



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE E
BIOLOGICAS**

ALEXSANDRO ARAÚJO OLIVEIRA

**FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA EM ISOLADOS
MULTIRESISTENTES DE *Escherichia coli* ORIUNDOS DO HU-
UNIVASF**

**PETROLINA-PE
2022**

ALEXSANDRO ARAUJO OLIVEIRA

**FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA EM ISOLADOS
MULTIRESISTENTES DE *Escherichia coli* ORIUNDOS DO HU-
UNIVASF**

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, campus sede, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Adriana Gradela
Co Orientador Interno: Prof. Dr. Daniel Tenório
Co Orientador Externo: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

**PETROLINA-PE
2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE E BIOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alexsandro Araujo Oliveira

CARACTERIZAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS
MULTIRESISTENTES DE *Escherichia coli* ORIUNDOS DO HU-
UNIVASF

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências com ênfase na linha de pesquisa: Saúde, Sociedade e Ambiente, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: 15 de março de 2022

Banca Examinadora

Adriana Gradela, Doutora
Universidade Federal do Vale do São Francisco – Univasf

Maria da Conceição Aquino de Sá, Doutora
Faculdade Estácio – ESTÁCIO

Rodrigo Feliciano do Carmo, Doutor
Universidade Federal do Vale do São Francisco – Univasf

S729c Oliveira, Alexsandro Araújo
FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA EM ISOLADOS
MULTIRESISTENTES DE *Escherichia coli* ORIUNDOS DO HU-
UNIVASF/ Alexsandro Araújo Oliveira. – Petrolina - PE, 2022.

xv, 61 f. : il. ; 29 cm.

Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas e da Saúde) Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina-PE, 2022.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Gradela.

Inclui referências.

1. Resistência. 2. E.coli. 3. Patogênica. I. Título. II. Gradela, Adriana. III. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

370.15

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca SIBI/UNIVASF
Bibliotecário: Nome e CRB.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os que me ajudaram ao longo desta caminhada;

Aos meus pais, Socorro Magali Araujo Oliveira; Antoni Carlos de Andrade Oliveira, sem a dedicação de vocês nem haveria jornada;

A aqueles que não se encontram mais presentes, mas que tenho certeza que assistem essa conquista de onde quer que estejam;

Aos meus avós, Antônia Alves de Araújo, Lindaura Flora de Oliveira, Pascoal Vieira Alves de Araújo e Miguel Andrade de Oliveira;

Aos meus amigos, especialmente Akira O. Takeda, seu apoio foi de vital importância para conclusão dessa jornada;

Aos Meus Orientadores, Adriana Gradela, Mateus Matiuzzi da Costa e Daniel Tenório;

Ao Excelentíssimo Presidente Luiz Inácio Lula da Silva, por escancarar as portas das Universidades Públicas Brasileiras;

Aos meus Orixás;

A Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos aqueles que participaram dessa “peleja” chamada Mestrado, tanto de forma direta quanto indiretamente...

A CAPES, A UNIVASF por prover infraestrutura adequada e ao PPGCSB pelo excelente curso.

RESUMO

As Infecções Relacionadas a Saúde Pública (IRAS) são um problema mundial, com cerca de 1,4 milhões de pessoas são infectadas a cada hora. Entre os patógenos envolvidos está a *E. coli*, um bacilo gram-negativo pertencente a microbiota intestinal da maioria dos organismos de sangue quente, cujos elementos genéticos moveis podem transformá-la em cepa patogênica e resistente a antimicrobianos para muitas espécies de animais e para humanos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar e caracterizar 44 isolados multirresistentes de *E. coli* originários do HU-UNIVASF quanto a seu perfil de virulência (gelatinase e hemólise); resistência a antibióticos (bomba de efluxo e formação de biofilme) e índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA). A resistência aos antibióticos foi determinada através da técnica de disco aproximação e caracterização da resistência de acordo com valores estabelecidos pelo CLSI 2019. Quanto a virulência, foi determinada através da cultura em meio contendo gelatina (gelatinase); estiramento em placas contendo ágar 5% sangue de ovelha (hemólise); Formação de biofilme em ágar vermelho congo. A determinação dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Bomba de efluxo) foi feita através da cultura em meio contendo EtBr (Brometo de etídio) e a produção de Betalactamases foi determinada através da análise da interseção dos alos e formação de “zona fantasma”. Os isolados apresentaram alto índice de resistência a antimicrobianos das classes das penicilinas (ampicilina= 86,4%); quinolonas (ciprofloxacino= 49%); cefalosporinas (cefepima 47,7%); Sulfonamidas (Trimetropim+ Sulfametoxazol- 47,7%) e Fluroquinolonas de 3ª geração (Levofloxacina- 34,1% e Ofloxacina 42%) e baixo índice de resistência aos da classe dos nitrofuranos (nitrofurantoina= 95%). Quanto ao perfil de virulência, 18% (8/44) exibiram padrão de hemólise parcial e 0% (0/44) capacidade de hidrólise da gelatina. Quanto ao perfil de resistência a antibióticos, 86% (38/44) foram positivos para a presença de bombas de efluxo e 46% (20/44) para formação de biofilme. IRMA >0,2 foi observado em 66% (29/44) dos isolados, sendo 46% (20/44) resistentes a 2~6 antibióticos; 18% (8/44) a 7~9 antibióticos e 25% (11/44) a 10~14 antibióticos. Além destes 7% (3/44) foram resistentes a nenhum dos antibióticos e 4% (2/44) a apenas um antibiótico. Conclui-se que isolados de *E. coli* são multirresistentes a antimicrobianos das classes das penicilinas, quinolonas, cefalosporinas, sulfonamidas e fluroquinolonas, formam biofilme e apresentam bomba de efluxo. Estes achados contribuem para escolhas mais eficientes para o tratamento de infecções resistentes ocasionadas por este patógeno.

Palavras-chave: Resistencia; Cepa; Bactéria; Patogenicidade; Gene.

ABSTRACT

Public Health Related Infections (HAI) are a worldwide problem, with around 1.4 million people being infected every hour. Among the pathogens involved, a pathogen is a gram-negative bacillus, an intestinal microbiota belonging to most blood organisms, certain genetic elements can transform into many and resistant genetic elements in animal species and for humans. The present study aimed to evaluate and characterize 44 multidrug-resistant *E. coli* isolates from the HU-UNIVASF regarding their virulence profile (gelatinase and hemolysis); antibiotic resistance (efflux pump and biofilm formation) and multiple antimicrobial resistance index (IRMA). Antibiotic resistance was determined using the technique according to the values of approximation and characterization of resistance established by CLSI 2. As for virulence, it was determined by culture in a medium containing gelatin (gelatinase); stretching on plates containing 5% sheep blood agar (hemolysis); Biofilm formation on Congo red agar. The determination of antimicrobial resistance mechanisms (Efflux pump) was done through culture in medium containing EtBr (ethidium bromide) and the production of Betalactamases was determined through the intersection of the allos and the "phantom zone". high rate of resistance to antimicrobials of the penicillin classes showed (ampicillin = 86.4%); quinolones (ciprofloxacin=49%); cephalosporins (cefepime 47.7%); Sulfonamides (Trimethopim+Sulfamethoxazole- 47.7%) and 3rd generation Fluroquinolones (Levofloxacin- 34.1% and Ofloxacin 42%) and low level of resistance to the nitrofurans class (nitrofurantoin= 95%). As for the virulence profile, 18% (8/44) exhibit the pattern of partial hemolysis and 0% (0/44) exhibit the hydrolysis capacity of gelatin. Regarding the antibiotic resistance profile, 86% (38/44) were positive for the presence of efflux pumps and 46% (20/44) for biofilm formation. IRMA >0.2 was observed in 66% (29/44) of the isolates, with 46% (20/44) resistant to 2~6 antibiotics; 18% (8/44) at 7~9 antibiotics and 25% (11/44) at 10~14 antibiotics. In addition, 7% (3/44) were resistant to none of the antibiotics and 4% (2/44) to only one antibiotic. It is concluded that *E. coli* isolates are multiresistant to antimicrobials of the penicillins, quinolones, cephalosporins, sulfonamides and fluoroquinolones classes, form biofilms and present an efflux pump. These findings contribute to more efficient solutions for the treatment of occasional infections by this pathogen.

Keywords: Resistance; Strain; Bacteria; Pathogenicity; Gene.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/E	Attaching and Effacing
AME	Enzimas Amino-glicosídicas
AMINO	Aminoglicosideo
CARBA	Carbapenemicos
CEFALO	Cefalosporina
CEFA	Cefamicinas
CD	Doença de Crohn
CTE	Cadeia de Transporte de Elétrons
CNF	Fator de Necrose Citotóxico
DAEC	<i>Escherichia coli</i> Difusamente aderente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroaderente
EAggEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Entereoinvasiva
EtBr	Brometo de Etidium
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
EPI'S	Equipamentos de proteção individual
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Entero-hemorrágica
FLURO	Fluroquinolonas 3ª geração
HeLa	Linhagem de células imortais Henrieta Lacks
HGT	Transferência Horizontal de Genes
HUS	Síndrome Hemolítica Urêmica
IRAS	Infecções Relacionadas a Assistência em Saúde
IRMA	Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos
NTEC	<i>Escherichia coli</i> Necrotoxigenica
Nº A.R	Número de Antibióticos Resistentes
Nº C.A.R	Número de Classes dos Antibióticos Resistentes
NITRO	Nitrofuranos

mRNA	Acido Ribonucleico mensageiro
MACRO	Macrolideos
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEN	Penicilinas
PEN+IBL	Penicilinas com inibidor de betalactamases
QUINO	Quinolonas
RTX	Citolisinas Formadoras de Poros
RPS	Proteínas de Proteção Ribossomal
SAT	Proteína Auto Transecretada
SePEC	<i>Escherichia coli</i> Invasiva
STS	Shigatoxinas
SULFO	Sulfonamidas
T3ss	Sistema de Secreção Tipo 3
UC	Colite Ulcerativa
UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uropatogênica
UTI's	Unidade de Terapia Intensiva
VTS	Verotoxinas
VTEC	<i>Escherichia coli</i> Verotoxigênica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: *Escherichia coli* em microscopia eletrônica de varredura. (A) Forma planctônica e (B) em estrutura de biofilme.....4

Figura 2: Percentual de resistência dos 44 isolados de *E. coli*. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3: Perfil de sensibilidade dos isolados de *E coli* frente aos antimicrobianos testados..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4: Índice de Resistência aos Antimicrobianos (IRMA) dos isolados de *E coli*. Onde: 0 antibióticos (N= 3 isolados); 1 antibiótico (N= 2 isolados); 2~6 antibióticos (N= 20 isolados); 7~9 antibióticos (N= 8 isolados); 10~14 antibióticos (N= 11 isolados). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 5: Perfil de multirresistência dos isolados de *E coli* agrupados em quantidade de antibióticos aos quais apresentaram resistência. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 6: Produção de α -hemolisina pelos isolados de *E. coli*. Onde: Cepas 195 e 293 são produtoras de α -hemolisina e as cepas 194 e 286 são não produtoras de α -hemolisina. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 7: Leitura do teste de hidrólise da gelatina com 24h (A) e 144h (B). Onde: 318: isolado de *E coli*; C(-): controle negativo e C(+): controle positivo inoculado com *P. aeruginosa*. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 8: Análise da presença de bomba de efluxo. As placas A, B, C, D, E e F foram divididas em oito regiões, onde foi plaqueado o isolado de *E. coli*; C+: controle positivo e C-: controle negativo. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 9: Detecção de β -lactamase de espectro estendido pelo método de disco aproximação. Nota-se a formação da “Zona Fantasma” (seta) entre os alos caracterizando a amostra como positiva para produção de β -lactamase..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 10: Isolados positivos (com escurecimento do meio) e isolados negativos (sem escurecimento do meio) para produção de biofilme. **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Índice de resistência dos isolados de *E coli* aos antimicrobianos, divididos segundo a classe medicamentosa.24

Quadro 2: Perfil de Resistência as classes dos antibióticos testados. Aminoglicosídeo (AMINO); Carbapenêmicos (CARBA); Cefalosporina (CEFALO); Cefamicinas (CEFA); Fluroquinolona 3^o geração (FLURO); Macrolídeos (MACRO); Nitrofurans (NITRO); Penicilinas (PEN); Penicilinas + Inibidor de Betalactamases (PEN+IBL); Quinolonas (QUINO); Sulfonamidas (SULFO)1

Quadro 3: Agrupamento dos dados obtidos quanto aos fatores de virulência e mecanismos de resistência. N^o A.R: Número de Antibióticos Resistentes; N^o C.A.R: Número de Classes de Antibióticos Resistentes; IRMA: Índice de Resistencia Múltipla aos Antimicrobianos.....5

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados de <i>E coli</i> positivos para produção de α -hemolisina.....	43
--	----

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DA LITERATURA	37
2.1.	INFECÇÕES RELACIONADAS A ASSISTÊNCIA EM SAÚDE (IRAS) .	17
2.2.	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	18
2.3.	CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS <i>E. coli</i>	19
2.3.1.	<i>E. coli</i> Enteroe invasiva (EIEC).....	71
2.3.2.	<i>E. coli</i> Enterotoxigênica (ETEC)	71
2.3.3.	<i>E. coli</i> Enteropatogênica (EPEC).....	8
2.3.4.	<i>E. coli</i> Verotoxigênica (VTEC)	82
2.3.5.	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	93
2.3.6.	<i>E. coli</i> Enteroaderente ou enteroagregativa (EAEC ou EA _g EC).....	93
2.3.7.	<i>E. coli</i> Necrotoxigênica (NTEC)	104
2.3.8.	<i>E. coli</i> Uropatogênica (UPEC)	104
2.3.9.	<i>E. coli</i> Invasiva (SePEC).....	115
2.3.10.	<i>E. coli</i> Difusamente aderente (DAEC)	115
2.4.	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	26
2.5.	FATORES DE VIRULÊNCIA	159
2.5.2.	Outras Proteínas de Membrana (OPM's)	171
2.5.3.	Exotoxinas	171
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	204
3.1.	Isolados bacterianos.....	204
3.2.	Avaliação da virulência dos isolados	21
3.3.	Análise da Presença da Bomba de Efluxo.....	215
4.	RESULTADOS	35
4.1.	Resistência aos antimicrobianos	38
4.2.	Virulência dos isolados	14
4.2.1.	α -Hemolisina.....	14
4.2.2.	Teste de Hidrólise da Gelatina.....	14
4.3.	Análise da Bomba de Efluxo.....	25
4.4.	Deteção de β -lactamases de espectro estendido	36
4.5.	Produção de Biofilme.....	47
5.	DISCUSSÃO.....	70
6.	CONCLUSÃO	125
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13

1. INTRODUÇÃO

As Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS) ou infecções hospitalares são um problema não só no Brasil, como também em outros países. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2009) cerca de 1,4 milhões de pessoas são infectadas a cada hora em todo o mundo, com impacto direto no aumento das taxas de mortalidade. Estima-se que 5% a 15% dos pacientes internados desenvolvem IRAS durante o tratamento (WHO, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009; PADOVEZE; FORTALEZA, 2014), em especial os imunodeprimidos e os que necessitam de uma interação mais direta e invasiva durante a terapêutica clínica ou em uma unidade de terapia intensiva (HESPANHOL *et al.*, 2018).

Entre os fatores que influenciam o acometimento e aumento dos casos de IRAS durante os processos terapêuticos em pacientes hospitalizados, pode-se citar o uso indiscriminado de antibióticos, tanto na terapêutica humana quanto na animal e, até mesmo, na produção pecuária (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Esta conduta tem cada vez mais contribuído com o surgimento de diversas cepas microbianas resistentes a antibióticos ou até mesmo multirresistentes (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014). Muitos mecanismos bacterianos estão relacionados com o desenvolvimento desta resistência, os quais podem ser adquiridos de forma intrínseca, adaptada ou adquirida. Os principais mecanismos de resistência bacteriana são: sistemas de efluxo hiperexpressos (excreção de substâncias tóxicas); produção de enzimas que destroem ou modificam a ação dos antibióticos (β -lactamases, gelatinase); modificação da molécula do antibiótico e dos seus sítios de ligação e redução da permeabilidade da membrana externa (FERRI *et al.*, 2015).

Essas características de resistência podem ainda ser transmitidas interespecies e/ou passadas para novas gerações da mesma bactéria através da transferência horizontal de genes (CHRISTAKI *et al.*, 2020). Alguns microrganismos são descritos na literatura como causadores de várias patologias em humanos, dentre estes, muitos possuem mecanismos de resistência aos antimicrobianos, sendo os mais estudados as bactérias da espécie *Escherichia coli* (*E. coli*) (JANG *et al.*, 2017). Estas são comumente encontradas no lúmen intestinal da maioria dos animais e humanos, se relacionando de forma comensal com seu hospedeiro, mas

que podem se tornar patogênicas através da expressão de genes de virulência (MAINIL, 2013; JANG *et al.*, 2017). Diversos autores têm realizado a identificação e caracterização de patovares de *E. coli*, nomeados de acordo com a patologia que desenvolvem nos hospedeiros ou por suas características fenotípicas de virulência. Até o momento 10 patovares de *E. coli* foram descritos na literatura como causadores de patologias em diversos hospedeiros, sendo estes: *E. coli* Entereoinvasiva (EIEC); *E. coli* Verotoxigênica (VTEC); *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* Enteropatogênica (EPEC); *E. coli* Entero-hemorrágica (EHEC); *E. coli* Enteroaderente ou enteroagregativa (EAEC ou EAggEC); *E. coli* Necrotoxigenica (NTEC); *E. coli* Uropatogênica (UPEC); *E. coli* Invasiva (SePEC); *E. coli* Difusamente aderente (DAEC) (MAINIL, 2013; JOHNSON *et al.*, 2014; JANG *et al.*, 2017; SHAH *et al.*, 2019; UMPIÉRREZ *et al.*, 2021).

Frequentemente as IRAS são ocasionadas por microrganismos comuns ao homem, mas que, em algum momento se tornam patogênicos e, até mesmo, resistentes aos antimicrobianos. Devido a essas características estes microrganismos necessitam maior atenção durante o processo de mitigação, pois podem apresentar um ou mais mecanismos de resistência aos antimicrobianos, dificultando o tratamento não apenas da infecção inicial, como também de uma nova infecção (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Por isto a identificação dos fatores de virulência e de resistência a antimicrobianos é de vital importância não só para o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da patologia, mas também para a caracterização de isolados patogênicos de *E. coli*, possibilitando o desenvolvimento de melhores abordagens terapêuticas e estratégias de combate a esses microrganismos.

O objetivo deste estudo foi determinar a presença dos fatores de virulência e mecanismos de resistência em isolados bacterianos de *E. coli* responsáveis por infecções hospitalares no Hospital Universitário da Univasf (HU - UNIVASF) em Petrolina, PE.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. INFECÇÕES RELACIONADAS A ASSISTÊNCIA EM SAÚDE (IRAS)

Segundo o Ministério da Saúde (MS) e a Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) através da portaria nº 2.616, de 12 de maio de 1998, às Infecções relacionadas assistência em saúde (IRAS) são uma problemática não só de caráter nacional como internacional, tanto no que diz respeito a prevenção quanto ao controle destas (BRASIL, 2009). São consideradas como IRAS todas as infecções de ocorrência não somente no âmbito hospitalar como também em todos os ambientes de assistência em saúde a uma determinada população. A OMS reconhece-as como uma das maiores problemáticas em saúde pública mundial e oferece diretrizes para que sejam montadas ações estratégicas para o combate destas enfermidades de forma articulada nas diversas esferas do setor público (BRASIL, 2009; HESPANHOL *et al.*, 2018).

As IRAS possuem como principal efeito adverso o aumento da morbidade e mortalidade nas unidades de saúde ocasionando um impacto negativo para a sociedade, tanto do ponto de vista social, quanto econômico (RUDD *et al.*, 2020). Quase sempre estas infecções acometem pacientes imunossuprimidos e que passam por ambientes ou situações que necessitam de uma terapêutica mais invasiva, como é o caso das unidades de terapia intensiva (UTI's) (HESPANHOL *et al.*, 2018).

Nos Hospitais Brasileiros as IRAS despertam grande preocupação, pois na maioria das vezes são de difícil combate, aumentando o tempo de tratamento dos pacientes. Uma das principais ferramentas para o tratamento e controle dessas infecções é a vigilância epidemiológica, que fornece uma observação mais direta e sistemática de sua ocorrência permitindo também a identificação e monitoramento das ações que estão relacionadas com a ocorrência destas IRAS nos hospitais e centros terapêuticos (ARAÚJO; PEREIRA, 2017). Nos últimos anos várias abordagens vêm sendo aplicadas com a intenção de diminuir a incidência das IRAS como a lavagem correta das mãos e o uso adequado dos equipamentos de proteção individuais (EPI's). Estas ações vem sendo destacadas como as principais

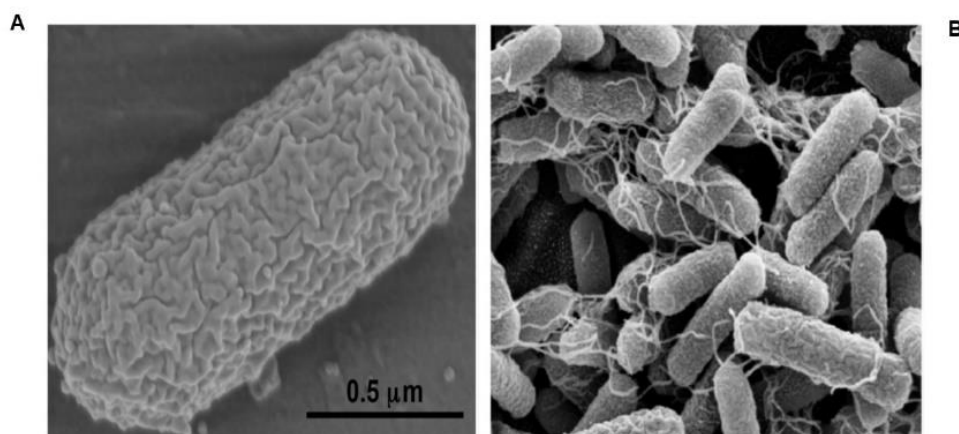
abordagens utilizadas para mitigar a disseminação de microrganismos multirresistentes (ARAÚJO; PEREIRA, 2017)

Segundo a OMS diversos patógenos vem emergindo nos últimos anos como potenciais problemas em saúde pública os quais estão diretamente relacionados com a resistência aos antimicrobianos. Em 2017 a OMS classificou diversas famílias de bactérias como ameaças à saúde humana, e que necessitam de prioridade na pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos. Dentre estes encontram-se as bactérias das famílias: *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos e produtoras de ESBL; *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos; *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, classificadas como “prioridade 1 crítica” (WHO, 2017)

2.2. *Escherichia coli* (*E. coli*)

E. coli é uma espécie de bactéria do gênero *Escherichia*, gram-negativa e pertencente à família das Enterobacteriaceae (figura 1). Foi isolada primeiramente em 1885 por Theodor Escherich em amostra fecal de uma criança com diarreia (MAINIL, 2013; ZHANG *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2019). Em 1893 foram identificadas cepas de *E. coli* como sendo as causadoras de patologias em animais e humanos e, então, foram subdivididas em patogênicas e não patogênicas (MAINIL, 2013; JANG *et al.*, 2017; SHAH *et al.*, 2019).

Figura 1: *Escherichia coli* em microscopia eletrônica de varredura. (A) Forma planctônica e (B) em estrutura de biofilme.



Fonte: (A) BLOUNT, 2015 (B) NASCIMENTO, et al. 2014

No decorrer das últimas décadas a *E. coli* tem-se tornado um dos microrganismos mais estudados na comunidade científica devido ao seu rápido crescimento sob condições controladas, aproximadamente 20 minutos, possibilitando o desenvolvimento de diversos sistemas de manipulação genética, e considerado microrganismo modelo na era da biologia sintética e do DNA recombinante. (ZHANG *et al.*, 2013; JANG *et al.*, 2017).

2.3. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS *E. coli*.

As bactérias da espécie *E. coli* apresentam-se sob a forma bacilar com a presença de fimbrias e flagelos em sua superfície. São comumente encontradas no lúmen intestinal da maioria dos animais e nos humanos, compondo a microbiota destes e, em alguns casos, podem vir a causar diversas patologias (VAN ELSAS *et al.*, 2011; MAINIL, 2013; JANG *et al.*, 2017).

Esses microrganismos possuem seu material genético organizado sob a forma de um único cromossomo circular, retorcido e ligado a membrana bacteriana e constituído por uma única molécula de DNA circular. Quanto a informação genética, essa é transcrita em um mRNA diretamente traduzido em proteínas, que são essenciais para o funcionamento e estrutura da célula bacteriana. A *E. coli* possui em seu DNA aproximadamente 4,6 milhões de pares de bases, ocupando quase que 10% do volume da célula bacteriana (B Além dessas, outra característica, 2015; TORTORA *et al.*, 2016).

Além do seu genoma, as células da *E. coli* possuem em seu interior outros elementos genéticos móveis denominados plasmídeos e transposons. Esses são responsáveis por carrear mecanismos adicionais, muitas vezes adquiridos de outras bactérias, que podem modular a expressão gênica, gerando características fenotípicas intrínsecas a estas células, como é o caso dos plasmídeos que carregam genes que codificam para mecanismo de virulência e resistência aos antimicrobianos (BLOUNT, 2015; BAESHEN *et al.*, 2015)

Além dessas, outra característica importante da *E. coli* é possuir flagelos e fimbrias, constituídas por múltiplas cópias de uma única proteína (subunidade

Principal) localizadas ao redor da célula, essas fimbrias são importantes para a motilidade e aderência dos microrganismos permitindo que este tenha certo potencial de locomoção e adesão aos tecidos, possibilitando a colonização de diversas áreas do hospedeiro (MAINIL, 2013).

Quanto ao metabolismo e características bioquímicas, grande parte das cepas de *E. coli* são capazes de utilizar o oxigênio quando disponível e, na ausência, seu crescimento ocorre através da fermentação ou respiração anaeróbica, sendo consideradas por diversos autores como um microrganismo anaeróbio facultativo (JANG *et al.*, 2017). *E. coli* possuem também grupos enzimáticos que lhe conferem características peculiares que permitem sua identificação através de testes bioquímicos como os descritos por York *et al.* (2000).

A capacidade de metabolizar lactose através da enzima endógena β -galactosidase é uma das características que auxiliam sua identificação bioquímica, pois quando disponível no meio a lactose é carregada para o interior da célula bacteriana através das proteínas de canais lactose permease, uma proteína integral que facilita a entrada da lactose. Uma vez no interior da célula bacteriana, a lactose é convertida em alolactose através do processo de indução gênica, onde ativa a produção da β -galactosidase degradando a lactose em dois açúcares glicose e galactose (YORK *et al.*, 2000; BUERIS *et al.*, 2007; TORTORA *et al.*, 2016).

Além da metabolização da lactose faz parte da identificação bioquímica de rotina para *E. coli* a ausência da enzima citocromo C oxidase. Uma enzima comumente encontrada em bactérias aeróbicas que compõe a cadeia de transporte de elétrons (CTE) e é a última enzima da cadeia responsável por transferir elétrons ao oxigênio. A presença ou ausência dessa enzima serve de elemento norteador para a identificação bioquímica uma vez que a presença da citocromo C oxidase pode ocorrer em algumas cadeias de transporte de elétrons e em outras não, sendo a *E. coli* e todas as bactérias pertencentes a família das Enterobacteriaceae negativas para a presença desta enzima, o que a difere da *Neisseria gonorrhoeae* e da *Pseudomonas spp.*, consideradas como citocromo C oxidase positivas (YORK *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2001).

Outra característica bioquímica importante para identificação de *E. coli* é o teste de produção do Indol. Através da ação da enzima triptofanase o triptofano, um aminoácido aromático e polar, quando presente no meio é quebrado em moléculas menores (indol, ácido pirúvico e amônia). No meio de cultivo o indol pode ser

detectado através da adição do reativo de Kovacs, onde na presença deste a amostra contendo indol apresentará um anel de coloração avermelhada na superfície do meio de cultura. A ausência dessa formação avermelhada indicará que não houve a hidrólise do triptofano e testará negativo para a presença de indol no meio. Alguns autores apontam a *E. coli* como uma espécie que possui a enzima triptofanase, testando positivo para a presença de indol, quando o triptofano está presente no meio (YORK *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2001; BLOUNT, 2015).

Em geral a *E. coli* é comensal, pois constitui a microbiota intestinal da maioria dos organismos de sangue quente, sem causar danos ao hospedeiro. Todavia, elementos genéticos móveis podem transformá-la em cepas extremamente patogênicas para muitas espécies de animais e para humanos. Essas cepas são caracterizadas na literatura de acordo a síndrome clínica que causam ou o hospedeiro que afetam (MAINIL, 2013; JANG *et al.*, 2017; TORTORA *et al.*, 2016; UMPIÉRREZ *et al.*, 2021). Até o presente momento dez cepas patogênicas de *E. coli* foram identificadas, caracterizadas e estudadas, sendo elas:

2.3.1. *E. coli* Entereoinvasiva (EIEC)

Possui como característica principal possuir praticamente os mesmos mecanismos patogênicos vistos em *Shigella* spp., mecanismos estes, que conseguem acesso as células da mucosa intestinal, possibilitando que se espalhe célula a célula e cause inflamação, febre e disenteria. Quanto as suas características genéticas, a EIEC possui o gene marcador *ipaH* que é semelhante ao produzido por *Shigella* spp e é responsável por desencadear mecanismos de virulência em células infectadas. A infecção causada por EIEC pode acometer tanto humanos quanto primatas (BUERIS *et al.*, 2007; MAINIL, 2013; TORTORA *et al.*, 2016; UMPIÉRREZ *et al.*, 2021).

2.3.2. *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC)

A ETEC é descrita em alguns trabalhos como a principal causadora de diarreia fatal em crianças menores de cinco anos de idade e diarreia profusa em bebês na fase neonatal, sendo também conhecida como a principal causadora da diarreia dos viajantes. A patogenia da ETEC ocorre através da secreção de enterotoxinas oligopeptídicas, codificadas pelos genes (STa, STb (LTp/h, LT-ia, LT-lib),

semelhantes em sua função e mecanismo de ação as produzidas por cólera. Além dessas toxinas as ETEC ainda utilizam mecanismos patogênicos através de Adesinas fimbriais (F2–F6, F17, F18, F41). Contudo, essas bactérias não são invasivas e permanecem no lúmen intestinal. Esse sorovar patogênico também é apontado como responsável por causar diarreia em leitões, bezerros e porcos (BUERIS *et al.*, 2007; MAINIL, 2013; TORTORA *et al.*, 2016; JANG *et al.*, 2017).

2.3.3. *E. coli* Enteropatogênica (EPEC)

Nos países em desenvolvimento a EPEC é a principal variante patogênica de *E. coli* causadora de diarreia. Essa patovar é de extrema importância clínica, uma vez que é a principal causadora de infecções potencialmente fatais em lactantes, pois consegue se fixar na parede intestinal dos seus hospedeiros onde ataca as células epiteliais intestinais e elimina as microvilosidades ao redor do local da infecção. Neste processo, estas bactérias conseguem estimular os filamentos de actina na região apical das células dos hospedeiros a produzir espécies de pedestais ao redor do seu sítio de fixação. Secreta diversas proteínas efetoras que são translocadas para a célula hospedeira, causando lesões que anexam e apagam e são conhecidas pelo termo em inglês attaching and effacing (A/E), sendo esse processo diretamente relacionado com as fimbrias tipo 4 dispostas na célula da EPEC. Além disso, as EPEC contribuem diretamente com o processo de diarreia no hospedeiro. Quanto ao potencial de infecção, essa sorovar consegue infectar não somente humanos como também diversos outros animais (BUERIS *et al.*, 2007; MAINIL, 2013; TORTORA *et al.*, 2016; UMPIÉRREZ *et al.*, 2021)

2.3.4. *E. coli* Verotoxigênica (VTEC)

O sorovar verotoxigênica da *E. coli* (VTEC) produz uma toxina que foi primeiramente isolada em células epiteliais renais, é extremamente ativa em células Vero e descrita pelo nome de shigatoxina, pois é ativa em células endoteliais dos vasos sanguíneos da mucosa gastrointestinal. Devido a essas características, esse sorovar pode causar diversas manifestações clínicas nos hospedeiros, sendo as mais comuns a Síndrome Hemolítica Urêmica (HUS), que pode levar a insuficiência renal; diarreia; colite hemorrágica e falha renal em crianças. A VTEC é considerada um grande problema em saúde pública em países desenvolvidos e em

desenvolvimento. Trabalhos recentes demonstram sua presença em carne, água produzida, rios, lagos e, até mesmo, em frutas, tendo como hospedeiros mais comuns os humanos e os porcos (MAINIL; DAUBE, 2005; KARMALI *et al.*, 2010; BREUM; BOEL, 2010; MAINIL, 2013; JOHNSON *et al.*, 2014; TORTORA *et al.*, 2016).

2.3.5. *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC)

Esse sorovar da *E. coli* se assemelha ao VTEC, possuindo como principal fator de virulência uma proteína do tipo Shiga, produzida originalmente por *Shigella dysenteriae* e liberada durante o processo de lise celular, o que dificulta o tratamento dessa patologia já que o uso de antibióticos pode ocasionar lise celular e liberação dessas toxinas no hospedeiro. A EHEC sorotipo O157:H7 é descrita na literatura como o principal patógeno causador de surtos de diarreia, colite hemorrágica e HUS em humanos em diversos países e, principalmente, na América do Norte. Em animais esse sorovar é descrito apenas como causador de diarreia no gado e, assim como os demais sorovares, se dissemina por água e/ou alimentos contaminados. Agências reguladoras de alguns países exigem a testagem de EHEC no gado destinado para exportação, principalmente naquele para produção de carne moída. Vegetais folhosos também podem carrear esse sorovar uma vez que, em alguns casos, são cultivadas com estrume bovino ou contaminados pela água (MAINIL, 2013; JANG *et al.*, 2017).

2.3.6. *E. coli* Enteroaderente ou enteroagregativa (EAEC ou EA_ggEC)

Até o presente momento a EAEC ou EA_ggEC foi indicada apenas como principal causadora de diarreia aquosa sem febre, dor abdominal, náuseas e vômito e, em alguns casos, diarreia do viajante em humanos, principalmente em crianças menores de cinco anos. Estudos demonstram que sua patogênese ocorre pela adesão da mucosa intestinal pelas fimbrias de aderência agregativa e pela liberação de enterotoxinas e citotoxinas (MAINIL, 2013; JANG *et al.*, 2017; RÍOS-MUNIZ *et al.*, 2019).

2.3.7. *E. coli* Necrotoxigênica (NTEC)

O sorovar necrotoxigênica da *E. coli* (NTEC) é um patógeno emergente que vem sendo estudado e identificado nos últimos anos. É caracterizado por ser um sorovar produtor de uma necrotoxina denominada de Fator de Necrose Citotóxico (CNF), que parece possuir a capacidade de induzir a multinucleação celular em cultura de células Vero, além de causar necrose em pele de coelhos. Até o presente momento dois tipos diferentes de necrotoxinas foram identificadas, a CNF1 e a CNF2, caracterizando esse patógeno em duas cepas distintas, a NTEC1 isolada em amostras de diversos animais e humanos e a NTEC 2 isoladas apenas em amostras de ruminantes. Geralmente estas duas cepas são responsáveis por causar septicemia, infecções extras-intestinais, diarreia e infecções do trato urinário (VAN BOST *et al.*, 2001; JOHNSON *et al.*, 2010; MAINIL, 2013; BEKAL *et al.*, 2015)

2.3.8. *E. coli* Uropatogênica (UPEC)

Conhecida como uma das principais causadoras de infecções do trato urinário no mundo, a UPEC se evade do trato gastrointestinal deslocando-se para o trato urinário onde desenvolve um quadro patogênico no hospedeiro através de diversos mecanismos e fatores de virulência. Esses fatores podem ser caracterizados e distribuídos em dois grandes grupos: fatores de superfície celular bacteriana composto por fimbrias tipo1 e fimbrias tipoP, flagelo, lipopolissacarídeo capsular e outras proteínas de membrana. Segundo Vieira (2009) e Desvaux *et al.* (2020) esses mecanismos se organizam em grandes regiões cromossômicas denominadas ilhas de patogenicidade, onde estão todos os genes responsáveis pelos mecanismos de virulência estando diretamente relacionados com a capacidade de migração e adesão entre os tratos gastrointestinal/urinário. Além disso, estão relacionados com a formação de biofilme, indução de citocinas e fatores de secreção virulenta, composto por secreção de hemolisina e sideroforos, que são importantes porque auxiliam a célula não somente na adesão a células do hospedeiro como também na evasão das células de defesa do hospedeiro (MAINIL, 2013; SHAH *et al.*, 2019; DEHKORD *et al.*, 2020).

2.3.9. *E. coli* Invasiva (SePEC)

Relatada em alguns trabalhos como septicemia associada a *E. coli*, esse sorovar é considerado muito perigoso pois seu principal mecanismo de virulência permite que ele adentre a corrente sanguínea e se dissemine por toda extensão do corpo do hospedeiro causando um quadro de septicemia que pode, em muitos casos, levá-lo a óbito. A contaminação por esse sorovar na maioria dos casos ocorre através de contaminações por cateteres, principalmente urinários em hospitais. Em relação a virulência, estudos indicam que a SePEC, junto como outros sorovares de *E. coli* causadoras de infecções urinárias como EXPEC; UPEC e NEMEC, compartilham diversos mecanismos de infecção sendo os mais importantes a formação de biofilme e o perfil de adesinas e invasinas presentes na superfície celular deste patógeno que estão diretamente relacionados com sua característica invasiva, resistente e evasiva. Além desses fatores, esse sorovar ainda possui um perfil de exotoxinas que contribuem com os quadros patogênicos desenvolvidos por essa sorovar, sendo destas as mais importantes: α -hemolisina; a Proteína Autotransportada Secretada (SAT) e o CNF-1. Juntas, essas toxinas conseguem alterar a morfologia e função das células do hospedeiro criando um perfil patogênico agressivo que pode levar o hospedeiro a óbito (CONCEIÇÃO *et al.*, 2012; MAINIL, 2013; TIBO *et al.*, 2016)

2.3.10. *E. coli* Difusamente Aderente (DAEC)

Essa sorovar de *E. coli* é descrita como sendo uma das principais causadoras de diarreias agudas/graves no mundo. Possui um padrão de aderência difuso se ligando diretamente dessa forma a culturas de células HeLa (Linhagem de células imortais Henrieta Lacks) e células epiteliais Hep-2 no intestino do seu único hospedeiro, o ser humano. Ela é descrita como causadora de diversas patologias já conhecidas em outras sorovares de *E. coli*, podendo causar infecção do trato urinário em adultos e crianças; septicemia; diarreia persistente em crianças menores de cinco anos e levar ao óbito; doenças inflamatórias intestinais graves; doença de Crohn (CD) e colite ulcerativa (UC). A DAEC possui uma grande expressão de adesinas em sua superfície celular, sendo esse o seu principal fator de virulência. É subdividida em duas cepas importantes: a Afa/Dr+ e a Afa/Dr-. Estudos recentes demonstram a ligação do padrão da Afa/Dr+ a quadros de diarreia agressivos

(BOUGUÃÉNEC; SERVIN, 2006; MAINIL, 2013; MIRSEPASI-LAURIDSEN *et al.*, 2019; JAVADI *et al.*, 2020).

Além de todas as características patogênicas da *E. coli*, outra preocupação debatida nas últimas décadas e cada vez mais emergente como problemática em saúde pública é o surgimento da resistência ao antimicrobianos, que limita e diminui o leque de opções de tratamento.

2.4. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Nas últimas décadas a resistência antimicrobiana tem-se tornado uma problemática emergente em saúde pública no mundo, aumentando a níveis alarmantes a dificuldade nos tratamentos das infecções bacterianas que poderiam ser tratadas com antibióticos das mais diversas classes. A preocupação com o processo de resistência as drogas antimicrobianas já é discutida desde a descoberta da penicilina pelo médico e bacteriologista escocês Alexander Fleming em 1928 (MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

Uma das ações que tem contribuído para que essa problemática é o uso indiscriminado dos antimicrobianos, pois quando são utilizados de forma incorreta ou indiscriminada podem ocasionar, através de uma pressão seletiva no meio ou organismo, o surgimento de cepas resistentes e, até mesmo, multirresistentes a certas classes de antibióticos. Estes são utilizados em diversos setores da sociedade contemporânea, não somente para o tratamento de patologias em humanos como também em animais e plantas a nível de escala industrial. Um exemplo disso é o uso de antibióticos em animais de produção como promotores de crescimento no desenvolvimento de aves de interesse comercial em granjas (*et al.*, 2017; MCEWEN; COLLIGNON, 2018). Segundo o Center of Disease Control (CDC), cerca de dois milhões de pessoas são infectadas por cepas resistentes a antibióticos, resultando numa taxa de ~1,3% de mortes por estas infecções a cada ano na América do Norte, semelhante ao que acontece na Europa onde estima-se que cerca de 25.000 mortes são ocasionadas por ano devido a cepas resistentes ou multirresistentes a antibióticos (MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

Um fator que é importante no surgimento de cepas resistentes a antimicrobianos e que vem se tornando cada vez mais uma temática importante na

comunidade científica são os mecanismos por trás de seu surgimento, principalmente das cepas multirresistentes a antibióticos (CHRISTAKI *et al.*, 2020). A resistência bacteriana a antibióticos pode ser desenvolvida de muitas formas, as quais tem sido descrita na literatura como: intrínseca, adaptativa e adquirida, cada qual com mecanismos próprios importantes ao seu desenvolvimento (BRINKACK *et al.*, 2017; ARZANLOU *et al.*, 2017; CHRISTAKI *et al.*, 2020).

Dentre os mecanismos que estão diretamente relacionados ao surgimento da resistência antimicrobiana, os mais citados são pressão seletiva; transferência horizontal de genes (HGT); transformação, transdução, conjugação; modulação da expressão genética e mutações genéticas, os quais ocorrem como descrito abaixo (HOLMES *et al.*, 2016; ARZANLOU *et al.*, 2017; BRINKACK *et al.*, 2017; CHRISTAKI *et al.*, 2020):

- I. Pressão Seletiva: relaciona-se diretamente ao uso indiscriminado dos antimicrobianos, ocorrendo quando doses não letais são administradas e levam a evolução das células sobreviventes no meio que desenvolvem mecanismos contra esse antimicrobiano.
- II. Mutações Genéticas: ocorrem por diversos fatores, sendo os mais comuns a multiplicação celular exacerbada na presença do antibiótico. Podem ocorrer erros no processo que beneficiam a célula bacteriana, a qual desenvolve resistência ao antibiótico.
- III. Transformação: através da incorporação de material genético exógeno ao genoma da célula bacteriana, com sequências que carregam genes de resistência a certos antibióticos.
- IV. Transdução: através da ação de um vírus bacteriófago, podendo ocorrer através da adição de sequências genéticas pelo vírus, levando material genético de uma bactéria para outra ou por erros induzidos durante o processo.
- V. Conjugação: quando o material genético é transferido de célula a célula através de plasmídeos contendo não só genes que codificarão para proteínas funcionais ligadas a resistência antimicrobiana como também seu próprio maquinário de replicação. Esse processo se dá através dos pilus sexuais, presentes da superfície celular.
- VI. Modulação da expressão genética: ocorre através de mudanças no ambiente podendo ser a presença de antibióticos, pH, temperatura,

pressão etc. Essa modulação causar fenótipos diferentes do mesmo patógeno e até mudanças epigenéticas. Este processo é possível através da enzima DAM-Metilase, sendo diretamente responsável pela presença de perfis genéticos de populações bacteriana. Pode-se citar como mecanismo gerado através da modulação gênica, os seguintes mecanismos:

- **β-lactamases:** Essas enzimas atuam através da destruição das ligações peptídicas na molécula do antibiótico, modificando sua estrutura e fazendo com que sua ação original seja comprometida (DEFILIPP *et al.*, 2019; CHRISTAKI *et al.*, 2019);
- **Modificação da molécula do antibiótico:** Ocorre através da ação de enzimas amino-glicosídicas (AME) que alteram a estrutura da molécula do antibiótico através de processos de acetilação, adenilação e ou fosforilação, diminuindo a ação antimicrobiana da molécula (RAMIREZ, 2010; CHRISTAKI *et al.*, 2019);
- **Modificação nas enzimas de ação dos antibióticos:** Esse mecanismo ocorre através de mutações pontuais nos genes que codificam para moléculas importantes no mecanismo de ação de certos antibióticos. A exemplo disso, alguns trabalhos demonstram a presença de mutações nos genes *nfsA* e *nfsB*, responsáveis por codificar enzimas nitroredutases que atuam diretamente na ação antimicrobiana de drogas da classe dos nitrofuranos.
- **Proteção do sítio de atuação dos antibióticos:** Esse processo ocorre através da expressão de proteínas que se ligam ao redor do sítio de ação de enzimas, impedindo a conexão do antibiótico com seu sítio de ligação. A exemplo disto é visto na literatura a expressão de proteínas de proteção ribossomal (RPS) que conferem a resistência a antimicrobianos que interagem com o complexo ribossomal das células bacterianas. Esse mecanismo já foi descrito tanto em bactérias gram-negativas quanto gram-positivas (ALDRED *et al.*, 2014);
- **Mudança dos sítos de ação:** Através de mutações nos genes que codificam para proteínas que constituem os domínios de ligação, interferindo na ligação da molécula do antibiótico a estrutura bacteriana, impedindo o mecanismo de ação antimicrobiana. Alguns autores

demonstram a presença de mutações nos genes 23SrRNA que codificam para o domínio V de proteínas ribossomos bacterianos L3 e L4 conferindo ao microrganismo a resistência ao antimicrobiano linezolida (MILLER *et al.*, 2014);

- **Bombas de Efluxo:** São formadas por um sistema tripartido dependente de energia e que estão diretamente ligados a membrana celular interna e externa. Atuam bombeando para a porção extracelular moléculas que seriam letais ao microrganismo. Esse mecanismo muitas vezes possui a capacidade de transportar diversas substâncias para fora da célula, o que está diretamente relacionado a multirresistência a fármacos antimicrobianos (WESTON *et al.*, 2018).

Alguns autores demonstram a emergência de cepas bacterianas multirresistentes a antibióticos, principalmente da espécie *E. coli*, uma vez que estas são as principais bactérias gram-negativas presentes na microbiota humana e da maioria dos animais de sangue quente, também sendo as causadoras das principais patologias emergentes em todo o mundo. Alguns trabalhos também demonstram a relação das cepas multirresistentes de *E. coli* aos seus fatores de virulência o que faz com que estas bactérias desenvolvam quadros cada vez mais graves e letais de suas patologias, principalmente no que diz respeito aos sorovares patogênicos de *E. coli* (SHAH *et al.*, 2019; BALBIN *et al.*, 2020).

2.5. FATORES DE VIRULÊNCIA

Segundo Mainil (2013), pode-se definir como fator de virulência as características, estruturais ou não, que conferem a um microrganismo certa patogenicidade sobre seu hospedeiro, permitindo a invasão, adesão e colonização deste, sendo a *E. coli* descrita na literatura como principal responsável por ocasionar um amplo espectro de patologias em animais e humanos. Geralmente essas patologias são ocasionadas pelos seus sorovares patogênicos ou patovares de *E. coli*: EIEC; VTEC; ETEC; EPEC; EHEC; EAEC ou EAggEC; NTEC; UPEC; DAEC (MAINIL, 2013; UMPIÉRREZ *et al.*, 2021).

Cada um dos sorovares de *E. coli* possui como característica principal a patologia que desenvolve em seus hospedeiros, os quais são responsáveis pela nomenclatura dessa patovar. Muitas vezes a nomenclatura pode estar relacionada ao principal mecanismo de virulência ou fator de virulência, como é o caso da VTEC (MAINIL, 2013; JOHNSON *et al.*, 2014). Os fatores de virulência em *E. coli* são divididos em três categorias distintas: adesinas e fatores de adesão; outras proteínas de membrana (OMP's) e exotoxinas. Alguns destes fatores são comuns entre os sorovares patogênicos como é o caso das fimbrias e adesinas que permitem a *E. coli* a adesão, formação de biofilme e colonização dos tecidos nos hospedeiros (MAINIL, 2013; SHAH *et al.*, 2019).

2.5.1. Adesinas e fatores de Adesão

Segundo Shruthi *et al.* (2012) e Mainil (2013), esses fatores estão diretamente relacionados a adesão e colonização de tecidos. Em grande parte, são construídos pelas fimbrias, a grande família de adesinas e outras proteínas de membranas. As fimbrias são estruturas em forma apêndices localizados por toda a distribuição da porção exterior das *E. coli*, as quais possuem como principal função a adesão, auxiliando na colonização dos tecidos, no processo de conjugação bacteriana e formação de biofilme. Essas estruturas foram primeiramente descritas em 1955 em análise por microscopia eletrônica, como sendo a principal responsável por aglutinação de eritrócitos em amostras de algumas cepas de *E. coli*. Essas estruturas foram descritas inicialmente como "*Pilus*" devido a sua morfologia ser semelhante ao pelo humano (MANIL, 2013).

São caracterizadas de acordo com a sua espessura e formação, constituindo 4 classes de fimbrias diferentes sendo elas: (i). As fimbrias rígidas com espessura de 5~7 nm com orifício central/axial; (ii) fimbrias flexíveis com espessura aproximada de 2~3 nm sem a presença do orifício central axial; (iii) fimbrias flexíveis moderadamente grossas com espessura de 4~6 nm e fimbrias altamente flexíveis e finas sem espessura descrita. Em geral esses flagelos na sua morfologia possuem diversas cópias de uma mesma proteína denominada de subunidade principal ou fimbrina. Algumas proteínas chamadas de proteínas menores estão presentes em suas estruturas podendo compor a base fimbrial auxiliando no processo de ancoragem com outras células ou o topo da estrutura como é o caso das Adesinas que atuam se ligando a estruturas da célula hospedeira, ocasionando uma ligação

entre moléculas que irá proporcionar a esse patógeno a adesão aos tecidos nos órgãos do hospedeiro (MAINIL, 2013).

Essas estruturas e moléculas, como é o caso da adesina, foi primeiramente descrita em amostras de bezerros e leitões contendo o patovar ETEC. Alguns autores demonstram a presença dessas estruturas em praticamente quase todos os patovares de *E. coli*. Essas fimbrias são organizadas pela Letra F e pelo número indo atualmente de F1 ~ F146. Algumas dessas adesinas podem não estar relacionadas as fimbrias, as quais são caracterizadas como pertencentes da grande família das adesinas dentre estas as principais são: Afa, Dr, M, Nfa, F1845 e AAF variantes (MAINIL, 2013; TORTORA *et al.*, 2016).

2.5.2. Outras Proteínas de Membrana (OPM's)

Esse grupo de fatores de virulência se assemelha as adesinas e fimbrias. Estão diretamente ligadas a adesão a células eucarióticas e bacterianas estando também diretamente relacionada a formação do biofilme. Neste grupo de fatores de virulência o mais estudado é o sistema de secreção tipo 3 (T3ss) que codifica para uma proteína chamada receptor translocado de intimina. Após sua adsorção na membrana dos eritrócitos essa proteína atua como receptor para adesina, estando diretamente relacionada com a adesão a essa célula. Esse é um dos principais fatores de virulência dos patovares EHEC e EPEC, as quais através desse sistema desenvolvem no seu hospedeiro AE lesões desregulando os filamentos de actina da célula infectada (MAINIL, 2013).

2.5.3. Exotoxinas

São proteínas secretadas por diversas classes de microrganismos e muitas vezes relacionadas a patologias desenvolvidas no hospedeiro. As primeiras exotoxinas bacterianas isoladas foram: toxina da difteria em 1988 por Roux e Yersin; toxina tetânica em 1890 por Faber e toxina botulínica em 1898 por Van Emergen. Várias exotoxinas foram citadas em diversos trabalhos como as principais responsáveis por mecanismos de virulência em algumas patologias de origem bacteriana (MAINIL; DAUBE, 2005; MAINIL, 2013).

Quanto a sua caracterização, as exotoxinas são descritas na literatura como constituintes de três classes distintas, de acordo com suas características estruturais

e funcionais. São elas: (i) toxinas oligopeptídicas que atuam diretamente sobre as cascatas de comunicação celular através de seus receptores de membrana, interferindo diretamente no metabolismo de células eucarióticas; (ii) AB toxinas que interferem diretamente na morfologia das células eucarióticas, podendo atuar na modulação do metabolismo celular eucariótico ativando receptores mediados da endocitose; (iii) Enzimática e RTX citolisinas formadoras de poros, que atuam diretamente na membrana da célula eucariótica através da formação de poros (MAINIL, 2013).

Em patovares de *E. coli* algumas exotoxinas são descritas como sendo os principais mecanismos de virulência responsáveis pela patologia causada, dentre essas as mais importantes são as Verotoxinas (VTS)/shigatoxinas (STS); a α -hemolisina; o fator de necrose citotóxico (CNF) e a gelatinase (MAINIL, 2013; SHAH *et al.*, 2019). Assim:

- (i) Verotoxinas (VTS)/Shigatoxinas (STS): pertencem ao grupo das AB toxinas e causam lesões no epitélio renal do hospedeiro através do bloqueio da produção de proteínas das células renais. Conseguem ultrapassar o epitélio intestinal e através de ligações com seus receptores em eritrócitos se deslocam e, posteriormente, ligam-se aos seus receptores mais específicos nas células do epitélio renal (KARMALI *et al.*, 2010; BREUM; BOEL, 2010; MAINIL, 2013; JOHNSON *et al.*, 2014);
- (ii) A- hemolisina (HlyA): pertencente a classe das RTX exotoxinas citolíticas, agem nas hemácias através da formação de poros em sua membrana e na patologia de diversos sorovares patogênicos de *E. Coli*, como é o caso das EHEC, ETEC, NTEC e UPEC. Causa casos graves de septicemia, infecções extra intestinais e até meningites (MAINIL, 2013);
- (iii) Fator de necrose citotóxico (CNF): pertencente ao grupo das AB exotoxinas, altera o metabolismo da célula eucariótica fazendo com que ela ative seus mecanismos de divisão celular, causando multinucleação celular. Também ativa a necrose dos tecidos infectados pelo sorovar patogênico de *E. coli*. Segundo visto por alguns autores, essa exotoxina possui duas versões: CNF1 e CNF2 o que também subdivide as cepas de *E. coli* que a possuem em duas categorias NTEC1 e NTEC2, que são próximas uma da outra morfológica e geneticamente. São comumente encontradas em cepas do sorovar patogênico NTEC a qual possui como principal fator de virulência essa

exotoxina dando nome ao mesmo. Alguns trabalhos demonstram a presença de CNF em outros sorovares patogênicos de *E. coli* (MAINIL, 2013; TIBO *et al.*, 2016; UMPIÉRREZ *et al.*, 2021);

- (iv) Gelatinase: está diretamente relacionada ao grupo de fatores enzimáticos RTX citolisinas, sendo uma enzima pertencente ao grupo das metalo enzimas. Atua na degradação de um grande grupo de componentes biológicos importantes como proteínas, colágeno, caseína e hemoglobina. É descrita como um fator de virulência importante em patovares de *E. coli* que degradam tecidos causando lesões graves. Alguns trabalhos relacionam a presença desta enzima em sorovares uropatogênicos de *E. coli* (SHRUTHI *et al.*, 2012; MAINIL, 2013; NIYAS; GOPINATH, 2018; SHAH *et al.*, 2019).

Portanto, a caracterização os fatores de virulência e resistência em cepas multirresistentes de *Escherchia coli* é de grade importância tanto para o entendimento dos padrões de infecções ocasionadas por estas assim como, permite o desenvolvimento e escolha de estratégias mais eficientes para o controle e combate desse microrganismo. Também contribuindo diretamente na busca de novos antimicrobianos que combatam os mesmos, tanto no âmbito hospitalar quanto no combate ao processo infeccioso durante a terapêutica clínica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolados bacterianos

Foram utilizados 44 isolados de *E. coli* oriundos de pacientes com infecção hospitalar e cedidos gentilmente pela bacterioteca do Hospital Universitário da Universidade Federal do Vale do São Francisco (HU-UNIVASF) e mantidos em freezer a -80 °C. Estes isolados foram previamente caracterizados quanto ao perfil morfológico, bioquímico e de resistência aos antimicrobianos com o auxílio do sistema automatizado BD Phoenix™ 100. Duas cepas padrão de *E. coli* foram também utilizadas neste estudo (ATCC 25922 e ATCC 2452).

3.2. Avaliação da Resistência aos Antibióticos (Antibiograma)

Para que fosse possível um entendimento dos padrões de resistência e sensibilidade aos antibióticos foi realizada uma nova rodada de antibiograma com a finalidade de aumentar o número das classes e de antibióticos testados (CLSI, 2019). Assim, foram selecionados os antibióticos: Azitromicina 15µg; Ceftazidima 30µg; Ciprofloxacina 5µg; Nitrofurantoina 300µg e Ofloxacina 5µg. Para tanto, um inóculo de cada isolado foi ressuspendido em solução salina 0,85% até atingir o ponto 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ unidade formadora de colônia-UFC/mL). Após isso, foram plaqueados em meio Muler-Hinton (MH) contendo 2% de agarose, com o auxílio de um swab descartável estéril embebido na solução salina contendo o inóculo, adicionados aos discos dos antibióticos e incubados a 37°C por 24h para medição dos halos e caracterização dos resultados de acordo com os valores estabelecidos pelo CLSI (2019).

O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) foi estabelecido conforme proposto por Krumperman (1983). Este método consiste em se avaliar a razão entre o número de antimicrobianos a que o isolado apresenta resistência dividido pelo número de antimicrobianos testados ($IRMA = \frac{N^{\circ} \text{ antimicrobianos resistente}}{N^{\circ} \text{ de antimicrobianos testados}}$). Isolados com valor de $IRMA > 0,2$ foram

caracterizados como sendo de alta periculosidade de contaminação e aqueles com IRMA < 0,2 como sendo de baixa periculosidade de contaminação.

3.3. Avaliação da virulência dos isolados

3.3.1. α -Hemolisina

A detecção da α -Hemolisina foi feita através da metodologia descrita por Raksha *et al.* (2003), onde as colônias bacterianas foram adicionadas em um tubo contendo 5 mL de solução salina estéril para cada bactéria isolada e turvadas na escala de 0,5 Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia – UFC / mL). Após isso o conteúdo de cada tubo será inoculado pelo método de estria em placas contendo meio ágar sangue ovino 5%, como o auxílio de swab estéril. A presença da hemolisina é obtida através da visualização em placa da hemólise total ou parcial do meio.

3.3.2. Teste de Hidrolise de Gelatina

A identificação da produção da gelatinase foi feita utilizando-se tubos de ensaio contendo 3 ml de meio de cultura enriquecido com gelatina. Os isolados foram inoculados após 24h de crescimento em placa, com o auxílio de um fio bacteriológico e incubados em temperatura de 37 °C por até sete dias. Como controle positivo utilizou-se uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e um tubo sem inoculação como controle negativo (MacFADIN, 2000). Os resultados foram observados após 24h, 48h, 72h e 144h de crescimento como o intuito de detectar a hidrolise do meio.

3.4. Análise da Presença da Bomba de Efluxo

Através do método proposto por Bjorland *et al.* (2005) foi possível avaliar a presença da bomba de efluxo nos isolados de *E. coli* após 24h de inoculação. A

análise da bomba de efluxo é caracterizada através do acúmulo intracelular do Brometo de Etídio (EtBr), o qual quando presente confere à colônia bacteriana uma cor avermelhada sob a incidência da luz UV. Assim, os isolados foram plaqueados em meio Muller-Hinton ágar (MH-ágar) contendo EtBr (0.5 µg/mL) por 24 horas a 37 °C. Após isso, os resultados foram obtidos através da análise de fluorescência sob luz UV com o auxílio de trans iluminador Accuris E3000uv, onde na presença de bomba de efluxo a colônia bacteriana não apresentaria fluorescência.

3.5. Detecção de β-lactamases de espectro estendido

3.5.1. Triagem de isolados produtores de β-lactamases

Para o teste de detecção de β-lactamases foi feito uma triagem previa dos isolados de acordo com o protocolo estabelecido pelo CLSI (2019). Um inóculo pesado dos isolados foi ressuscitado em solução salina 0,85% até atingir o ponto 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia – UFC / mL), após isso foram plaqueados em meio Muler-Hinton (MH) contendo 2% de agarose, com o auxílio de um swab descartável estéril embebido na solução salina contendo o inluo e adicionados os discos dos antibióticos: Aztreonam 30µ; Ceftazidima 30µg; Cefotaxima 30µg e Ceftriaxona 30µg.

As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Após isso, foi feita a medida dos alos dos antibióticos e a classificação como: Sensível; Intermediário e Resistente de acordo com valores pré-estabelecidos pelo CLSI (2019). Com a análise dos resultados, os isolados que apresentaram o padrão de resistência aos antibióticos testados foram selecionados como potenciais produtores de β-lactamases.

3.5.2. Detecção de β-lactamases de espectro estendido por disco aproximação

Os isolados selecionados após a triagem foram novamente testados de acordo com o protocolo estabelecido pelo CLSI (2019). Um inóculo pesado desses isolados foi ressuscitado em solução salina 0,85% até atingir a escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia – UFC / mL) e plaqueados em meio MH agar com o auxílio de um swab estéril e adicionados os discos dos

antibióticos: Amoxicilina + ac. Clavulânico 30µg; Aztreonam 30µ; Ceftazidima 30µg; Cefotaxima 30µg e Ceftriaxona 30µg.

Todos os discos foram dispostos a uma distância de 20 mm entre si, para que fosse possível a visualização da intersecção dos alos, conhecido como “zona fantasma”, o que caracterizou o isolado como positivo para a produção de β-lactamases.

3.6. Formação de Biofilme

A análise da capacidade de formação de biofilme foi feita através do método ágar vermelho congo estabelecido por Freeman, Falkiner e Keane *et al.* (1989). Foi adicionado ao meio Brain Heart infusion (BHI) 37g/L, sacarose 50g/L, ágar bacteriológico 10g/L e o corante vermelho congo 0,8g/L. Para preparação do meio foi feita a separação e ressuspensão do corante em água destilada, 10% descontado do volume desta que seria utilizada na preparação do meio BHI, autoclavado separadamente.

Após atingir a temperatura de 55°C o corante vermelho congo foi unido ao meio BHI enriquecido com sucrose em fluxo laminar e foi realizada a montagem das placas para o teste, no mesmo dia. Foi utilizado um inóculo de cada isolado para o plaqueamento em meio ágar vermelho congo e incubado a 37 °C por 24h para a leitura dos resultados.

3.7. Análise dos Dados

Os dados foram tabulados no Excel (Microsoft 365®). Os resultados foram analisados utilizando-se de análise descritiva com porcentagem simples.

4. RESULTADOS

4.1. Resistência aos antimicrobianos

Os antimicrobianos foram classificados como sensível; resistente e intermediário (CLSI, 2019) conforme o Quadro 1. Houve alto índice de resistência a antibióticos das classes das *Penicilinas* (Ampicilina- 86,4%); *Quinolonas* (Ciprofloxacino- 49%); *Cefalosporinas* (Cefepima 47,7%); *Sulfonamidas* (Trimetopim+ Sulfametoxazol- 47,7%) e *Fluroquinolonas de 3ª geração* (Levofloxacina- 34,1% e Ofloxacina 42%).

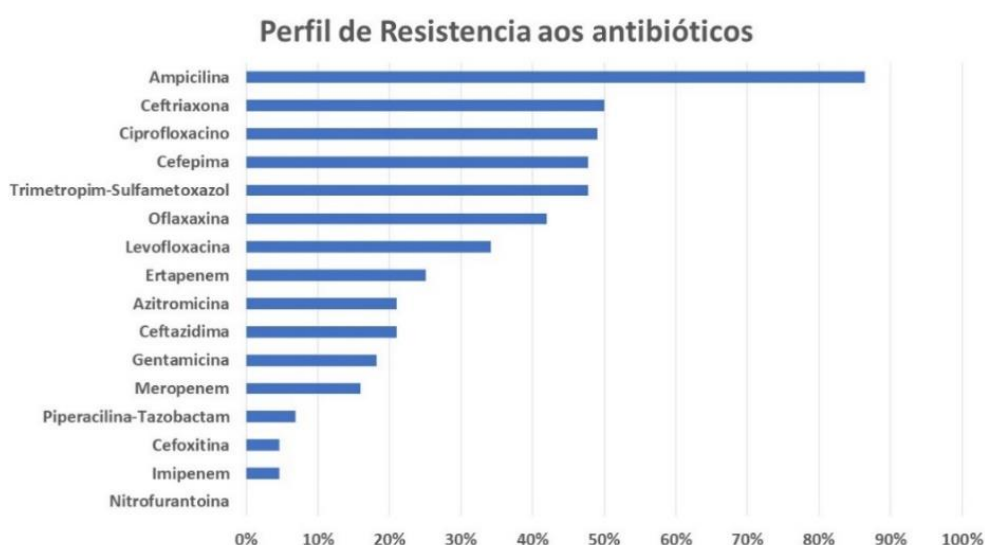
Quadro 1: Índice de resistência dos isolados de *E coli* aos antimicrobianos, divididos segundo a classe medicamentosa.

Classes dos Antimicrobianos	Sensível	Intermediario	Resistente
Aminoglicosídeo	-	-	-
<i>Gentamicina</i>	(36) 81.8%	(0) 0%	(8) 18.2%
Carbapenemicos	-	-	-
<i>Ertapenem</i>	(33) 75%	(0) 0%	(11) 25%
<i>Imipenem</i>	(42) 95.5%	(0) 0%	(2) 4.5%
<i>Meropenem</i>	(37) 84.1%	(0) 0%	(7) 15.9%
Cefalosporina	-	-	-
<i>Ceftriaxona</i>	(22) 50%	(0) 0%	(22) 50%
<i>Cefepima</i>	(23) 52,3%	(0) 0%	(22) 47.7%
<i>Ceftazidima</i>	(27) 63%	(7) 16%	(9) 21.0%
Cefamicina	-	-	-
<i>cefexitina</i>	(42) 95%	(0) 0%	(2) 5%
Fluroquinolona 3º geração	-	-	-
<i>Levofloxacina</i>	(29) 65.59%	(0) 0%	(15) 34,1%
<i>Ofloxacina</i>	(24) 56%	(1) 2%	(18) 42%
Macrolídeos	-	-	-
<i>Azitromicina</i>	(34) 79%	(0) 0%	(9) 21%
Nitrofunos	-	-	-
<i>Nitrofurantoina</i>	(42) 95%	(2) 5%	(0) 0%
Penicilina	-	-	-
<i>Ampicilina</i>	(6) 13.6%	(0) 0%	(38) 86,4%
<i>Peraciclina+ Tazobactan</i>	(39) 88.6%	(2) 4.6%	(3) 6.8%
Quinolonas	-	-	-
<i>Ciprofloxacino</i>	(21) 49%	(1) 2%	(22) 49%
Sulfonamidas	-	-	-
<i>Trimetopim+ sulfometoxazol</i>	(21) 49.3%	(0) 0 %	(21) 47.7%

Fonte: Oliveira (2022)

Dentre os antimicrobianos testados, a Ampicilina (87%; N= 38/44), pertencente a classe das penicilinas, e a Ceftriaxona (50%, N= 22/44), pertencente a classe das cefalosporinas, foram os que apresentaram maior índice de resistência. Por outro lado, Nitrofurantoina (0%; N= 0/44), Imipenem (5%; N= 2,5/44) e a Cefoxitina (5%; N= 2,5/44) apresentaram o menor índice de resistência. A Nitrofurantoina apresentou índice de sensibilidade de 95% (N= 42/44) e índice intermediário de 5% (N= 2/44) (Figura 2).

Figura 2: Percentual de resistência dos 44 isolados de *E. coli*.

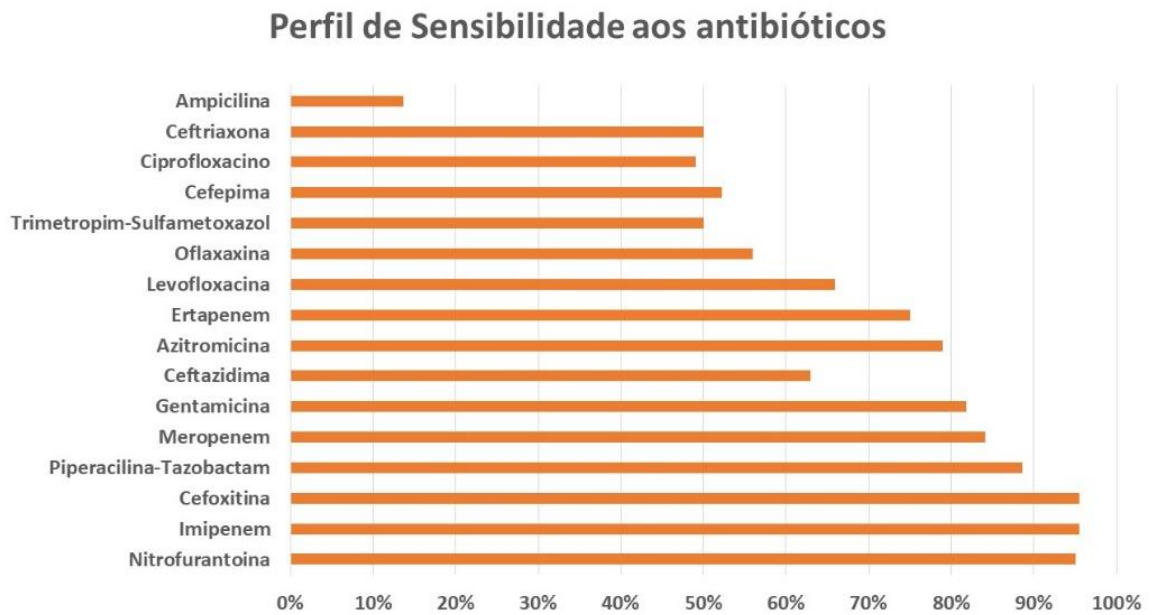


Fonte: Oliveira (2022)

Quanto a sensibilidade dos isolados, houve alto índice de sensibilidade para os antibióticos das classes dos Nitrofuranos, Aminoglicosídeos e Carbapenêmicos. Assim, 95% (N= 42/44) apresentaram sensibilidade ao Imipenem e 84% (N= 37/44) ao Meropenem, seguidos pelo Ertapenem (75%, N= 22/44), também pertencente a classe dos nitrofuranos. Este achado demonstrou que os Nitrofuranos foram a classe de antimicrobianos mais eficiente contra estes isolados (Figura 3).

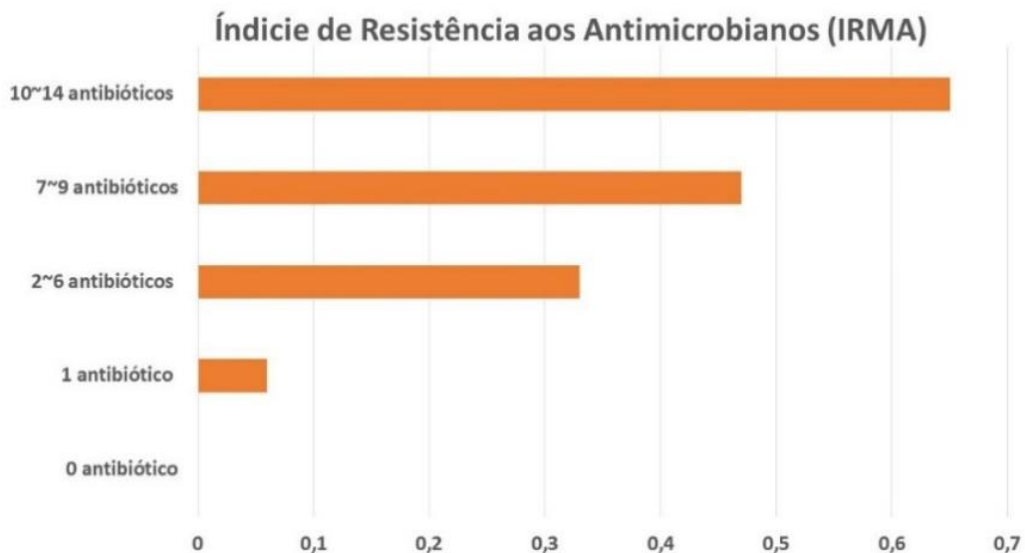
Dos 44 isolados utilizados no presente estudo, 66% (N= 29/44) apresentaram IRMA > 0,2. Para uma melhor visualização dos resultados obtidos, os valores de IRMA foram agrupados de acordo com o número de antibióticos aos quais os isolados foram testados como resistentes: 0 antibióticos (3 isolados); 1 antibiótico (2 isolados); 2~6 antibióticos (20 isolados); 7~9 antibióticos (8 isolados); 10~14 antibióticos (11 isolados) (Figura 4).

Figura 3: Perfil de sensibilidade dos isolados de *E coli* frente aos antimicrobianos



Fonte: Oliveira (2022)

Figura 4: Índice de Resistência aos Antimicrobianos (IRMA) dos isolados de *E coli*. Onde: 0 antibióticos (N= 3 isolados); 1 antibiótico (N= 2 isolados); 2~6 antibióticos (N= 20 isolados); 7~9 antibióticos (N= 8 isolados); 10~14 antibióticos (N= 11 isolados).

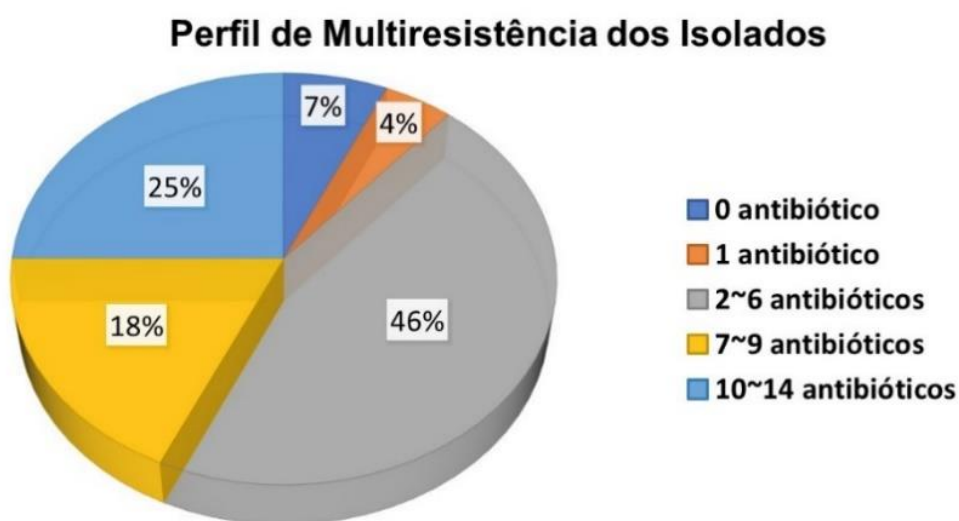


Fonte: Oliveira (2022)

Os isolados foram agregados em três grupos de multirresistência, onde 46% (N= 20/44) foram resistentes a 2~6 antibióticos; 18% (N= 8/44) a 7~9 antibióticos e

25% (N= 11/44) a 10~14 antibióticos (Figura 5). Além destes, foram visualizados isolados, caracterizados como não multirresistentes, os quais não apresentaram resistência a nenhum dos antibióticos (7%, N= 3/44) ou que foram resistentes a apenas 1 antibiótico testado (4%, N= 2/44).

Figura 5: Perfil de multirresistência dos isolados de *E coli* agrupados em quantidade de antibióticos aos quais apresentaram resistência.



Fonte: Oliveira (2022)

Para uma melhor visualização dos perfis de resistência dos isolados aos antimicrobianos de acordo com a classes dos antibióticos testados foi construído o Quadro 2. Os resultados indicaram uma maior incidência de três perfis: CARBA, CEFALO, PEN, PEN+IBL, SULFO (N= 2/44); (AMINO, CEFALO, FLURO, PEN, PEN+IBL, QUINO, SULFO) (N= 2/44) e (CEFALO, FLURO, PEN, PEN+IBL, QUINO, SULFO) (N= 3/44).

Quadro 2: Perfil de resistência dos isolados de *E. coli* de acordo com as classes dos antibióticos testados (Aminoglicosídeo (AMINO); Carbapenêmicos (CARBA); Cefalosporina (CEFALO); Cefamicinas (CEFA); Fluroquinolona 3ª geração (FLURO); Macrolídeos (MACRO); Nitrofurans (NITRO); Pencilinas (PEN); Penicilinas + Inibidor de Betalactamases (PEN+IBL); Quinolonas (QUINO); Sulfonamidas (SULFO)).

Isolado	AMINO	CARBA	CEFALO	CEFA	FLURO	MACRO	NITRO	PEN	PEN+IBL	QUINO	SULFO
157	-	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1
159	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-
160	1	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-
172	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
176	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
178	1	1	1	-	1	-	-	1	1	1	-
179	-	-	-	-	1	1	-	1	-	1	1
181	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-
182	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-
189	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	1
194	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-
195	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
244	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	1
245	-	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1
246	1	-	1	-	1	-	-	1	1	1	1
247	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
248	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
253	-	-	1	-	1	-	-	1	1	1	1
256	-	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-
264	-	-	1	-	1	1	-	1	1	1	1
265	-	-	1	-	1	-	-	1	1	1	1
275	-	-	1	-	-	-	-	1	1	-	-
277	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-

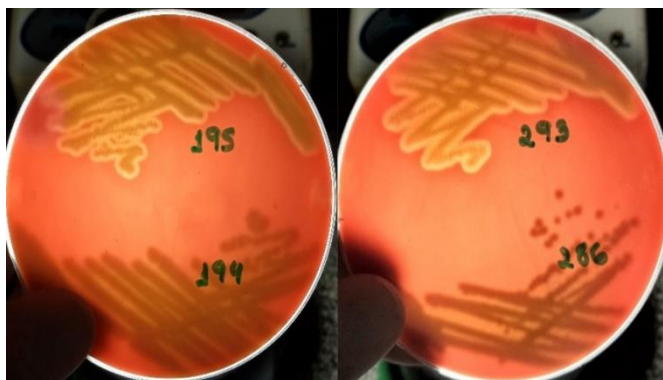
278	-	-	1	-	1	-	-	1	1	1	1
281	-	-	1	1	-	-	-	1	1	-	-
286	-	-	1	-	1	-	-	1	1	-	-
292	1	-	-	-	1	1	-	1	-	1	1
293	-	-	1	-	-	-	-	1	1	-	-
294	-	-	1	-	1	-	-	1	1	1	-
295	-	1	1	-	1	1	-	1	1	1	-
296	-	-	1	-	1	-	-	1	1	1	1
300	-	-	1	-	1	1	-	1	1	1	1
302	-	1	-	-	-	1	-	1	1	1	1
303	1	-	1	-	1	-	-	1	1	1	1
304	1	-	1	-	1	-	-	1	1	1	-
306	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
308	-	1	1	-	-	-	-	1	1	-	1
312	1	1	1	1	-	-	-	1	1	-	-
315	-	1	1	-	-	-	-	1	1	-	1
318	-	1	1	-	-	-	-	1	-	1	-
325	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
327	1	1	1	-	1	-	-	1	1	1	-
329	-	1	-	-	-	-	-	1	1	-	1
330	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1

4.2. Fatores de Virulência dos isolados

4.2.1. α -Hemolisina

Dos isolados testados 18% (N= 8/44) apresentaram padrão positivo para produção de α -hemolisina, ocasionando uma hemólise parcial do meio, como exibido na Figura 6.

Figura 6: Produção de α -hemolisina pelos isolados de *E. coli*. Onde: Cepas 195 e 293 são produtoras de α -hemolisina e as cepas 194 e 286 são não produtoras de α -hemolisina.

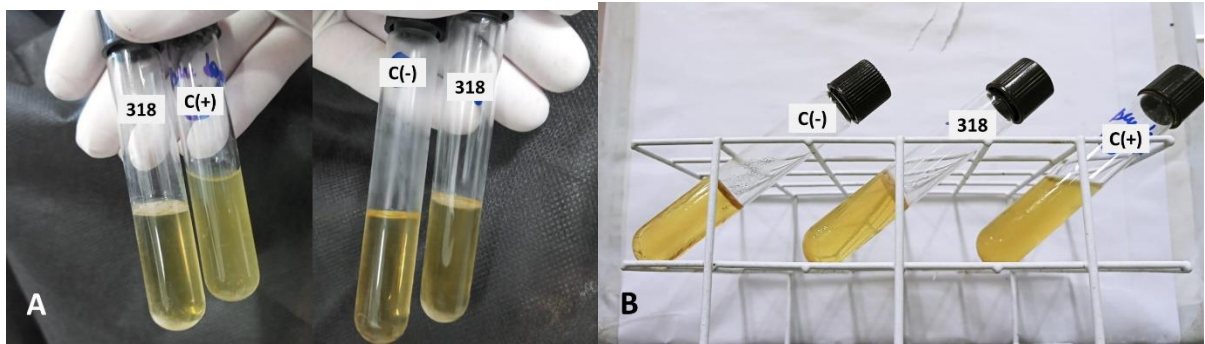


Fonte: Oliveira (2022). *Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal (CCA/UNIVASF)*.

4.2.2. Teste de Hidrólise da Gelatina

Nenhum dos isolados promoveu hidrólise da gelatina, quando comparados ao controle positivo inoculado com *P. aeruginosa* (Figura 7).

Figura 7: Leitura do teste de hidrólise da gelatina com 24h (A) e 144h (B). Onde: 318: isolado de *E coli*; C(-): controle negativo e C(+): controle positivo inoculado com *P. aeruginosa*.



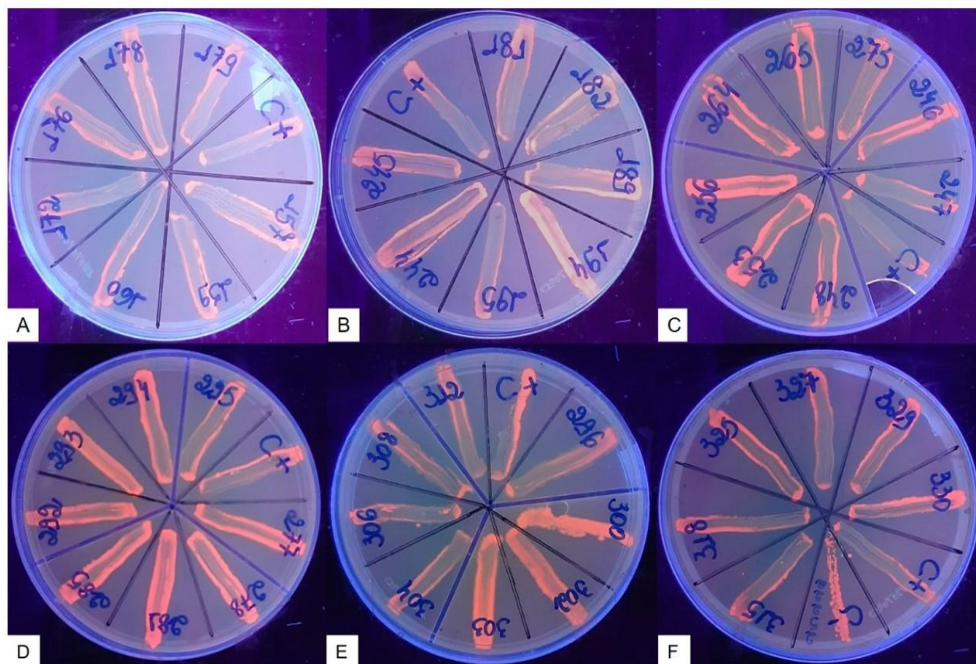
Fonte: Oliveira (2022).

4.3. Fatores de Resistência dos isolados

4.3.1. Análise da Bomba de Efluxo

Os resultados da análise da bomba de efluxo foram analisados a partir da Figura 8. Comparando-se os isolados de *E. coli* com os controles positivos (C+) e negativo (C-) pôde-se classificá-los em positivos ou negativos para expressão de bomba de efluxo. Assim, 86% (N= 38/44) dos isolados apresentaram um perfil semelhante ao C+ e foram classificados como positivos para a expressão do sistema bomba de efluxo. Por outro lado, 14% (N= 6/44) apresentaram perfil semelhante ao C- e foram classificados como negativos para a expressão do sistema bomba de efluxo.

Figura 8: Análise da presença de bomba de efluxo. As placas A, B, C, D, E e F foram divididas em oito regiões, onde foi plaqueado o isolado de *E. coli*; C+: controle positivo e C-: controle negativo.

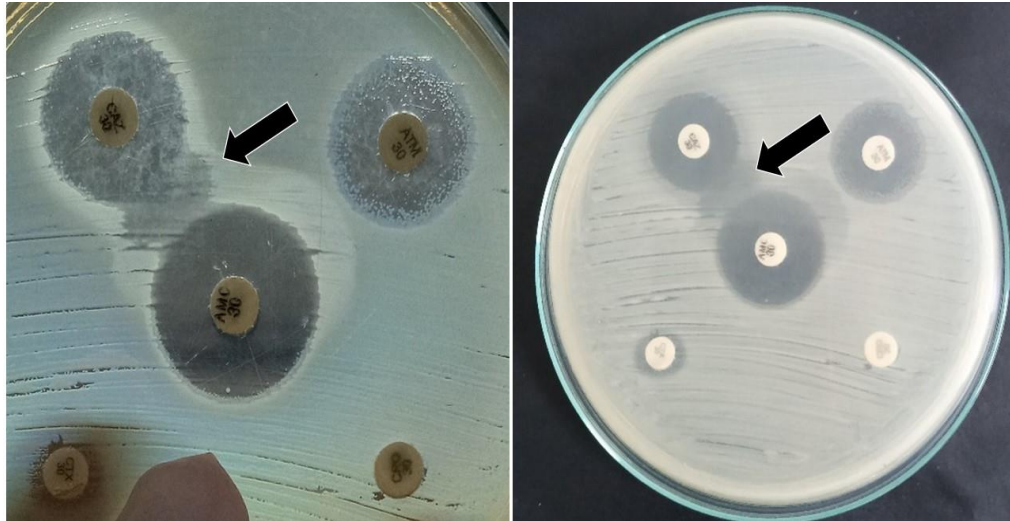


Fonte: Oliveira (2022).

4.3.2. Detecção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

Através da triagem dos isolados foi possível identificar 46% (N= 20/44) deles apresentando resistência aos antibióticos testados, podendo indicar uma possível produção de β -Lactamases. Na sequência, a detecção da produção de ESBL indicou a formação da “zona fantasma” (Figura 9) que caracterizou sua produção em 18% (N= 8/44) dos isolados.

Figura 9: Detecção de β -lactamases de espectro estendido pelo método de disco aproximação. Nota-se a formação da “Zona Fantasma” (seta) entre os alos caracterizando a amostra como positiva para produção de β -lactamase.

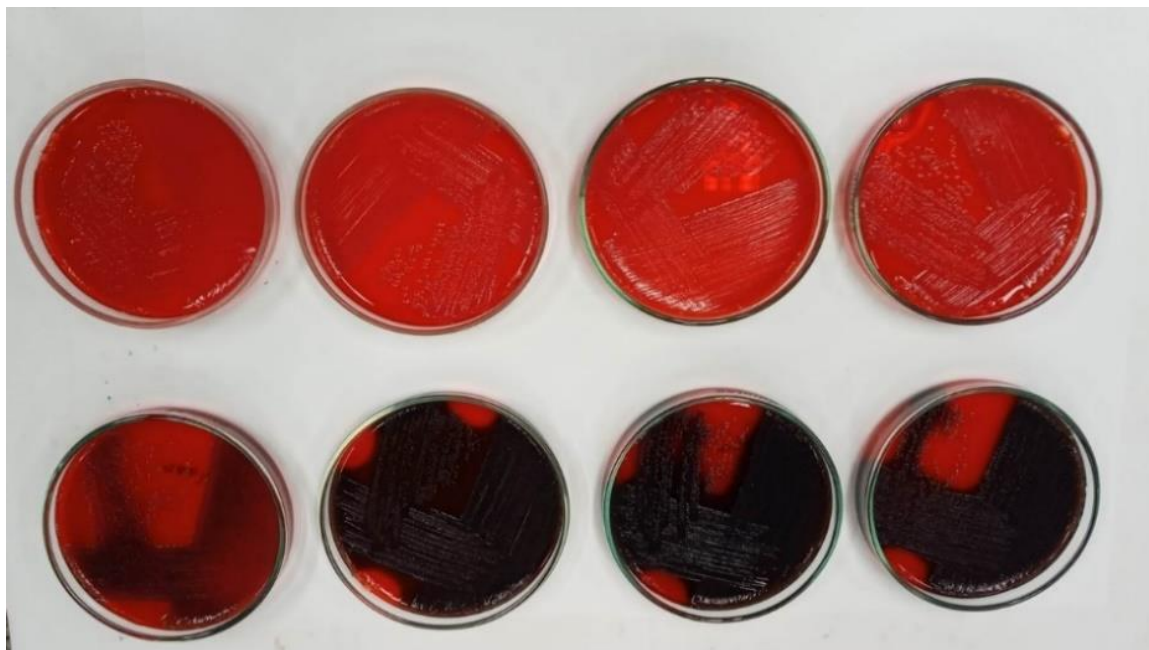


Fonte: Oliveira (2022).

4.3.3. Produção de Biofilme

A produção de biofilme foi confirmada pela visualização do escurecimento do meio (Figura 10). Assim, 46% (N= 20/44) dos isolados testaram positivo para formação de biofilme. Isolados com padrão de coloração em tons de rosa e sem escurecimento do meio (54%, N= 24/44) foram classificados como não produtores de biofilme. A cepa padrão ATCC 25922 foi utilizada como controle positivo.

Figura 10: Isolados positivos (com escurecimento do meio) e isolados negativos (sem escurecimento do meio) para produção de biofilme.



Fonte: Oliveira (2022).

Através do agrupamento e análise dos dados obtidos, foi possível caracterizar os isolados quanto a seus mecanismos de virulência (α -hemolisina e Gelatinase), resistência aos antimicrobianos (IRMA, Bomba de Efluxo, Formação de Biofilme e β -lactamases) e periculosidade de contaminação. Essa caracterização pode ser mais bem visualizada no Quadro 3.

Quadro 3: Agrupamento dos dados obtidos quanto aos fatores de virulência e mecanismos de resistência. Nº A.R: Número de Antibióticos Resistentes; Nº C.A.R: Número de Classes de Antibióticos Resistentes; IRMA: Índice de Resistencia Múltipla aos Antimicrobianos.

E. coli	Nº A.R	Nº C.A.R	IRMA	Bomba de Efluxo	Biofilme	β -Lactamase	Gelatinase	α -hemolisina
157	5	4	0.25	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
159	2	2	0.1	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
160	6	6	0.3	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
172	1	1	0.05	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
176	1	1	0.06	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
178	12	7	0.63	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
179	5	5	0.25	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
181	3	3	0.17	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
182	3	2	0.15	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
189	3	3	0.15	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
194	2	2	0.11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
195	2	2	0.11	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
244	3	3	0.15	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
245	6	5	0.30	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
246	11	7	0.52	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
247	2	2	0.10	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
248	0	0	0.00	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
253	7	5	0.35	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
256	8	5	0.40	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
264	10	7	0.53	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
265	10	6	0.50	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
275	6	2	0.32	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
277	2	2	0.11	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
278	9	6	0.47	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
281	6	4	0.30	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
286	7	5	0.44	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
292	6	6	0.32	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
293	6	3	0.32	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
294	8	6	0.40	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
295	12	7	0.63	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
296	11	6	0.58	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
300	10	8	0.50	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
302	7	7	0.35	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
303	9	6	0.45	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
304	11	7	0.58	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
306	0	0	0.00	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
308	11	5	0.58	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
312	13	6	0.65	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
315	6	3	0.33	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
318	7	4	0.39	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
325	0	0	0.00	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
327	11	7	0.58	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
329	5	4	0.25	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
330	3	3	0.15	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

5. DISCUSSÃO

E.coli é a bactéria comensal mais comum nos seres humanos, podendo também se apresentar sob forma patogênica e causar infecções intestinais e/ou extra intestinais (CAMÉLÉNA *et al.* 2019). Cepas de *E. coli* resistentes a antimicrobianos são um problema de grande impacto na prática clínica (CHRISTAKI *et al.* 2019), sendo a resistência múltipla a antibióticos (AMR) uma das maiores ameaças a saúde pública (BALBI *et al.*, 2020). Por isto, patógenos da família das Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos são classificados como “prioridade 1 crítica” (WHO, 2017). O uso indiscriminado dos antimicrobianos, não só pela população em geral como pela prática clínica tem influenciado diretamente no aumento dos índices dos perfis de resistência aos antimicrobianos (SHING, *et al.*, 2017).

Os isolados apresentaram alto índice de resistência aos antimicrobianos das classes das penicilinas (Ampicilina= 87%) e cefalosporinas (Ceftriaxona= 50%), antibióticos β -lactâmicos comumente utilizados na terapêutica clínica convencional como primeira opção de tratamento contra infecções bacterianas (SINGH *et al.* 2017). Portanto, os achados deste estudo reforçaram a importância da caracterização dos perfis de resistência das cepas isoladas para o sucesso do tratamento de infecções hospitalares assim como a sua disseminação no âmbito hospitalar.

Padrões superiores de resistência foram observados por Santos *et al.* (2014), onde 95% dos isolados apresentaram resistência a ampicilina e 65% à ceftriaxona. Por outro lado, os valores deste estudo foram superiores aos encontrados por Shah *et al.* (2019) em amostras de pacientes que desenvolveram quadros de infecções urinárias na Índia, foi possível observar que 51% dos isolados apresentaram resistência a ampicilina e 40% à ceftriaxona e em Silva Souza *et al.* (2020) foi possível observar, em amostras derivadas de infecções nasais em indivíduos assintomáticos para infecções nasais, onde pode-se observar que 66,7% apresentaram resistência a ampicilina e 33,3% a ceftriaxona, respectivamente. Por sua vez Vinodhkumar *et al.* (2021) observaram 60% de resistência a ceftazidima, 55,6% à ceftriaxona e 51,1% à ciprofloxacina em isolados oriundos de infecções em

animais resgatados na Índia. Evidenciado uma alta presença de cepas multirresistentes não só em humanos assintomáticos como também em animais de pequeno e grande porte.

Os isolados de *E. coli* também apresentaram alto índice de resistência aos antibióticos da classe das Quinolonas, comumente utilizados no tratamento de infecções mais severas (WHO, 2017). Os resultados de resistência podem ser também corroborados através de achados por (RODRIGUES; BERTOLDI, 2019) onde foi possível determinar as principais classes de antimicrobianos utilizados na terapêutica clínica (Cefalosporinas, Penicilinas e Fluroquinolonas) o que pode reforçar ainda mais os achados encontrados quanto aos perfis de resistência aos antimicrobianos. Implicando diretamente com o presente estudo, uma vez que se podem perceber altos índices de resistência aos antibióticos os quais são citados por (RODRIGUES; BERTOLDI, 2019) como sendo as opções mais utilizadas na terapêutica clínica hospitalar convencional, estudo esse que foi realizado em uma rede de hospitais particulares no estado de São Paulo entre março de 2006 a junho de 2016.

Também foi observado um alto índice de resistência ao Trimetropim+Sulfametoxazol (49%), antimicrobiano da classe das Sulfonamidas e de alta importância clínica por ser utilizado tanto em humanos como em animais (WHO, 2017). Costa *et al.* (2006) observou 73,58% dos isolados resistentes ao Trimetropim+Sulfametoxazol e Silva Souza *et al.* (2020) 66,7% dos isolados.

Assim, através da análise da resistência foi possível classificar os isolados quanto ao risco de contaminação através da determinação dos valores de IRMA, sendo 89% (N= 39/44) de alto risco de contaminação, com valor máximo de IRMA de 0,65. Resultados semelhantes foram visualizados Silva Souza *et al.* (2020; IRMA= 0,66); Santos *et al.* (2014; IRMA= 0,61) em indivíduos assintomáticos para doenças respiratórias no estado de São Paulo e Costa *et al.* (2006; IRMA= 0,69) Isolados oriundos de criatórios suínos no sul do país.

A α -hemolisina é um dos fatores de virulência mais comuns em isolados patogênicos de *E. coli*. Trata-se de uma enzima proteica tóxica extracelular produzida, que permite ao microrganismo colonizar e persistir em alguns tecidos do hospedeiro, como o trato urinário (SHAH *et al.*, 2019). O perfil de hemólise parcial (18%) evidenciado neste estudo foi inferior aos 47,4% observados por Mittal *et al.* (2014); 32,3% de Shah *et al.* (2019) e 100% de Niyas e Gopinath (2018). Entretanto,

os estudos citados acima, apenas utilizaram cepas uropatogênicas de *E. coli*, diferente do presente estudo que utilizou uma amostragem geral de isolados patogênicos.

A gelatinase, um outro fator de virulência, é uma protease da classe das metallo-proteinases que confere ao microrganismo a capacidade de hidrólise de matrizes proteicas, atuando diretamente como um fator de virulência importante, pois permite colonização do hospedeiro (NIYAS; GOPINATH, 2018). No presente trabalho, nenhum dos isolados apresentou padrão positivo para produção de gelatinase corroborando com a literatura (NIYAS; GOPINATH, 2018; SHAH *et al.*, 2019). Entretanto, alguns autores, como ZHAO (2020). Evidenciam uma detecção de genes responsáveis pela expressão de Gelatinase mesmo em cepas não produtoras do fenótipo positivo para tal característica. Reforçando que esta característica pode ser melhor visualizada através de testes genéticos como a técnica de PCR.

A bomba de efluxo confere ao microrganismo a capacidade de exportar para o meio extracelular componentes tóxicos para a célula, que atuariam como antimicrobiano, sendo caracterizado como um sistema multidroga ou droga específica que produz resistência bacteriana a determinados antimicrobianos Reuter *et al.* (2020). Neste estudo 86% dos isolados, oriundos de quadros de infecções hospitalares na França, foram positivos para este sistema, dos quais 89% eram multirresistentes aos antimicrobianos. Resultados semelhantes foram descritos por Moreira *et al.* (2008) que observaram 100% dos isolados, oriundos de amostras de leite mastítico em Viçosa-MG, expressando o sistema bomba de efluxo e de Cheteri *et al.* (2019) onde 88,6% de expressão em Isolados multirresistentes de *Escherichia coli* na Índia. Evidenciando a presença deste fenômeno em altas taxas não só em amostras isoladas no Brasil como em outra população heterogênea.

Outro mecanismo importante para o entendimento da resistência aos antimicrobianos tanto em microrganismos gram-negativos quanto nos gram-positivos são as enzimas β -Lactamases (AMBLER, 1980), que são os mecanismos mais comuns de resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (LIVERMORE, 1995). Nos microrganismos Gram-negativos, a produção de β -lactamases é o único maior contribuinte para a resistência aos β -lactâmicos, incluindo a resistência às oximiino-cefalosporinas e carbapenêmicos (LIVERMORE, 2009). No presente estudo 18% (N=8/44) dos isolados foram produtores de β -

lactamases, valor inferior ao visto por El-Azziz *et al.* (2021) que evidenciaram alta incidência (83,75%) e superior ao de Denisuik *et al.* (2013), que observaram 10,5% de isolados produtores de β -Lactamases. Através deste resultado foi possível observar uma baixa incidência desse mecanismo de resistência, o que pode de certa forma evidenciar que os antibióticos das classes dos betalactamicos ainda podem ser efetivos, quando utilizados para o tratamento de infecções ocasionadas por estes microrganismos no vale do São Francisco.

A produção de biofilme é um mecanismo que contribui diretamente com a patogenicidade do microrganismo, pois permite a adesão e colonização de tecidos do hospedeiro, bem como a proteção do microrganismo frente aos antimicrobianos (ZHAO *et al.* 2020). A produção de biofilme também pode ser uma problemática quando a eliminação de microrganismos do ambiente hospitalar uma vez que essa característica permite que esta sobreviva aos métodos de desinfecção comumente utilizados na rotina hospitalar (KATONGOLE *et al.*, 2020).

A produção de biofilme neste estudo (45%) foi superior aos 29% observados por Nascimento *et al.* (2014) e inferior aos 62% de Shah *et al.* (2019) e 62,5% de Katongole *et al.* (2020). Evidenciando que mecanismos e drogas que consigam evadir esses mecanismos de resistência sejam mais eficientes no tratamento de infecções ocasionados por estes microrganismos. Pode-se observar no presente estudo que dois dos isolados (296,327) que obtiveram elevado índice de IRMA=0,58 testaram positivos para produção de biofilme e α -hemolisina o que pode reforçar ainda mais a periculosidade destes isolados, uma vez que podem ser mais difíceis de eliminar e mais fáceis de colonizar os tecidos do hospedeiro.

Correlacionando-se os dados obtidos a partir das análises da virulência e da resistência aos antimicrobianos, assim como os mecanismos por trás desse fenótipo de resistência, foi possível obter um melhor entendimento quanto as características fenotípicas de virulência e resistência dos isolados de *E. coli*. Pôde-se observar que alguns isolados (178; 265; 295; 327) além de possuírem um valor de IRMA elevado (>0,50) Isto os caracteriza como de alta periculosidade de contaminação, pois apresentaram valor de IRMA superior aos 0,2 estabelecido por Krumperman (1983). Além dos altos valores de IRMA os isolados também apresentaram produção de mecanismos de resistência testados (β -lactamases, bomba de efluxo e produção de biofilme) assim como os a produção de α -hemolisina.

Além disso, estes isolados apresentaram também um perfil fenotípico positivo para produção dos mecanismos de resistência e virulência, fazendo com que estes sejam ainda mais preocupantes e perigosos quanto a contaminação e sua disseminação no meio ambiente.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que os isolados bacterianos de *E. coli* responsáveis por diversas infecções hospitalares no Vale do Rio São Francisco apresentam perfis de resistência para as principais classes de antimicrobianos utilizados na terapêutica clínica, são produtores de fatores de virulência (α -hemolisina) e de mecanismos de resistência (bomba de efluxo, β -lactamases e formação de biofilme). O fato de alguns isolados apresentarem alto índice de resistência múltipla aos antimicrobianos acende um alerta para a contaminação por estes.

O presente estudo também possibilitou uma visualização das classes de antimicrobianos mais resistentes entre os microrganismos, como as (penicilinas, quinolonas, cefalosporinas, sulfonamidas e fluoroquinolonas). Estes achados contribuem para escolhas mais eficientes para o tratamento de infecções resistentes ocasionadas por *E. coli* assim como fortalecem a necessidade do estudo e desenvolvimento de novos mecanismos e ou estratégias para o combate destes microrganismos multirresistentes tanto no ambiente hospitalar como um todo, quanto na prática clínica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRED, K.J; KERNS, R. J; OSHERO, N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. **Biochemistry**, v. 53, p.1565-1574, 2014.

AMBLER, R.P. The structure of β -Lactamases. **Philosophical Transactions B**, v.289, p.321-331, 1980.

ARAÚJO, B.T.; PEREIRA, D.C.R. Políticas para controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) no Brasil. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v.13, n.3, p.445-450, 2017.

ARZANLOU, M.; CHAI, W.C.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays in Biochemistry**, v.61, n.1, p.49–59, 2017.

BAESHEN *et al.* Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, n.7, p.953-962, 2015.

BALBIN, M.M. *et al.* Antimicrobial resistance and virulence factors profile of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from different environments exposed to anthropogenic activity. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.22, p.578–583, 2020.

BEKAL, S. *et al.* Draft Genome Sequence of a Necrotogenic *Escherichia coli* Isolate. **Genome Announcements**, v.3, n.5, p.e01152-15, 2015.

BJORLAND, J. *et al.* Widespread Distribution of Disinfectant Resistance Genes among Staphylococci of Bovine and Caprine Origin in Norway. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.9, p.4363–4368, 2005.

BLOUNT, Z.D. The unexhausted potential of *E. coli*. **eLife**, v.4, p.e05826, 2015.

BOUGUÁÉNEC, C.; SERVIN, A.L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, v.256, n.2, p.185–194, 2006.

BRASIL. PORTARIA N° 2.616, DE 12 DE MAIO DE 1998. Programa de controle a infecções hospitalares, Brasília, DF, nov 2009. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.htm>. Acesso em: 01 mar. 2021.

BREUM, S.Ø; BOEL, J. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and verocytotoxin producing *E. coli* (VTEC) on Danish beef carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, n.1–2, p.90–96, 2010.

BRINKAC, L. *et al.* The Threat of antimicrobial resistance on the human microbiome. **Microbial Ecology**, v.74, n.4, p.1001–1008, 2017.

BUERIS, V. *et al.* Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.7, p.839–844, 2007.

CAMÉLÉNA, F. *et al.* Rapid and Simple Universal *Escherichia coli* Genotyping Method Based on Multiple-Locus Variable-Number Tandem- Repeat Analysis Using Single-Tube Multiplex PCR and Standard Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.85, n.6, p. e02812-18, 2019.

CHETERI, S. *et al.* AcrAB-TolC efflux pump system plays a role in carbapenem non-susceptibility in *Escherichia coli*. **BMC Microbiology**, v.19, n.210, p.1-7, 2019.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v.88, n.1, p.26–40, 2019.

CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - CLSI supplement M100. **Clinical and Laboratory Standard Institut**, v. 29, 2019.

CONCEIÇÃO, R.A. *et al.* Human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) is able to adhere to and invade kidney epithelial cells in culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.45, n.5, p.417–424, 2012.

COSTA, M.M. *et al.* Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa em veterinária Brasileira**, v.26, n.1, p.5-8, 2006.

DEFILIPP, Z. Drug-Resistant *E. coli* Bacteremia Transmitted by Fecal Microbiota Transplant. **New England Journal of Medicine**, v.381, n.21, p.2043–2050, 2019.

DEHKORDI, F.S. *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* in the high vaginal swab samples of fertile and infertile women: virulence factors, O-serogroups, and phenotyping and genotyping characterization of antibiotic resistance. **New Microbes and New Infections**, v.38, p.100824, 2020.

DEVAUX, M. *et al.* Pathogenicity factors of genomic islands in intestinal and extraintestinal *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v.11, article.2065, p.1-35, 2020.

DENISUIK, A.J *et al.* Molecular epidemiology of extended-spectrum b-lactamase-, AmpC b-lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5-year period: CANWARD 2007–11. **J Antimicrob Chemother**, v.68 n.Suppl 1, p.57-65, 2013.

EL-AZZIZ, A.M.A *et al.* β -lactam resistance associated with β -lactamase production and porin alteration in clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae*. **PLOS ONE**, v.16, n.5, 2021.

FERRI, M.*et al.* Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.57, n.13, p.2857–2876, 2017.

FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v.42, p.872-874, 1989.

HUANG, Y.H., CHANG, H.C., Chang, T.C . Development of a latex agglutination test For rapid identification of *Escherichia coli*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.20, p.97-103, 2001.

HESPANHOL, L.A.B. *et al.* Infecção relacionada com la Asistencia a la Salud en Unidad de Cuidados Intensivos Adulto. **Enfermería Global**, v.18, n.1, p.215–254, 2018.

HOLMES, A.H *et al.* Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v.387, n.10014, p.176–187, 2016.

JANG, J. *et al.* Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. **Journal of Applied Microbiology**, v.123, n.3, p.570–581, 2017.

JAVADI, K. *et al.* Characterization and antibiotic resistance pattern of diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC), isolated from paediatric diarrhoea in Shiraz, southern Iran. **New Microbes and New Infections**, v.38, p.100780, 2020.

JOHNSON, R.P. *et al.* Detection and Prevalence of Verotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 Serotypes in a Canadian Watershed. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.7, p.2166–2175, 2014.

JOHNSON, T.J.; DEBROY, C.; BELTON, S. *et al.* Pyrosequencing of the Vir plasmid of necrotoxicogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v.144, n.1–2, p.100–109, 2010.

KARMALI, M.A.; GANNON, V; SARGEANT, J.M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3–4, p.360–370, 2010.

KATONGOLE, P. *et al.* Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, and virulence genes of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical isolates in Uganda. **BMC Infectious Diseases**, v.20, p.453, 2020.

KRUMPERMAN, P.H. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, n 1, p.165-170, 1983.

LIVERMORE, D.M. β -Lactamases—the threat renews. **Current Protein & Peptide Science**, v.10, p.397-400, 2009.

LIVERMORE, D.M. β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. **American society for Microbiology**. v.8, n.4, p.557-584, 1995.

MacFADDIN, J.F. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.152, n.1–2, p.2–12, 2013.

MAINIL, J.G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans, and foods: who's who? **Journal of Applied Microbiology**, v.98, n.6, p.1332–1344, 2005.

MCEWEN, S.A.; COLLIGNON, P.J. Antimicrobial Resistance: a one health perspective. p. 521–547. *In*: SCHWARZ, S.; CAVACO, L.M.; SHEN, J. (Orgs.). **Antimicrobial resistance in bacteria from livestock and companion animals**. Bel Air, MD: American Society of Microbiology, 2018.

MIRSEPASI-LAURIDSEN, H.C. *et al.* *Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v.32, n.2, p. e00060-18, 2019.

MILLER, W.R; MUNITA, J.M; ARIAS, C.A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.12, n.10, p.1221-1236, 2014.

MITTAL, S.; SHARMA, M.; CHAUDHARY, U. Study of virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* and its antibiotic susceptibility pattern. **Indian Journal of Pathology and Microbiol**, v.57, p.61-64, 2014.

MOREIRA, M.A.S. *et al.* Resistência a antimicrobianos dependente do sistema de efluxo multidrogas em *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1307-1314, 2008.

NASCIMENTO, H.H. *et al.* Phenotypic and genotypic characteristics associated with biofilm formation in clinical isolates of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) strains. **BMC Microbiology**, v.14, n.184, 2014.

NIYAS, F.M.; GOPINATH, P. Detection of hemolysin and gelatinase in uropathological *Escherichia coli*. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v.11, n.5, p.1734-1736, 2018.

RAMIREZ, M.S. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, v.13 p.151-171, 2010.

RAKSHA, B.R.; SRINIVASA, H.; MACADEN, R.S. Occurrence and characterisation of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract infections, **Indian Journal of Medical Microbiology**, v.21, p.102-107, 2003.

REUTER, A. *et al.* Direct visualisation of drug-efflux in live *Escherichia coli* cells. **FEMS Microbiology Reviews**, v.44, p.782–792, 2020.

RÍOS-MUÑIZ, D. *et al.* *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: prevalencia, patogénesis y modelos murinos. **Gaceta Médica de México**, v.155, n.4, p.410-416, 2019.

RUDD, K.E; JOHNSON, S.C.; AGESA, K.M; *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v.395, p.12, 2020.

OLIVEIRA, A.C.; DAMASCENO, Q.S.; RIBEIRO, S.M.C.P Infecções relacionadas à assistência em saúde: desafios para a prevenção e controle. **Revista Mineira de Enfermagem**, v.13, n.3, p.445-450, 2009.

PADOVEZE, M.C; FORTALEZA, C.M.C.B. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v.48, n.6, p.995–1001, 2014.

RODRIGUES, F.A; BERTOLDI, A.D. The profile of antimicrobial utilization in a private hospital. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, n.1, p.1239-1247, 2010.

SANTOS, F.G.B. *et al.* Microbiota bacteriana com potencial patogênico em pacamã e Perfil de sensibilidade a antimicrobianos. **Revista Caatinga**, v.27, n.2, p.176–183, 2014.

SHAH, C. *et al.* Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. **BMC Microbiology**, v.19, n.1, p.204, 2019.

SINGH, S.B.; YOUNG, K.; SILVER, L.L. What is an “ideal “ antibiotic? Discovery challenges and path forward. **Biochemical Pharmacology**, v.133, p.63-73, 2017.

SILVA SOUZA, K.L. *et al.* Prevalência de bactérias multirresistentes na cavidade nasal de equinos assintomáticos para doenças respiratórias. **Revista Univap**, v.26, n.52, p.107-123, 2020.

SHRUTHI; RAVIKUMAR, RAVISHKUMAR, N. Phenotypic Study of Virulence Factors in *Escherichia Coli* Isolated from Antenatal Cases, Catheterized Patients, and Faecal Flora. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.6, n.10, p.1699-1703, 2012.

TIBO, L.H.S. *et al.* Cytotoxic factor secreted by *Escherichia coli* associated with sepsis facilitates transcytosis through human umbilical vein endothelial cell monolayers. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.20, n.3, p.298–302, 2016.

TORTORA, G.J.; Case, C.L.; Funke, B.R.; **MICROBIOLOGIA**. 12.ed. São Paulo: Artmed Editora LTDA, 2016. 964p.

UMPIÉRREZ, A. *et al.* Virulence genes of *Escherichia coli* in diarrheic and healthy calves. **Revista Argentina de Microbiología**, v.53, n.1., p.34-38, 2021.

VAN BOST, S. *et al.* Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970. **Veterinary Microbiology**, v.82, n.4, p.311-320, 2001.

VAN ELSAS, J.D. *et al.* Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. **The ISME Journal**, v.5, n.2, p.173-183, 2011.

VIEIRA, M.A.M. Pathogenicity islands Islas de patogenicidad. **O Mundo da Saúde**, v.33, p.403-414, 2009.

VINODHKUMAR, O.R. *et al.* Multi-drug resistant (MDR), extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing and carbapenem resistant *Escherichia coli* in rescued Sloth bears (*Melursus ursinus*), India. **Veterinary Research Communications**, v.45, n.2-3, p.163-170, 2021.

WESTON, N. *et al.* Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in Enterobacteriaceae. **Research in Microbiology**, v.169, n.7-8, p.425-431, 2018.

WHO. WORLD HEALTH ORGANATION. Critically important antimicrobials for human medicine. 6TH ed. 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf>. Acesso em: 02 jan.2022.

WHO. WORLD HEALTH ORGANATION. Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: First Global Patient Safety Challenge Clean Care Is Safer Care. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23805438/>. Acesso em: 02 jan.2022.

YORK, M.K. *et al.* Multilaboratory validation of rapid spot tests for identification of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.9, p. 3394-3398, 2000.

ZHANG, T. *et al.* Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Soils from Jiangsu Province, China. **PLoS ONE**, v.8, n.12, p.e81178, 2013.

ZHAO, F. *et al.* A systematic review and meta-analysis of antibiotic resistance patterns, and the correlation between biofilm formation with virulence factors in uropathogenic *E. coli* isolated from urinary tract infections. **Microbial Pathogenesis**. v.144, p. 104196, 2020.