiro, N.; Sarantuya, J. Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. **Journal of Infection in developing countries**. v.11, n.1, p.51-57, 2017.
81. Mushtaq, S.; Irfan, S.; Sarma, J. B.; Doumith, M.; Pike, R.; Pitout, J.; Livermore, D. M.; Woodford, N. Phylogenetic diversity of *Escherichia coli* strains producing NDM-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.66, n.9, p.2002-2005, 2011.
82. Nataro, J. P.; Kaper, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. Baltimore. v.11, n.1, p. 142-201, n.1, jan. 1998.
83. Nègre, V. L.; Bonacorsi, S.; Schubert, S.; Bidet, P.; Nassif, X.; Bingen, E. The siderophore receptor IroN, but not the high-pathogenicity island or the hemin receptor ChuA, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis. **Infection and Immunity**. v.72, n.2, p.1216-1220, 2004.
84. Nicolas-chanoine, M. H.; Bertrand, X.; Madec, J. Y. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. **Clinical Microbiology Review**. v.27, n.3, p.543-574, 2014.

85. Nordmann, P.; Cuzon, G.; Naas, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Infection**, v.9, p.228 – 236, 2009.
86. Nordmann, P.; Naas, T.; Poirel, L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791 – 1798, 2011.
87. Nowrouzian, F. L.; Adlerberth, I.; Wold, A. E. Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. **Microbes and Infection**. v.8, n.3, p.834-840, 2006.
88. Organização Pan Americana da Saúde (OPAS). **OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente**. Brasília, 2017. Disponível em: [http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5357:om\\_s-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticosurgente&Itemid=812](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:om_s-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticosurgente&Itemid=812). Acesso em: 5 de set. 2017.
89. Oslugui, L. **Pesquisa e caracterização de amostras de ExPEC, isoladas de infecções do trato urinário de cães e gatos**. 2008, 77 p. Dissertação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2008.
90. Papp-Wallace, K. M.; Endimiani, A.; Taracila, M. A.; Bonomo, R. A. Carbapenems: Past, present and future. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. V. 55, n.11, p. 4943 – 4960, 2011.
91. Paterson, D. L.; Bonomo, R. A. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. **Clinical microbiology reviews**. v. 18, n. 4, p. 657 – 686, 2005.
92. Peirano, G.; Schreckenberger, P. C.; Pitout, J. D. Characteristics of NDM-1-Producing *Escherichia coli* Isolates That Belong to the Successful and Virulent Clone ST131. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.55, n.6, p.2986-2988, 2011.
93. Penido, C. **Antibióticos carbapenêmicos**. Curso básico de antimicrobianos. Divisão de MI - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, 2018.
94. Poole, F. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. **Cellular Molecular Life Science**. v.61, p. 2200-2223, 2004.
95. Porres-Osante, N.; Azcona-Gutiérrez, J. M.; Rojo-Bezares, B.; Undabeitia, E.; Torres, C.; Sáenz, Y. Emergence of a multiresistant KPC-3 and VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* strain in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.69, n.7, p.1792-1795, 2014.
96. Queenan, A. M.; Bush, K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. **Clinical microbiology reviews**. v. 20, n. 3, p.440 – 458, 2007.
97. Rahdar, M.; Rashki, A.; Miri, H. R.; Rashki Ghalehnoo, M. Detection of pap, sfa, afa, foc, and fim Adhesin-Encoding Operons in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates Collected From Patients With Urinary Tract Infection. **Jundishapur Journal of Microbiology**. v.8, n.8, 2015.
98. Raheison, S.; Jove, T.; Gaschet, M.; Pinault, E.; Tabesse, A.; Torres, C.; Ploy, M. C. Expression of the *aac(6')-Ib-cr* Gene in Class 1 Integrons. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.61, n.5, 2017.
99. Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. **Farmacologia**. 5ª edição. Elsevier, 2004.
100. Review on antimicrobial resistance – **Tackling drug-resistant infections globally**. Disponível em: <https://amr-review.org/home.html>. Acesso em: 11 de dez. 2018

101. Reygaert, W. C. Antimicrobial Mechanisms of *Escherichia coli*. In: SAMIE, A. (Org.) **Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications**. Intech Open, 2017. p.81 -97.
102. Ribeiro, A. M. F. **Farmacologia dos Antibióticos Aminoglicosídeos**. 2017. 72 p. Dissertação do Programa de Ciências Farmacêuticas da Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2017.
103. Robins-Browne, R. M.; Holt, K. E; Ingle, D. J; Hocking, D. M; Yang, J; Traditional Enteropathogenic *Escherichia coli* of Infantile Diarrhea. **Reviews of Infectious Disease**, v.9, n.1, p. 28 - 53, 1987.
104. Roos, V.; Schembri, M. A.; Ulett, G. C.; Klemm, P. Asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 carries mutations in the foc locus and is unable to express F1C fimbriae. **Microbiology**. v.152, part. 6, p. 1799-1806, 2006.
105. Russo, T. A.; Johnson, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal of Infectious Diseases**. v.181, n.5, p.1753-1754, 2000.
106. Santana, R. C. **Antibióticos beta lactâmicos**. Curso básico de antimicrobianos. Divisão de MI - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, 2018.
107. Servin, A. L. Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges. **Clinical Microbiology Reviews**. v.27, n.4, p.823-869, 2014.
108. Sheutz, F.; Strockbine, N. A. **Escherichia**. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust, 2015.
109. Silveira, L. Marques, A.; Machado, J. Boletim Epidemiológico. Patotipos de *Escherichia coli* associados a infecções entéricas entre 2002 e 2012. **Instituto Nacional de Saúde**. n.8, p. 20 – 22, 2013.
110. Skjøt-rasmussen, L.; Olsen, S. S.; Jakobsen, L., Ejrnæs, K., Scheutz, F., Lundgren, B.; Frimodt-møller, N.; Hammerum, A. M. *Escherichia coli* clonal group A causing bacteraemia of urinary tract origin. **Clinical Microbiology and Infection**, v.19, n.7, p. 656–661, 2013.
111. Spurbeck, R. R.; Dinh, P. C.; JR Walk, S. T.; Stapleton, A. E.; Hooton, T. M.; Nolan, L. K.; Kim, K. S.; Johnson, J. R.; Mobley, H. L. *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. **Infection and Immunity**. v.80, n.12, p.4115-4122, 2012.
112. Stamm, F. A. M. N. & Coutinho, M.S.S. Infecção do trato urinário relacionada ao cateter vesical de demora: incidência e fatores de risco. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.45, n.1, p.27-33, 1999.
113. Szemiako, K.; Krawczyk, B.; Samet, A.; Śledzińska, A.; Nowicki, B.; Nowicki, S.; Kur, J. A subset of two adherence systems, acute pro-inflammatory pap genes and invasion coding *dra*, *fim*, or *sfa*, increases the risk of *Escherichia coli* translocation to the bloodstream. **European Journal of Microbiology and Infectious Diseases**. v.32, n.12, p.1579-1582, 2013.
114. Tauschek, M. Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of WholeGenome Sequencing? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 6, n.141, nov. 2016.
115. Tavares, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.
116. The World Bank. **New country classifications by income level: 2017- 2018**.



117. Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. Tradução: Danielle Soares de Oliveira Daian, Luis Fernando Marques Dorvillé. **Microbiologia**. 12<sup>a</sup> edição. Porto Alegre: Artmed, 2017.
118. UN News Centre. **UN health agency finds high levels of antibiotic resistance to world's most common infections**. <http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=58499#.WnKDFqinHIU>. Acesso em: 30 de jan. de 2018.
119. Van de sande-bruinsma, N.; Grundmann, H.; Verloo, D.; Tiemersma, E.; Monen, J.; Goossens, H. *et al.* Antimicrobial drug use and resistance in Europe. **Emerging Infectious Diseases**. 2008. Disponível em: <http://www.cdc.gov/EID/content/14/11/1722.htm>. Acesso em: 11 de dez. 2018.
120. Vidal, M.; Kruger, E.; Durán, C.; Lagos, R.; Levine, M.; P, V.; Toro, C.; Vidal, R. Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. **Journal of Clinical Microbiology** Estados Unidos, v. 43, p.5362–5365, 2005.
121. Wang, L. H.; Liu, P. P.; Wei, D. D.; Liu, Y.; Wan, L. G.; Xiang, T. X.; Zhang, Y. J. Clinical isolates of uropathogenic *Escherichia coli* ST131 producing NDM-7 metallo- $\beta$ -lactamase in China. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.48, n.1, p.41-45, 2016.
122. Wang, L.; Curd, H.; Qu, W.; Reeves, P. R. Sequencing of *Escherichia coli* O111 O Antigen Gene Cluster and Identification of O111-Specific Genes. **Journal of Clinical Microbiology**. Australia. v. 36, n. 11, p. 3182 – 3187, 1998.
123. World Health Organization (WHO). **Antimicrobial resistance**. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Acesso em: 27 de jan. de 2018. World Health Organization (WHO). **The top 10 causes of death**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html>. Acesso em: 5 de set. 2017.
124. Wullt, B.; Bergsten, G.; Connell, H.; Röllano, P.; Gebratsedik, N.; Hang, I.; C. P-fimbriae trigger mucosal responses to *Escherichia coli* in the human urinary tract. **Cellular microbiology**. v.3, n.4, p.255-264, 2001.
125. YANG, Z. K.; LUO, H.; ZHANG, Y.; WANG, B.; GAO, F. Pan-genomic analysis provides novel insights into the association of *E. coli* with human host and its minimal genome. **Bioinformatics**. 2018.