



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOÃO GABRIEL MATERIAL SONCINI

**MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS EM UROPATÓGENOS DA
COMUNIDADE E SUA RELAÇÃO COM DETERMINANTES
DE RESISTÊNCIA PRESENTES EM BACTÉRIAS DE
ORIGEM ANIMAL**

Londrina
2021

JOÃO GABRIEL MATERIAL SONCINI

**MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS EM UROPATÓGENOS DA
COMUNIDADE E SUA RELAÇÃO COM DETERMINANTES
DE RESISTÊNCIA PRESENTES EM BACTÉRIAS DE
ORIGEM ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Soncini, João Gabriel Material.

Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos em Uropatógenos da Comunidade e sua Relação com Determinantes de Resistência Presentes em Bactérias de Origem Animal / João Gabriel Material Soncini. - Londrina, 2021. 49 f. : il.

Orientador: ELiana Carolina Vespero.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2021.

Inclui bibliografia.

1. E. coli - Tese. 2. ESBL - Tese. 3. Resistência aos antimicrobianos - Tese. 4. MLST - Tese. I. Vespero, ELiana Carolina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 579

JOÃO GABRIEL MATERIAL SONCINI

**MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS EM UROPATÓGENOS DA
COMUNIDADE E SUA RELAÇÃO COM DETERMINANTES
DE RESISTÊNCIA PRESENTES EM BACTÉRIAS DE
ORIGEM ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Carolina
Vespero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama
Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de julho de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Eliana Carolina Vespero, por me acompanhar nessa trajetória e me apoiar com tanta compreensão e empenho na realização desse projeto. Obrigado, professora, por ter acreditado e a não me deixar desistir.

Agradeço, igualmente, à Profa. Dr. Renata Katsuko T. Kobayashi e ao Prof. Dr. Gerson Nakazato pela parceria na realização do estudo e pelas correções pertinentes. É uma honra tê-los nesse trabalho.

Agradeço aos funcionários do Hospital Universitário de Londrina, em especial aos que fazem parte do Laboratório de Microbiologia Clínica, que sempre estiveram presentes e dispostos a ajudar.

Agradeço à Universidade de São Paulo (USP), principalmente ao Prof. Dr. Nilton Lincopan e a sua equipe, por disponibilizar seus espaços e compartilhar de tantos conhecimentos e auxílios durante os experimentos.

Agradeço à grande pesquisadora Dr. Louise Cerdeira pela paciência, companheirismo e ensinamentos de bioinformática para a realização desse estudo.

Agradeço minhas colegas de laboratório, Tiemy Tizura e Vanessa Koga, que se tornaram grandes amigas. Obrigado pela cooperação com os experimentos e por compartilhar tantos outros momentos nesses dois anos. É impossível agradecer por tanto.

Por fim, agradeço aos meus amigos e família, especialmente minha mãe, que me mantiveram confiante nos momentos de incertezas e escuridão. Obrigado pelo incentivo durante a elaboração desse trabalho.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

SONCINI, João Gabriel Material. **Monitoramento da resistência aos antimicrobianos em uropatógenos da comunidade e sua relação com determinantes de resistência presentes em bactérias de origem animal.** 2021. 48 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é uma ameaça global que preocupa a saúde pública. *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) está entre as principais preocupações uma vez que sua disseminação tem sido associada à possível zoonose. A fim de investigar esta associação, o objetivo do trabalho foi caracterizar fenotípica e genotipicamente isolados de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos isoladas de urina de pacientes da comunidade de Londrina e de carnes de frango e suíno para consumo humano. Para isso, realizou-se o sequenciamento completo do DNA de 91 isolados de urina (n=59), carne de frango (n=24) e suíno (n=8). Todos os isolados foram identificados utilizando-se o sistema automatizado Vitek2 e submetidos ao teste confirmatório para ESBL em ágar chromID® ESBL ou teste de duplo disco sinergismo (DDS). Para avaliação da similaridade genética e clonalidade, o DNA dos isolados de *E. coli* foram submetidos à reação em cadeia da polimerase, utilizando-se de sequências repetitivas intergênicas em enterobactérias (ERIC-PCR). O sequenciamento completo do genoma foi feito de acordo com os protocolos e a plataforma do Illumina. As bases de dados online Enterobase, MLST, NCBI e GenBank foram utilizadas para a análise do sequenciamento. No estudo, os principais resultados demonstram que o ST131 foi mais prevalente em amostras humanas, estando relacionado com a produção de CTX-M-15. Já *E. coli* ST117 produtora de CTX-M-55 foi identificada nas três origens estudadas, ou seja, em amostras de carnes (frango e suíno) e em infecções humanas. Os isolados ST38, ST131, ST354 e ST1196 foram detectados somente em isolados de urina e carne de frango, enquanto o isolado ST410 foi isolado de urina e de carne de suínos. Conclui-se que há uma variedade de clones de *E. coli* produtora de ESBL entre isolados de urina e carnes de frango e suíno para consumo, sugerindo que carnes comercializadas podem ser um potencial reservatório de linhagens de *E. coli* de alta prioridade na comunidade, constituindo um grave problema de saúde pública.

Palavras-chave: *E. coli*; ESBL; resistência aos antimicrobianos; MLST

SONCINI, João Gabriel Material. **Resistance monitoring to antimicrobials in community uropathogens and their relationship with resistance determinants present in animal bacteria.** 2021. 48 p. Dissertation (Masters in Clinical and Laboratory Physiopathology) - State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antimicrobials is a global threat that concerns public health. Extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL) is among the main concerns as its spread has been linked to possible zoonosis. In order to investigate this association, the aim of this study was to characterize phenotypic and genotypically antimicrobial-resistant *E. coli* isolates isolated from urine of patients from the Londrina community and from chicken and pork meat for human consumption. For this, complete DNA sequencing of 91 isolates from urine (n=59), chicken (n=24) and pork (n=8) was performed. All isolates were identified using the automated Vitek2 system and submitted to the confirmatory test for ESBL on chromID® ESBL agar or double-disk synergism test (DDS). To evaluate the genetic similarity and clonality, the DNA of the *E. coli* isolates were submitted to a polymerase chain reaction, using intergenic repetitive sequences in enterobacteria (ERIC-PCR). The complete genome sequencing was done according to Illumina protocols and platform. Enterobase, MLST, NCBI and GenBank online databases were used for sequencing analysis. In the study, the main results demonstrate that ST131 was more prevalent in human samples, being related to the production of CTX-M-15. On the other hand, *E. coli* ST117 producing CTX-M-55 was identified in the three studied sources, that is, in meat samples (chicken and pork) and in human infections. ST38, ST131, ST354 and ST1196 isolates were detected only in chicken urine and meat isolates, while ST410 isolate was isolated from pork urine and meat. It is concluded that there is a variety of ESBL-producing *E. coli* clones among isolates from urine and poultry and pork for consumption, suggesting that commercialized meats can be a potential reservoir of high priority *E. coli* strains in the community, constituting a serious public health problem.

Keywords: *E. coli*; ESBL; resistance to antimicrobials; MLST.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
BHI	Brain Heart Infusion
EAEC	Escherichia coli Enteroagregativa
EHEC	Escherichia coli Enterohemorrágica
EIEC	Escherichia coli Enteroinvasora
EPEC	Escherichia coli Enteropatogênica
ESBL	β -lactamase de Espectro Estendido
ETEC	Escherichia coli Enterotoxigênica
ExPEC	Escherichia coli Extraintestinais
FDA	Food and Drug Administration
IPEC	Escherichia coli Patogênica Intestinal
ITU	Infecção do Trato Urinário
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MGEs	Mobile Genetic Elements
NMEC	Escherichia coli Associada à Meningite Neonatal
ONU	Organização das Nações Unidas
PAN-BR	Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos
SEPEC	Escherichia coli Causadora de Sepsis
ST	Sequence type
UPEC	Escherichia coli Uropatogênica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	ESCHERICHIA COLI	10
1.2	INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO (ITU)	11
1.3	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	13
1.3.1	Resistência aos β -lactâmicos	13
1.3.2	ESBL	14
1.4	AVICULTURA E SUINOCULTURA NO BRASIL E NO MUNDO	16
1.4.1	Uso de Antimicrobianos na Produção de Animais	17
1.4.2	E. coli Resistente aos Antimicrobianos na Produção de Animais e Conceito de One Health	18
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	AMOSTRAGEM	23
3.1.1	Isolados de E. coli Uropatogênicas	23
3.1.2	Isolados de E. coli em Carnes de Frango e Suíno	23
3.2	COLETA DE DADOS	24
3.3	TESTES FENOTÍPICOS	24
3.1.1	Testes em Ágar chromID® ESBL	24
3.1.2	Teste de Duplo Disco Sinergismo (DDS)	25
3.4	TESTES GENOTÍPICOS	25
3.4.1	Extração	25
3.4.2	Reação em Cadeia da Polimerase, Baseada em Sequências Repetitivas Intergênicas em Enterobactérias (ERIC –PCR)	26
3.4.3	Sequenciamento Completo do Genoma	26
3.4.4	Análises de Bioinformática	27
4	RESULTADOS	28

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
	REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli é um bacilo Gram-Negativo, anaeróbio facultativo pertencente à família Enterobacteriaceae, ordem Enterobacteriales, encontrada no trato gastrointestinal de homem e outros animais de sangue quente (HUTTON et al., 2018). Foi primeiramente descrita em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich, após ser isolada de fezes de crianças com disenteria (MÉRIC et al., 2016).

A grande maioria das cepas de *E. coli* coloniza o trato gastrointestinal de recém-nascidos e permanecem como comensais ao hospedeiro durante toda a vida (FLAMENT-SIMON et al., 2020). Entretanto, alguns clones são patogênicos por possuírem fatores de virulência variados capazes de causar um grande espectro de doenças (LARA et al., 2017).

As cepas de *E. coli* patogênicas são subdivididas em dois principais grupos: *E. coli* diarreio gênica (DEC) e *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC). As DEC causam síndromes diarreicas que variam na apresentação clínica e na patogênese, distinguindo-se em variantes como *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) (PITOUT, 2012; KÖHLER; DOBRINDT, 2011).

As ExPEC frequentemente ocupam um nicho na microbiota intestinal e é desse reservatório que elas emergem para causar as mais diversas infecções extraintestinais. Alguns dos principais exemplos de ExPEC isolados de humanos são *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* causadora de sepse (SEPEC) (PITOUT, 2012). Apesar da presença de genes de virulência clássicos em linhagens de ExPEC que causam infecção, ainda há incertezas sobre o que define ou diferencia *E. coli* comensal e patogênica (LA COMBE et al., 2019; VAN DER MEE-MARQUET et al., 2015).

E. coli se apresenta como um importante modelo de estudos epidemiológicos justamente por ser um microrganismo comum entre hospedeiros, ser facilmente manipulada em laboratório e adquirir facilmente elementos genéticos móveis (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; DONNENBERG, 2013). Por se tratar de um microrganismo presente na

microbiota intestinal, órgãos regulatórios utilizam *E. coli* para avaliar a qualidade higiênico-sanitária de alimentos, principalmente de água potável, sendo a presença da bactéria um indicador específico de contaminação fecal (PEDROSO et al., 2018).

1.2 INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO (ITU)

Infecções do trato urinário (ITU) estão entre as infecções bacterianas mais comuns na comunidade e no ambiente hospitalar, sendo responsável por significativa morbidade tanto em homens quanto em mulheres (FASUGBA et al., 2015). Estima-se que cerca de 150 milhões de pessoas são acometidas por ITU todo o ano, em todo o mundo, resultando, somente nos Estados Unidos, um gasto aproximado de seis bilhões de dólares em serviços médicos (HATTON; BAUMANN; FASCIONE, 2021).

As ITU são categorizadas como complicadas ou não complicadas, baseada no local e duração de terapia antimicrobiana administrada ao paciente (VERMA, 2019). As ITU não complicadas geralmente afetam crianças, mulheres e idosos saudáveis que não apresentam anormalidades estruturais do trato urinário. Estas são diferenciadas em ITU superiores e inferiores, mais comumente pielonefrite (rins) e cistite (bexiga), respectivamente. Já as ITU não complicadas raramente causam danos sérios ao hospedeiro e em alguns casos até podem ser naturalmente eliminadas pela resposta imune, mesmo sem antibioticoterapia (DEMIRAL, 2018; HOONTON, 2012).

As ITU complicadas, por outro lado, requerem uma terapia prolongada e estão associadas a um risco aumentado de infecção crônica e/ou recorrente. As ITU complicadas estão associadas a anormalidades do trato urinário, como obstrução e retenção urinária, imunossupressão, exposição prévia a antibióticos e insuficiência renal. Juntos, esses fatores comprometem o trato urinário e aumentam o risco de complicações sérias e falhas no tratamento (DEMIRAL, 2018; NAGAMATSU et al., 2015).

De forma geral, as ITU são mais comuns em mulheres do que em homens por características anatômicas do trato geniturinário feminino e da presença de substâncias antibacterianas no fluido prostático masculino (SPAULDING; HULTGREN, 2016). Em mulheres, o fato da uretra ser mais curta e existir uma

proximidade do canal vaginal ao ânus, torna mais fácil a contaminação do trato urinário por microrganismos presentes no trato gastrointestinal. Além disso, a gestação também é um fator de risco, pois durante esse período ocorre alterações anatômicas, fisiológicas e hormonais, como modificação da posição da bexiga, aumento do débito urinário e alcalinização urinária, contribuintes para a estase urinária e proliferação bacteriana (TERLIZZ;, GRIBAUDO; MAFFEITERLIZZI, 2017).

Uma variedade de patógenos tem sido implicada em ITU, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Enterococcus faecalis* (SORLOZANO et al., 2014). No entanto, a doença é predominantemente causada por *E. coli* uropatogênica (UPEC), representando cerca de 80% dos casos (MASAJITIS-ZAGAJEWSKA; NOWICKI, 2017).

UPEC reside no trato intestinal de pessoas saudáveis e ascende, através da uretra, em direção à bexiga e aos rins, podendo, em casos graves, evoluir para sepse. UPEC age como um patógeno intracelular oportunista, sendo capaz de formar comunidades intracelulares, que possuem propriedades parecidas com as de biofilmes, protegendo a bactéria da resposta imune do hospedeiro e propiciando infecções crônicas e recidivas. É capaz de causar diversos tipos de manifestações clínicas, como bacteriúria, cistite e pielonefrite (DALE; WOODFORD, 2015; MORA-RILLO et al., 2015).

A capacidade da UPEC em colonizar o trato urinário e causar doenças inclui a expressão de múltiplos fatores de virulência associados à superfície, incluindo adesinas, flagelos, sistemas de aquisição de ferro e estruturas polissacarídicas de superfície (CLERMONT et al., 2019). A orquestração coordenada temporal e espacialmente de múltiplos fatores contribui para o sucesso da sobrevivência e persistência da UPEC no ambiente hostil do trato urinário. O nível de complexidade no controle da expressão de fatores de virulência da superfície de UPEC é ainda agravado pelo aumento da incidência de resistência a antibióticos, o que complica o tratamento da ITU e destaca a necessidade de entender melhor os mecanismos biológicos que sustentam a patogênese da UPEC (KIM et al., 2018).

1.3 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência aos antimicrobianos é considerada uma grande ameaça para a saúde pública em todo o mundo, preocupando cientistas e profissionais da saúde. Infecções por bactérias resistentes levam a doenças graves e internações hospitalares prolongadas, além de aumento nos custos com serviços médicos e falhas na antibioticoterapia (KLEIN et al., 2018).

Bactérias Gram-negativas, incluindo *E. coli*, são as principais protagonistas no aumento da resistência antimicrobiana, tornando-se exemplos notáveis de como estes microrganismos procuram manter e expressar novas informações genéticas que conferem resistência a uma ou a várias drogas (ROBERTSON et al., 2019). Diferentes mecanismos de resistência são descritos, como: alteração da permeabilidade da membrana, alteração do local de atuação do fármaco, bomba de efluxo e produção de enzimas que degradam ou alteram os antimicrobianos. Alguns dos mecanismos de resistência mais recentes surgiram dos chamados clones de alto risco, como o ST131, que facilitam a persistência e maior disseminação de genes de resistência em todo o mundo (TALAN et al., 2017; VILA et al., 2016).

1.3.1 Resistência aos β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são a classe de antimicrobianos mais utilizada no tratamento de infecções bacterianas, incluindo ITU, e pertencem a esse grupo as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. A produção de β -lactamase por Gram-negativas é a maior causa de falha terapêutica, restando poucas alternativas, visto que estas bactérias acumulam frequentemente resistência à outras classes de antimicrobianos (FROST et al., 2019; SAMPAIO; GALES, 2016).

Abraham e Chain (1940) identificaram a primeira β -lactamases em *E. coli*, antes mesmo do uso da penicilina para o tratamento de infecções bacterianas (BUSH, 1989). Desde então foram identificados mais de 1000 tipos de β -lactamases, sendo pertencentes a diferentes grupos funcionais que podem ser de origem cromossômica ou de plasmídeos. Estas enzimas hidrolíticas clivam o anel β -lactâmico através da hidroxilação irreversível da ligação amida do anel,

inativando os antimicrobianos dessa classe (VACAHVANICHSANONG.; MCNEIL; DISSANEEWATE, 2021).

As nomenclaturas das β -lactamases foram designadas de acordo com alguns critérios, como substrato de atuação (FOX), local de descoberta (OHIO) ou nome do paciente na qual a bactéria foi isolada (TEM) (BONOMO, 2017). Estas enzimas também podem ser classificadas com base em suas características bioquímicas (enzimáticas) (BUSH; JACOBY, 2010) ou de acordo com as suas estruturas moleculares (AMBLER, 1980). O esquema proposto por Bush e Jacoby divide as enzimas em grupos de 1 a 4 e baseia-se na preferência de substrato da enzima e na inativação diante de inibidores específicos. O esquema de classificação de Ambler considera a similaridade entre a estrutura e sequência de aminoácidos das enzimas, sendo elas agrupadas nos tipos A, B, C e D (BUSH; JACOBY, 2010).

Em 1983, descreveu-se a primeira β -lactamase de espectro estendido (“Extended-spectrum β -lactamases” ou ESBL) em isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens*. O surgimento destas enzimas veio em resposta à introdução das cefalosporinas de terceira geração no início dos anos 80, exemplificando a capacidade de adaptação apresentada por patógenos causadores de infecções hospitalares (PANA; ZAOUTIS, 2018).

1.3.2 ESBL

As ESBL são enzimas que possuem capacidade de clivar, através da hidrólise, antimicrobianos pertencentes às classes das penicilinas, cefalosporinas de primeira, terceira e quarta geração e o aztreonam, porém não possuem atividade contra as cefamicinas, como cefoxitin e cefotetan. As ESBL pertencem ao grupo 2be e 2d de Bush-Jacoby e ao grupo A de Ambler, com exceção das OXA, e podem ser inibidas pelos inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (TALAN et al., 2017; BUSH; JACOBY, 2010).

Apesar das ESBL serem comumente encontradas em isolados de *E. coli* e *Klebsiella* spp., seja de origem hospitalar ou comunitária, elas também são diagnosticadas em microrganismos como *Salmonella enterica*, *Citrobacter*

spp., *Enterobacter* spp., *Proteus mirabilis* e *Serratia marcescens* e entre outros (ADEGOKE et al., 2020).

Frequentemente, as ESBL são codificadas por genes presentes em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, os quais também carregam genes de resistência a outras classes de antibióticos, de modo que o isolamento de cepas produtoras de ESBL multirresistentes tem levado ao aumento considerável de morbidade por infecções bacterianas (RASEALA,; EKWANZALA; MOMBA, 2020)

Entre as ESBL mais comuns estão as da família SHV, TEM e CTX-M. Outros tipos clinicamente importantes incluem VEB, PER, BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA e IBC (PITOUT, 2012; DHILLON; CLARK, 2011).

A enzima TEM-1 foi a primeira β -lactamase codificada por um elemento genético móvel, isolada de *E. coli*. Os genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* codificam ESBL do tipo SHV e TEM, como as TEM-1 e TEM-2 e SHV-1. Estas enzimas são mundialmente disseminadas, principalmente por seus genes estarem presentes em plasmídeos e transposons (ABDISSA et al., 2017).

Atualmente, as CTX-M são as ESBL mais prevalentes em espécies da família *Enterobacteriaceae*. Esta predominância é observada não apenas entre isolados clínicos hospitalares, mas também entre bactérias multirresistentes isoladas de infecções comunitárias. A β -lactamase do tipo CTX-M foi primeiramente isolada em 1989, na Alemanha, em um isolado clínico de *E. coli* e identificada como CTX-M-1. Já no Brasil, a ocorrência de CTX-M foi relatada pela primeira vez na década de 1990, onde foi descrita uma nova CTX-M (CTX-M-8) produzida por isolados clínicos de *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* e *Citrobacter amalonaticus* (ABDISSA et al., 2017; NESME, J.; SIMONET, 2015)

As enzimas CTX-M, são agrupadas de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos em cinco grupos distintos, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. O grupo CTX-M-1, inclui as enzimas CTX-M-3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -28, 29, -30, -32, -33, -36, -54, -55, -57 e UOE-1. O grupo CTX-M-2 inclui as enzimas CTX-M-2, -4, -7, -20, -31, -44. O grupo CTX-M-8 inclui as enzimas CTX-M-8, CTX-M-40 e CTX-M-63. O grupo CTX-M-9 inclui as enzimas CTX-M-9, -13, -14, -16 a -19, -21, -27, -45, -46, -47, -48, -49 e -50. O

grupo CTX-M-25 inclui CTX-M-25, -26, -39 e -41 (DE CARVALHO et al., 2020; ABDISSA et al., 2017; NESME, J.; SIMONET, 2015).

No Brasil, genes do tipo CTX-M têm sido relatados com frequência em ambientes de saúde, na comunidade e na pecuária (Moura et al., 2017). Em países da América do Sul uma epidemiologia específica de ESBL pode ser observada, com CTX-M-2 e CTX-M-9 sendo muito mais prevalentes do que em outros continentes. No entanto, nos últimos anos, uma mudança no padrão epidemiológico foi documentada, com *Enterobacteriaceae* produtoras de CTX-M-15 se tornando predominantes nesta região (Rocha et al., 2016; Sennati et al., 2012). Uma elevada frequência de variantes CTX-M foi descrita na região sudeste do Brasil, especialmente no estado de São Paulo e Rio de Janeiro, onde os grupos CTX-M-2 e CTX-M-1 são predominantes (MELO et al., 2018; ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016).

No sul do Brasil, a prevalência de CTX-M em isolados de carnes de frangos é maior do que já relatado em outros países, como EUA e Índia, e em outras regiões do Brasil. Embora o tipo varie dependendo do lugar do mundo, a maioria pertence ao grupo CTX-M-2. Já em carnes de suínos, a CTX-M-15 é a mais prevalente (CYOIA et al., 2019; MAYNOU; BACH; TERRÉ, 2017).

Além do perfil pandêmico dessas enzimas, a coexistência de genes codificadores de diversas β -lactamases e de resistência a outras classes de antimicrobianos em isolados da família *Enterobacteriaceae*, ameaça a eficácia das antibioticoterapias disponíveis no mercado, tornando-se preocupante para a saúde pública (MELO et al., 2018).

1.4 AVICULTURA E SUINOCULTURA NO BRASIL E NO MUNDO

A economia mundial de alimentos experimentou mudanças significativas no consumo de produtos de origem animal nos últimos anos. Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), a demanda por frango, laticínios, suínos e outros produtos de origem animal deve ter um aumento de quase 70% até 2050, tendo o líder de crescimento de consumo o frango (3,8% ao ano), seguido pelo peixe (2,1% ao ano) e suíno (1,9% ao ano) (LUDDEN et al., 2019; NUESCH-INDERBINEN et al., 2019).

O Brasil está entre os maiores produtores de frango em nível mundial, sendo responsável por cerca de 13% da produção dessas carnes. Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2019 os Estados Unidos produziu 19.941 mil toneladas de carne de frango, seguido da China (13.750) e Brasil, com 13.245 mil toneladas. O mesmo relatório demonstra que o Brasil é líder em exportação mundial, constando o envio de 4.214 mil toneladas de carne de frango para diversos países, principalmente para Ásia (37,53%) e Oriente Médio (34,39%). O estado do Paraná é responsável por 39,13% das exportações dessas carnes de frango, tornando-se líder nacional (ABPA, 2020).

Quando se fala em produção de carne suína, China (43,39%), União Europeia (24,41%) e Estados Unidos (12,79%) lideram o ranking. Em 2019, o Brasil produziu 3.983 mil toneladas de carne suína, exportando 750 mil toneladas principalmente para países da Ásia (64,80%). O estado de Santa Catarina é o maior produtor e exportador de carne suína do Brasil, responsável por mais da metade (55,65%) do mercado nacional de suinocultura (ABPA, 2020).

1.4.1 Uso de Antimicrobianos na Produção de Animais

Com o crescimento do mercado pecuário, estratégias nutricionais foram fundamentais para melhorar o desempenho da produção. Além de fontes de energia, proteínas, minerais e vitaminas, outros aditivos são incorporados nas rações dos animais de produção, como os antimicrobianos. Alguns dos antimicrobianos utilizados na veterinária são exclusivos, entretanto, pertencem às mesmas classes terapêuticas utilizadas em humanos (VAN PUYVELDE; DEBORGGRAEVE; JACOBS, 2018).

Na pecuária, o uso de antimicrobianos traz alguns benefícios que tornam a produção dos animais mais eficiente e reduz gastos. Alguns desses benefícios são: aumento do ganho de peso, diminuição do tempo necessário para o abate, diminuição do consumo de ração, aumento da eficiência alimentar, conservação das rações, prevenção da propagação epidêmica de doenças infecciosas e diminuição da mortalidade (GROHN et al., 2017).

Os antimicrobianos mais utilizados na produção animal são das classes dos glicopeptídeos, β -lactâmicos, quinolonas, estreptograminas, macrolídeos,

tetraciclinas e sulfonamidas. Apesar das vantagens econômicas e na saúde animal proporcionadas pelo uso dos antimicrobianos, diversos países têm proibido o uso destes devido a problemas relacionados à resistência aos antimicrobianos. A União Europeia decidiu proibir a venda de antimicrobianos para fins de promoção de crescimento na produção animal a partir de janeiro de 2006 (REGULATION (EC) n° 1831/2003, 2003). Nos Estados Unidos, o Food and Drug Administration (FDA) sugeriu a retirada progressiva de antimicrobianos administrados para o mesmo fim (US FDA, 2013). Segundo relatório do órgão publicado em 2018, houve uma redução de 28% do montante de antimicrobianos vendidos para uso veterinário entre os anos de 2009 e 2017 (US FDA, 2018). No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação e fiscalização do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na produção animal é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Lei 6.198 de 26/12/1974 regulamentada pelo Decreto 6.296 de 11/12/2007 (BEZERRA et al., 2017). Desde 1998 a MAPA vem restringindo o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, sendo proibido o uso de tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, penicilinas, entre outros. Ainda são permitidos para uso os agentes clorexidina, enramicina, halquinol e flavomicina (MAPA, 2020).

1.4.2 *E. coli* Resistente aos Antimicrobianos na Produção de Animais e Conceito de One Health

Animais de produção podem servir como reservatórios de genes de resistência entre bactérias patogênicas e comensais, podendo ser transferidos às bactérias presentes na microbiota do homem pela cadeia alimentar (CARNEVALI et al., 2016). Estes genes são rapidamente transferidos entre os microrganismos através de elementos genéticos móveis (MGEs - Mobile Genetic Elements), como integrons, transposons e sequências de inserção e plasmídeos (BLAAK et al., 2015; DIERIKX et al., 2018)

Amostras de *E. coli* produtoras de ESBL estão recentemente sendo encontradas em grandes números em animais destinados ao consumo humano. Entre os anos 2000 e 2001, houve, na Espanha, o primeiro relato de *E. coli*

produtora de β -lactamases do tipo CTX-M-14, SHV-12 e CMY-2 em aves. Desde então, a detecção de ESBL em isolados de *E. coli* de animais de produção só aumenta (CYOIA et al., 2019; KOGA et al., 2019)

Os estudos atualmente mostram que existem diferenças significativas na prevalência de *E. coli* produtora de ESBL em carnes de diferentes origens animais. Enquanto no frango as taxas de prevalência são mais altas (3,3-100%), as taxas de detecção na carne bovina e suína (0,7-25%) foram consideravelmente menores (BEZERRA et al., 2017). Recentemente, na Europa, um monitoramento específico de carne suína mostrou que em média 9,7% das amostras de carne de porco carregavam *E. coli* produtora de ESBL (KAESBOHRER et al., 2019).

Assim como em humanos, as ESBL do tipo CTX-M são as mais prevalentes em bactérias isoladas de animais, embora também haja relatos da presença de *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, além de outros genes. Entre as enzimas CTX-M, as de maiores taxas no Brasil são CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9 (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017; KAESBOHRER et al., 2019)

Em 2006, Rianõ e colaboradores isolaram cepas produtoras de CTX-M-9 de carcaças de frango na Espanha, onde CTX-M-9 é também prevalente em isolados humanos. Na França, *Salmonella enterica* sorotipo Virchow produtora de CTX-M-9 foi isolada de animais de produção e posteriormente em uma amostra isolada de fezes de uma criança com gastroenterite (WEILL et al., 2004). Um estudo realizado por Ensor e colaboradores demonstrou que peitos de frango pré-preparados importados do Brasil para o Reino Unido continham *E. coli* produtoras de CTX-M-2, uma ESBL comum no Brasil. Além disso, estas cepas eram genotípicamente idênticas às encontradas em humanos na América do Sul (ENSOR et al., 2007). A enzima CTX-M-15, a mais disseminada entre as Enterobacteriaceae isoladas de humanos, foi detectada em *E. coli* isoladas de aves domésticas e suínos. No Brasil, estudo realizado por Peirano e colaboradores para a identificação de genes de resistência em *Salmonella enterica* isolada de amostras clínicas humanas, animais, ração animal e alimentos, identificou genes que codificam CTX-M-8 e CTX-M-9 (PEIRANO et al., 2006)

A disseminação desses genes pode ocorrer pelo consumo da carne, contaminação em utensílios utilizados no preparo desses produtos, pelo

consumo de vegetais fertilizados com adubo orgânico advindo de animais de produção tratados terapêuticamente ou profilaticamente com antimicrobianos, contaminação no ambiente, entre outras formas (KIRCHHELLE, 2016; KAESBOHRER et al., 2019).

O Center for Disease Control and Prevention (CDC) descreve a necessidade de uma colaboração global com o objetivo de promover a saúde na interface humana, animal e ambiental. Essa colaboração é baseada no One Health, um conceito que perpetua a comunidade científica há décadas e está em constante desenvolvimento (MCEWEN, S.A.; COLLIGNON, 2018).

As ideias de One Health constituem na reconceptualização da saúde em resposta às mudanças ambientais aceleradas e ao crescimento populacional global. Consequentemente, o conceito One Health deve reconhecer a relação em constante evolução entre os animais, humanos e o ecossistema (DOYLE et al., 2015). Em 2008, a OMS, a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) desenvolveram um acordo tripartido para trabalhar mais próximos aos conceitos One Health (NANDON et al., 2017; LAMMIE, HUGHES, 2016; LANDERS et al., 2015; BERENDONK et al., 2015).

Dentro dos pontos abordados, o risco zoonótico e sua relação com a resistência aos antimicrobianos traz preocupações para a saúde geral. Tratar da resistência antimicrobiana requer programas eficazes e alguns já são realizados em diversas partes do mundo (NUESCH-INDERBINEN et al., 2019). No Brasil, existe o Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (PAN-BR), que garante medicamentos seguros e eficazes para o tratamento e prevenção de doenças infecciosas. Em parceria, a MAPA criou o Programa AgroPrevine, fortalecendo as ações de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos na produção animal (MAPA, 2020).

Estando determinado a relevância clínica das ITU por *E. coli* e a presença deste microrganismo em carnes para consumo humano, os estudos que avaliam os perfis de resistência bacteriana são essenciais para compreender a epidemiologia local e propor melhorias nos protocolos de prevenção e tratamento destas infecções, assim como atualizar critérios para o uso consciente de antimicrobianos na produção de animais.

Além disso, avaliar a correlação genética entre *E. coli* de diferentes origens, observando a dinâmica da disseminação dos genes de resistência, auxiliarão na adoção de políticas públicas dentro do conceito One Health.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar cepas de *Escherichia coli* resistentes aos antimicrobianos, isoladas de urina de pacientes da comunidade de Londrina, no período de junho 2016 a maio 2019, e de carnes para consumo humano.

2.2 *Objetivos específicos*

- Isolar *E. coli* de urina e de carnes para consumo;
- Determinar os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos de *E. coli* de urina e de carnes para consumo;
- Caracterizar por testes fenotípicos e genotípicos a produção de β -lactamases de espectro estendido;
- Avaliar a similaridade genética dos diferentes isolados de *E. coli* de urina e carnes para consumo;
- Pesquisar genes de resistência dos isolados de *E. coli* estudados;
- Correlacionar a origem genética dos isolados de *E. coli* de urina e de carnes para consumo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

3.1.1 Isolados de *E. coli* uropatogênica

No período de junho de 2016 a maio de 2019, foram isoladas 22.698 *E. coli* de urina, de pacientes das Unidades Básicas de Saúde e Unidades dos Prontos Atendimentos de Londrina. O isolamento e identificação foi realizado pelo Laboratório Central da Prefeitura de Londrina (CentroLab). Destas, 1.389 apresentaram fenótipo ESBL e foram selecionadas para este estudo. O estudo foi realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

As amostras foram identificadas utilizando-se do cartão VITEK® 2 GN ID e o teste de susceptibilidade antimicrobiana (TSA) o cartão VITEK® 2 AST 238, ambos da bioMérieux, USA. No cartão de TSA continham os seguintes antimicrobianos: ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, cefepime, meropenem, ertapenem, amoxicilina/clavulanato, piperacilina/tazobactam, amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, norfloxacina, ácido nalidixico, nitrofurantoína e sulfametoazol/trimetoprim. A interpretação foi realizada de acordo com os critérios do CLSI 2020 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

Foram desconsiderados os isolados de pacientes gestantes. As amostras foram armazenadas em ágar nutriente (temperatura ambiente) e em TSB (Tryptic Soy Broth) com glicerina 15% (-20°C), até o momento do estudo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina CAAE 56869816.0.0000.5231 e autorizado pela Secretaria de Saúde do Município de Londrina, Paraná.

3.1.2 Isolados de *E. coli* em Carnes de Frango e Suíno

No período de janeiro a maio de 2019, um total de 100 amostras de carnes de frango (n=50) e suínos (n=50) comercializadas em mercados próximos às

UBS de diversas regiões do município de Londrina foram analisadas quanto à presença de *E. coli* e seu perfil de resistência.

Cada amostra de carne foi colocada em embalagens plásticas esterilizadas e realizado a rinsagem com 100mL de BHI (Brain Heart Infusion). Distribuiu-se 20mL dessa mistura em 3 tubos, e em cada tubo foi adicionado os seguintes antimicrobianos: cefotaxima (4µg/mL), ciprofloxacino (4µg/mL) e cefotaxima com ciprofloxacino (4µg/mL cada). Esses tubos foram incubados a 37°C, por 18 - 24 horas. Após a incubação, cada caldo foi semeado em ágar MacConkey com os respectivos antibióticos e nas mesmas concentrações que o procedimento anterior, e incubados a 37°C por 18 – 24 horas. Semeou-se cada colônia crescida em ágar MacConkey em ágar cromogênio e, então, foram incubados a 37°C por 18-24 horas. Colônias com coloração roxa, correspondentes a *E. coli* foram selecionadas e estocadas em ágar nutriente (temperatura ambiente) e em TSB (Tryptic Soy Broth) com glicerina 15% (-20°C), até a realização dos testes.

Os isolados de *E. coli* foram isoladas, selecionadas e analisadas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, juntamente com o Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

3.2 COLETA DE DADOS

Dados demográficos de todos os pacientes, incluindo idade, gênero, local de atendimento e gestação, foram coletados através do sistema WebSaúde oferecido pela rede de saúde pública da prefeitura de Londrina.

3.3 TESTES FENOTÍPICOS

3.3.1 Testes em Ágar chromID® *ESBL*

A produção de ESBL foi confirmada pelo teste ChromID® ESBL (bioMérieux, USA). Este teste é baseado em um ágar com substratos cromogênicos e uma mistura de antimicrobianos, projetada especialmente para permitir a identificação direta e o crescimento seletivo da enterobactéria

produtora de ESBL. Este meio proporciona resultados em 18-24 horas, incubado à 35°C ± 1°C.

3.3.2 Teste de Duplo Disco Sinergismo (DDS)

As amostras negativas para o teste ChromID® ESBL (bioMérieux, USA) foram submetidas ao teste de duplo disco aproximação com sinergismo entre os discos de amoxicilina/ácido clavulânico, aztreonam cefepime, cefotaxima e ceftazidima (Oxoid®; Basingstoke, England), como previamente descrito (Jarlier et al., 1988; Jacoby; Han, 1996). A produção da distorção dos halos é considerada teste positivo.

3.4 TESTES GENOTÍPICOS

3.4.1 Extração

A extração do DNA genômico foi realizada pelo kit *PureLink Genomic* (Invitrogen), seguindo suas orientações do fabricante: aproximadamente 1 mL da amostra previamente incubada em TSB centrifugada a 8.000 rpm por 5 minutos; o precipitado obtido foi ressuscitado em 180 µL de *PureLink Genomic Digestion Buffer* e 20 µL de *Proteinase K*. Após 2 horas de incubação em termobloco, a 55 °C, adicionou-se 20 µL de *RNase A*, 200 µL *PureLink Genome Lysis/Binding Buffer* e 200 µL de etanol 9 -100 %. A solução obtida foi transferida para um microtubo com coluna (*PureLink Genomic Spin Columns*) e centrifugada a 13.000 rpm por 2 minutos. Adicionou-se, separadamente, 500 µL de *Wash Buffer 1* e 2, seguida de centrifugação a 13.000 rpm por 2 e 4 minutos, respectivamente. Por fim, transferiu-se a coluna para eppendorf de 1,5 mL para adicionar 50 µL de *PureLink Genomic Elution Buffer* e centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos. O DNA purificado obtido foi armazenado em freezer a -20 °C.

3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase, Baseada em Sequências Repetitivas Intergênicas em Enterobactérias (ERIC –PCR)

As técnicas de PCR foram realizadas com os primers ERIC1R (3'CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), à concentração de 50 pmol, como descrito por Versalovic (1991). As reações de amplificação foram executadas para o volume final de 25 µL com tampão de PCR 1X, dNTP, Taq DNA Polimerase Recombinante Brasileira. Incubou-se as reações a 95 °C por 1 minuto e em seguida 45 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto, 72 °C por 7 minutos e extensão final a 72 °C por 7 minutos, usando o termociclador da Applied Biosystems. O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com tampão TBE (tris base, ácido bórico e EDTA). Ajustou-se o aparelho para 100v e 400mA. A análise foi realizada pela coloração do gel com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualização em transiluminador com lâmpada ultravioleta e posteriormente fotografado para a documentação.

3.4.3 Sequenciamento Completo do Genoma

O kit Nextera XT DNA Library Preparation (Illumina) foi usado seguindo as instruções do fabricante. Uma diluição prévia das amostras de DNA foi realizada com Tris-HCl (pH 7,5–8,5) para atingir a concentração necessária de 0,2 ng/µl para iniciar o protocolo Nextera XT. A etapa de limpeza foi realizada com 40µl (0,8X) de esferas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) para maximizar a recuperação de fragmentos de 300 bp de tamanho. As bibliotecas foram quantificadas por qPCR com NEBNext Library Quant Kit para Illumina (New England Biolabs) seguindo o protocolo do fabricante. A normalização das bibliotecas foi realizada manualmente diluindo cada uma até a concentração recomendada pelo fabricante. O sequenciamento foi realizado em três execuções independentes, o primeiro em uma plataforma MiSeq e os próximos dois em um NextSeq 500. Um total de 23 bibliotecas foram agrupadas equimolarmente e foram carregadas em um MiSeq Reagent Kit v2 de 500 ciclos (Illumina) e um par o sequenciamento final (2 × 250 bp) foi realizado. Um total de 40 e 80 bibliotecas foram agrupadas equimolarmente em duas execuções

independentes e foram carregadas em kits de reagentes NextSeq v2 (Illumina) de 300 ciclos de produção média (2x150 bp).

3.4.4 Análises de Bioinformática

O controle de qualidade do genoma e as montagens foram realizadas pelo CLC Genomics Workbench versão 7.0 (Aarhus, Dinamarca). O tipo de sequência multilocus (MLST), resistome e virulome foram identificados usando MLST v2.0 (Larsen et al., 2012), ResFinder v3.1 (Bortolaia et al., 2020), VirulenceFinder v2.0, (Joensen et al., 2014), PlasmidFinder v2.1 (Carattoli et al., 2014), FimTyper v1.0 (Roer et al., 2017) e SerotypeFinder v.2.0 (Joensen et al., 2015), respectivamente. O banco de dados BacMet (Pal et al., 2013) foi usado para identificar biocidas e metais pesados (HM). O EnteroBase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) foi usado para criar um projeto de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) para cepas que apresentassem os mesmos STs, cujos genomas foram alinhados contra genomas de outros estudos brasileiros.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram incluídos em artigo científico.

Artigo I: Genomic landscape reveal insights of high-risk clones of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from community infections and commercial meat in Southern Brazil

Artigo I

Genomic landscape reveal insights of high-risk clones of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from community infections and commercial meat in Southern Brazil

ABSTRACT

During a microbiological and genomic surveillance study conducted to investigate the molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections (UTI) and commercial meat samples, in a Brazilian city with high occurrence of infections by ESBL-producing bacteria, we have identified the presence of CTX-M (-55, -27, -24, -15, -14 and -2)-producing *Escherichia coli* belonging to the international clones ST354, ST131, ST117 and ST38. In this regard, the ST131 was more prevalent in human samples, and worryingly the high-risk ST131-C1-M27 was identified in human infections for the first time. On the other hand, whereas CTX-M-55-producing *E. coli* ST117 was identified in meat samples (i.e., chicken and pork) and in human infections. Moreover, we have identified for the first time the presence of the CTX-M-24-positive *E. coli* ST354 from UTI, in Brazil. In brief, our results suggest a potential of commercialized meat as a reservoir of high-priority *E. coli* lineages in the community, whereas the identification of *E. coli* ST131-C1-M27 denotes that novel pandemic clones have emerged in Brazil, constituting a public health issue.

Keywords: *Escherichia coli*, one health, WGS, food-producing, ST131, ST648, resistome.

INTRODUCTION

Escherichia coli is a commensal of our intestinal tract of most warm-blooded mammals, and it is also an important human pathogen. Urinary tract infection (UTI) is the second most common bacterial infection managed in primary care, and uropathogenic *E. coli* (UPEC) is responsible for 75% to 95% of the cases¹. It is estimated that half of the women will have at least one UTI during their lifetimes and there is a 25% risk for the development of recurrent disease in the future, generating a high annual expenditure on healthcare services^{2,3}.

Antimicrobial resistance (AMR) is a primary global public health concern that may compromise the effective treatment in humans infections, being responsible for a large number of morbidity and mortality⁴. The excessive use of antimicrobials in livestock is one of the practices that help in the emergence of pathogens resistant to humans. The consumption of meat, direct contact with colonized animals or manure spread in the environment are sources for the transmission of livestock AMR to humans^{5,6}. Besides that, AMR gene transfer may occur between different bacterial species in the gut of animals and humans⁷.

Infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli* represent significant healthcare and their isolation from food-production animals are increased worldwide, mostly from chicken meat^{8,9}. The CTX-M type is one of the largest groups of ESBL, and although little is known about the epidemiology of these enzymes in Brazil, recent studies show that CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 and CTX-M-15 are the predominant variants in the country¹⁰⁻¹².

Many types of CTX-M-producing *E. coli* have been recognized as belonging to specific clones that are commonly isolated from UTI cases originating in a particular locale, country or even globally. Furthermore, some studies show that isolates from foods CTX-M genotypes sometimes correspond with the locally dominant human types^{13,14}. Considering the emerging AMR in Brazil, both in human medicine as in livestock, and the need for unpublished studies on the topic, we conducted next-generation sequencing (NGS)-based analysis of *E. coli* isolates from meat products and human patients to assess national or international transmission of CTX-M-producing *E. coli*.

MATERIAL AND METHODS

Study population

During a surveillance study from June 2016 to May 2019, a collection of 22.698 *E. coli* strains was obtained from urine culture of community women patients assisted by public health services, and it was diagnosed that 1.389 were ESBL-producing. Concomitantly, from January to May 2019, 100 *E. coli* strains were isolated from chicken meat (n=50), and pork (n=50) bought at markets and butcher shops. Markets and butcher shops were selected according to the location of public health services, all located in different regions of Londrina, a city in the state of Paraná, South Brazil. The study was approved by the Ethics and Research Committee of the State University of Londrina CAAE 56869816.0.0000.5231.

Of the total of isolates, 91 *E. coli* strains were selected for this study, being 59 isolated from urine culture and 32 isolated from chicken meat (n=24) and pork (n=8). The strains were chosen through the similarity profile by ERIC-PCR analysis.

Microbiological methods

Urine collected from women patient was inoculated on CHROMagar (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and MacConkey (Merck, Darmstadt, Germany) plates using a calibrated inoculating loop with a capacity of 10 μ l and incubated at 37°C for 24h.

E. coli from chicken meat and pork, the samples were dipped in Brain Heart Infusion broth (Oxoid) with cefotaxime (4 μ g / mL), ciprofloxacin (4 μ g / mL) and both (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) to selected resistant strains. After incubation, the solution was inoculated in the same way used for urine samples. All the isolates were kept in Tryptic Soy Broth (TSB) with 15% glycerol (-20°C).

The identification and bacterial susceptibility were by automated VITEK® 2 system, using the VITEK® 2 AST 239 card and the VITEK® 2 GN ID card, all from bioMérieux, USA. The bacterial susceptibility was tested by 14 beta-lactam and non-beta-lactam antibiotics: ampicillin, amoxicillin/clavulanate, ceftriaxone, cefepime, ertapenem, meropenem, nalidixic acid, ciprofloxacin, norfloxacin, gentamicin, amikacin nitrofurantoin, trimethoprim-sulfamethoxazole and piperacillin-tazobactam. The CLSI 2020 (Clinical and Laboratory Standards

Institute) criteria were used as parameters for interpretation. *E. coli* ATCC25922 was used as a quality control strain.

ERIC-PCR

ESBL-producing isolates were subjected to Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR), by VERSALOVIC et al. (1991)³⁴. Analysis of genomic fingerprinting was performed using GelJ v.2.0 software by the Dice similarity method (HERAS et al., 2015)³⁵. Strains were considered genetically related if the similarity index was $\geq 85\%$.

DNA isolation and whole-genome sequencing

For DNA extraction, strains were grown on Mueller-Hinton Agar for overnight at 37 °C. Subsequently, a single colony was inoculated in 2 mL of Luria-Bertani broth for 12 hours at 37 °C. The suspension was used to continue extraction and purification by the DNA extraction kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Then the extracted DNA was quantified by Qubit dsDNA (double-stranded DNA) BR assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). After quantification, the DNA was used to construct a paired-end library (150 bp), which was sequenced using the NextSeq platform (Illumina). The instructions of each manufacturer were followed in all steps.

Bioinformatic analysis

Genome quality filter and assemblies were performed by the CLC Genomics Workbench version 7.0 (Aarhus, Denmark). Multilocus sequence type (MLST), resistome and virulome were identified using MLST v2.0 (Larsen et al., 2012), ResFinder v3.1 (Bortolaia et al., 2020), VirulenceFinder v2.0, (Joensen et al., 2014), PlasmidFinder v2.1 (Carattoli et al., 2014), FimTyper v1.0 (Roer et al., 2017) and SerotypeFinder v.2.0 (Joensen et al., 2015), respectively. The BacMet database (Pal et al., 2013) was used to identify biocides and heavy metal (HM)^{31,36–42}. The Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) were used to create a single nucleotide polymorphisms (SNPs) project to strains that showed the same STs, which these genomes were aligned against genomes of others Brazilian studies.

RESULTS

The results for each of 91 *E. coli* isolates included in this study can be seen in **Figure 1**. It is notorious high rates of resistance to ampicillin (100%), ceftriaxone (87.91%), nalidixic acid (87.91%), cefepime (83.52%), trimethoprim-sulfamethoxazole (82.42%), nitrofurantoin (76.92%), norfloxacin (75.82%) and ciprofloxacin (72.53%). Less than half showed resistance to gentamicin (36.26%) and amoxicillin/clavulanate (21.98%). Only three (3.30%) isolates were resistant to piperacillin-tazobactam and two (2.20%) to amikacin. Some isolates also showed intermediate levels of resistance: 28.57% to amoxicillin/clavulanate; 4.40% to piperacillin-tazobactam and gentamicin; 1.10% to ciprofloxacin and norfloxacin.

Genome analysis revealed 57 genes that provide resistance to the classes of aminoglycosides (n = 15), beta-lactams (n = 12), trimethoprim (n = 8), phenicols (n = 5), tetracyclines (n = 4), macrolides (n = 4), sulfonamides (n = 3), quinolones (n = 3), lincosamides (n = 2) and fosfomycin (n = 1). Regarding aminoglycosides, the most prevalent genes were strA and strB, both with 39.56%, followed by the aadA1 gene (36.26%). The dfrA17 and dfrA1 genes, responsible for resistance to trimethoprim, were detected in 31 (34.07%) and 13 (14.29%) isolated, respectively. Genes related to phenicols had similar prevalence, being catB3 (8.79%), floR (5.49%), catA1 (4.40%) and cmlA1 (4.40%). Resistance to tetracyclines was caused predominantly by the genes tet (A) (38.46%) and tet (B) (27.47%), macrolides by the gene mph (A) (29.67%) and sulfonamides by sul1 (56.04%) and sul2 (53.85%). Few isolates had lincosamide resistance genes, two of them having lnu (F) (2.20%) and one lnu (A) (1.10%). The fosA gene was found in three isolates and was the only one responsible for fosfomycin resistance.

The genes associated with resistance to beta-lactams were *bla*_{TEM-1B} (48.35%), *bla*_{OXA-1} (7.69%), *bla*_{CMY-2} (6.59%) and *bla*_{TEM-1B} (2.20 %), in addition to eight different ESBL-types. The ESBL with the highest rates was CTX-M-55 found in a total of 20 isolates (21.98%), mainly from chicken meats (n = 10), followed by humans (n = 6) and porks (n = 4). The CTX-M-15 was found predominantly in human isolates (n = 14) and only in one pork isolate. On the other hand, CTX-M-2 was also detected in 15 isolates (16.48%), being them chicken meat (n = 7), human (n = 6) and pork (n = 2). The CTX-M-8 and CTX-M-14 genes were present in eight and five human isolates, and two and one chicken meat isolates, respectively. The CTX-M-24 (n = 4), CTX-M27 (n = 3) and CTX-M-3 (n = 1) genes were present only in human isolates.

In this work, 52 incompatibility groups were found, being within the p0111, IncF, IncI1 and IncN family. In human urine isolates, the most frequent pMLST were IncI1[ST-113] (n=9), IncF[F-: A-: B-] (n=7), IncF[F1: A2: B20] (n=5), IncF[F48: A1: B49] (n=5) and p0111 (n=5). In chicken isolates, IncF[F18: A-: B1] (n=8), p0111 (n=7) and IncN [Unknown ST] (n=5) were the most frequent pMLST. In isolates of pigs, the most frequent incompatibility groups were IncN[Unknown ST] (n=4) and IncF[F33: A-: B1] (n=3).

In total, 40 different STs were found, the most present being ST131 (n = 12), ST38 (n = 8), ST648 (n = 7) and ST354 (n = 6). Some STs were the same in different origins, demonstrating a clonal relationship between them, mainly between humans and chicken meat. The ST38, ST131, ST354 and ST1196 were seen in both urine and chicken meat strains in the respective quantities of 5 and 3, 12 and 1, 4 and 3 and 1 and 1. The ST410 was uniquely found in urine strains (n = 1) and pork (n = 1). The only ST that was present in the three origins studied was ST117, with 2 strains of urine, one of chicken meat and one of pork. The clonal relationship between the isolates in this study and other isolates in Brazil can be seen in **Figure 2**.

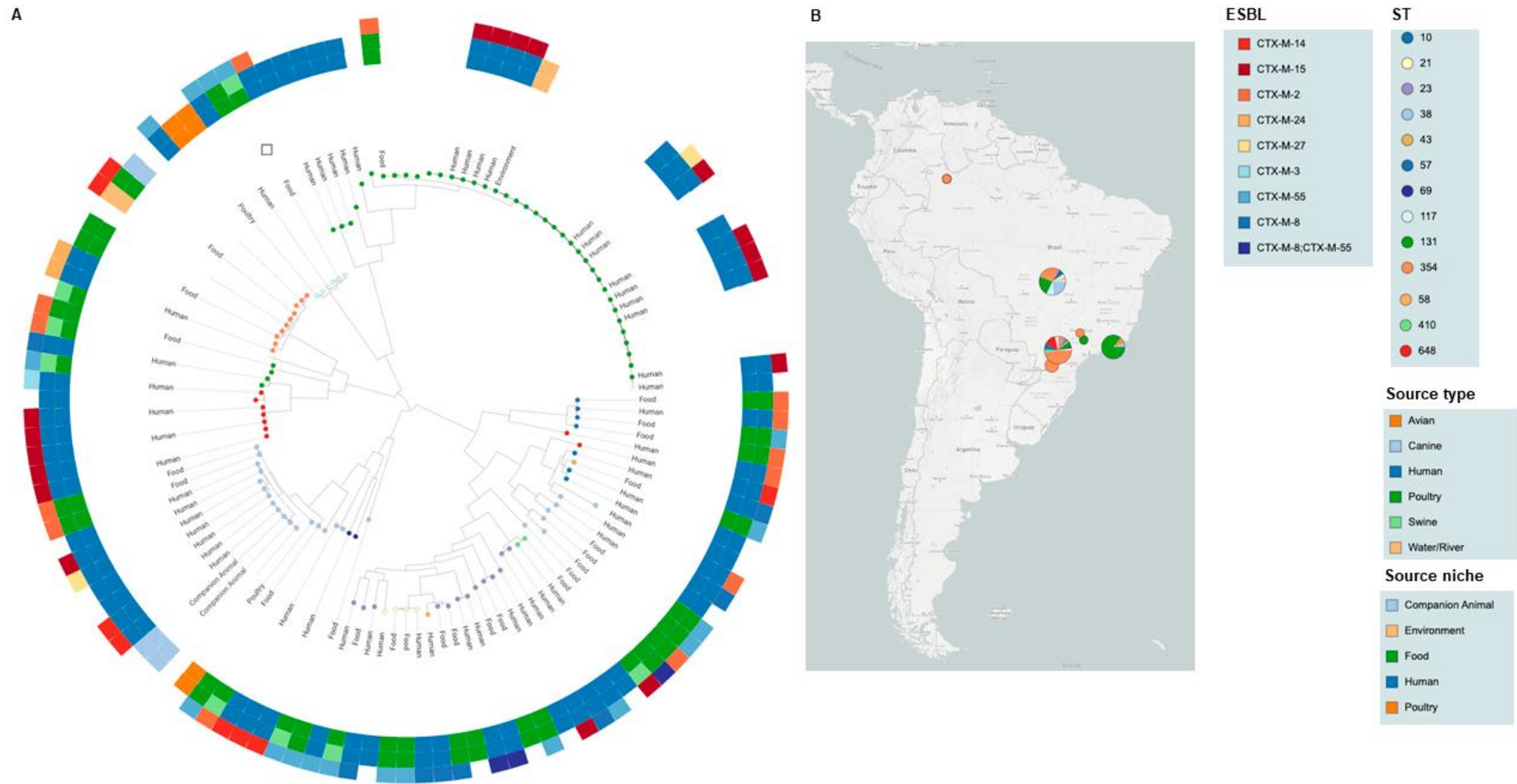


Figure 2. Phylogenomic SNP tree and *E. coli* dissemination map in Brazil

DISCUSSION

This study presents the first reports of *E. coli* ST131-C1-M27 in human infection and also CTX-M-24-positive *E. coli* ST354 from ITU, in Brazil. In Latin America CTX-M-producing *E. coli* are endemic and our data show a wide distribution of these belonging to the international clones in agriculture and in the community. The extensive presence of CTX-M enzyme-producing strains in several sources raises the hypothesis that the spread is occurring with greater frequency and efficiency, especially among enterobacteria¹⁰.

E. coli ST131 is globally known and is related to the spread of resistance genes, including specific CTX-M genes¹⁵. Recent studies have shown that ST131 is rare among animal isolates, becoming almost exclusively a human pathogen, as shown by our results, where ST131 is predominantly found in strains of human urine¹⁶. The subclade C2 is associated with CTX-M-15 and can be carried by different groups of plasmids¹⁷. Here we also observe that all *bla*_{CTX-M-15} genes are involved with the incompatibility group IncF. In a study by Peirano et al. (2020), it was shown that clade C was related to highest rates of UTI, with subclade C2 being the most common and associated with incompatibility group IncFII¹⁸. In addition, CTX-M-15-positive *E. coli* ST131 has already been shown to be involved in outbreaks in health institutions and is the most prevalent ESBL worldwide¹⁹.

The CTX-M-27-producing ST131-C1 has been considered a new epidemic clone and there have been no reports of human infections so far, in Brazil. Clade C1-M27 is associated with CTX-M-27 and was first observed as colonizing children in France, in 2012. Recent studies suggest that the subclade C1-M27 was recently selected, since SNPs have a smaller difference between isolates of this same subclade when compared to SNPs of isolates of subclades C2 and A. In addition, the pMLST predominantly involved with dissemination is IncF[F1:A2:B20], as found in our study. Resistance to fluoroquinolones, macrolides, tetracyclines, aminoglycosides and sulfonamides appears to be part of the profile of C1-M27 isolates^{20,21}.

Within the CTX-M-9 group, CTX-M-14 and CTX-M24 are part. Although the first is widely distributed worldwide, especially China, South-East Asia, Japan, South Korea and Spain, microorganisms producing CTX-M-24 remain relatively rare to be detected, being reported with greater incidence in countries such as Peru and Bolivia^{18,22,23}. That way, one of the important findings in these works is

the association between CTX-M-24-positive *E. coli* ST354 found in two human isolates, never before reported in UTI in Brazil. In a study by Dagher et al. (2018), ST354 isolates were CTX-M-24-positives and resistant to ciprofloxacin, being associated with extra-intestinal infections between animals and humans, reinforcing the zoonoanthropotic hypothesis of these clones²⁴.

ESBL type CTX-M-2 and CTX-M-55 are frequently found and are disseminated in several media. Some studies suggest that the plasmid IncF[F33: A-: B-] is involved in the dissemination of these genes, which may explain the coexistence of these two genes in ST1725 in two of our urine samples²⁵. Although *E. coli* ST6448 found in a chicken meat isolate also showed the coexistence of CTX-M-2 and CTX-M-5, the pMLST involved was IncF[F24: A-: B73] and IncI1[ST-131]. In the last ten years, IncI1-type plasmids have had a high spread, mainly in animal reservoirs. There are reports of *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8} and *bla*_{CTX-M-55} genes frequently found on IncI plasmids of *E. coli* isolated from chickens and pigs in several countries, such as China, France, United States and the United Kingdom^{26–28}.

The international clone ST117, the only ST found in the three different origins of the isolates in this study, is often found in chicken meat and pork and is associated with infections in humans. Studies have already reported the multiple resistance profile of ST117 and associated it with CTX-M-55 expression, consistent with our results^{29,30}. Likewise, ST38 is also widely found in chickens and humans, worldwide, and is associated with several ESBL genes, such as *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-27} and *bla*_{CTX-M-55}. One of the hypotheses for the great dissemination of these genes among the clones is the fact that the families of plasmids IncI1 and IncF are important vectors for the dissemination of *bla*_{CTX-M}. In China, South Korea and Japan, studies suggest an epidemic of *bla*_{CTX-M} genes by plasmids IncI1, IncF[F33: A-: B-], IncF[F46: A-: B20] and IncF[F18: A-: B1], found in cattle, pigs, chickens, pets and humans^{31–33}.

In conclusion, *E. coli* carrying *bla*_{CTX-M} genes from different origins seem to be related to the spread of internationally known clones (ST354, ST131, ST117, ST38). The fact that some variants of the gene (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-24}, *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{CTX-M-55}) and STs are more present in some sources than others, it may represent that isolates producing CTX-M enzymes are entering sources previously exclusive to a species. Thus,

studies should continue to be carried out with a large number of samples and sources for further clarification regarding the dissemination of resistance genes in animal sources and their relationship with human health.

REFERENCES

1. Subashchandrabose, S. & Mobley, H. L. T. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic Escherichia coli. *Microbiol. Spectr.* **3**, 235–261. doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012 (2015).
2. Asadi Karam, M. R., Habibi, M. & Bouzari, S. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic Escherichia coli. *Mol. Immunol.* **108**, 56–67. doi: 10.1016/j.molimm.2019.02.007 (2019).
3. Conover, M. S. *et al.* Metabolic requirements of Escherichia coli in intracellular bacterial communities during urinary tract infection pathogenesis. *MBio* **7**, 1–13. doi: 10.1128/mBio.00104-16 (2016).
4. Allcock, S. *et al.* Antimicrobial resistance in human populations: Challenges and opportunities. *Glob. Heal. Epidemiol. Genomics* **2**. doi: 10.1017/ghg.2017.4 (2017).
5. Clifford, K. *et al.* Antimicrobial resistance in livestock and poor quality veterinary medicines. *Bull. World Health Organ.* **96**, 662–664. doi: 10.2471/BLT.18.209585 (2018).
6. Gozi, K. S. *et al.* Dissemination of multidrug-resistant commensal escherichia coli in feedlot lambs in southeastern Brazil. *Front. Microbiol.* **10**. doi: 10.3389/fmicb.2019.01394 (2019).
7. Paphitou, N. I. Antimicrobial resistance: Action to combat the rising microbial challenges. *Int. J. Antimicrob. Agents* **42**, S25–S28. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.04.007 (2013).
8. Poirel, L. *et al.* Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. *Antimicrob. Resist. Bact. from Livest. Companion Anim.* 289–316. doi: 10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017 (2018).
9. Reid, C. J., McKinnon, J. & Djordjevic, S. P. Clonal st131-h22 Escherichia coli strains from a healthy pig and a human urinary tract infection carry highly similar resistance and virulence plasmids. *Microb. Genomics* **5**. doi: 10.1099/mgen.0.000295 (2019).
10. Cyoia, P. S. *et al.* Distribution of ExPEC virulence factors, blaCTX-M, fosA3, and mcr-1 in Escherichia coli isolated from commercialized chicken carcasses. *Front. Microbiol.* **10**, 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2018.03254 (2019).

11. Daga, A. P. *et al.* Escherichia coli Bloodstream Infections in Patients at a University Hospital: Virulence factors and clinical characteristics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**. doi: 10.3389/fcimb.2019.00191 (2019).
12. Irrgang, A. *et al.* CTX-M-15-producing E. coli isolates from food products in Germany are mainly associated with an IncF-type plasmid and belong to two predominant clonal E. coli lineages. *Front. Microbiol.* **8**. doi: 10.3389/fmicb.2017.02318 (2017).
13. Gonçalves, L. F. *et al.* Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli causing community-acquired urinary tract infection in the Central-Western Region, Brazil. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **6**, 1–4. doi: 10.1016/j.jgar.2016.02.003 (2016).
14. Silva, N. *et al.* Genetic characterisation of extended-spectrum β -lactamases in Escherichia coli isolated from retail chicken products including CTX-M-9 containing isolates: A food safety risk factor. *Br. Poult. Sci.* **53**, 747–755. doi: 10.1080/00071668.2012.740554 (2012).
15. Kondratyeva, K., Salmon-Divon, M. & Navon-Venezia, S. Meta-analysis of Pandemic Escherichia coli ST131 Plasmidome Proves Restricted Plasmid-clade Associations. *Sci. Rep.* **10**, 1–11. doi: 10.1038/s41598-019-56763-7 (2020).
16. Pitout, J. D. D. & DeVinney, R. Escherichia coli ST131: A multidrug-resistant clone primed for global domination. *F1000Research* **6**, 1–7. doi: 10.12688/f1000research.10609.1 (2017).
17. Coque, T. M. *et al.* Dissemination of clonally related E.coli strains expressing ESBL CTX-M-15. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 195–200. doi: [10.3201/eid1402.070350](https://doi.org/10.3201/eid1402.070350) (2008).
18. Peirano, G. & Pitout, J. D. D. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs* **79**, 1529–1541. doi: 10.1007/s40265-019-01180-3 (2019).
19. Nicolas-Chanoine, M. H. *et al.* Intercontinental emergence of Escherichia coli clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 273–281. doi: 10.1093/jac/dkm464 (2008).
20. Birgy, A. *et al.* Acrossm of the Emergence and Dominance of Escherichia coli Sequence. 1–10. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00382-19> (2019).
21. Fernandes, M. R. *et al.* Emergence of CTX-M-27-producing Escherichia coli of ST131 and clade C1-M27 in an impacted ecosystem with international maritime traffic in South America. *J. Antimicrob. Chemother.* **75**, 1647–1649. doi: 10.1093/jac/dkaa069 (2020).
22. Song, J., Oh, S. S., Kim, J. & Shin, J. Extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli isolated from raw vegetables in South Korea. *Sci. Rep.* **10**, 1–7. doi: 10.1038/s41598-020-76890-w (2020).

23. Delgado, D. Y. C., Barrigas, Z. P. T., Astutillo, S. G. O., Jaramillo, A. P. A. & Ausili, A. Detection and molecular characterization of β -lactamase genes in clinical isolates of Gram-negative bacteria in Southern Ecuador. *Brazilian J. Infect. Dis.* **20**, 627–630. doi: 10.1016/j.bjid.2016.07.001 (2016).
24. Dagher, C. *et al.* Molecular characterization of carbapenem resistant escherichia coli recovered from a tertiary hospital in Lebanon. *PLoS One* **13**, 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0203323 (2018).
25. C., Cunha, M. P. V, Lincopan, N., Cerdeira, L. & Esposito, F. Coexistence of CTX-M-2, CTX-M- 55, CMY-2, FosA3, and QnrB19 in extraintestinal pathogenic Escherichia coli from poultry in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 1–3 (2017).
26. Song, J., Oh, S. S., Kim, J., Park, S. & Shin, J. Clinically Relevant Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing Escherichia coli Isolates From Food Animals in South Korea. *Front. Microbiol.* **11**, 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2020.00604 (2020).
27. Castellanos, L. R. *et al.* High heterogeneity of Escherichia coli sequence types harbouring ESBL/AmpC genes on IncI1 plasmids in the Colombian poultry chain. *PLoS One* **12**, 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0170777 (2017).
28. Ferreira, J. C., Penha Filho, R. A. C., Andrade, L. N., Berchieri Junior, A. & Darini, A. L. C. Evaluation and characterization of plasmids carrying CTX-M genes in a non-clonal population of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from poultry in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **85**, 444–448. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.011 (2016).
29. Cormier, A. *et al.* Diversity of CTX-M-positive Escherichia coli recovered from animals in Canada. *Vet. Microbiol.* **231**, 71–75. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.02.031 (2019).
30. Norizuki, C. *et al.* Detection of Escherichia coli producing CTX-M-1-group extended-spectrum β -lactamases from pigs in Aichi Prefecture, Japan, between 2015 and 2016. *Jpn. J. Infect. Dis.* **71**, 33–38. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.206 (2018).
31. Lupo, A., Saras, E., Madec, J. Y. & Haenni, M. Emergence of bla CTX-M-55 associated with fosA, rmtB and mcr gene variants in Escherichia coli from various animal species in France. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 867–872. doi: 10.1093/jac/dkx489 (2018).
32. Fernandes, M. R., Sellera, F. P., Moura, Q., Souza, T. A. & Lincopan, N. Draft genome sequence of a CTX-M-8, CTX-M-55 and FosA3 co-producing Escherichia coli ST117/B2 isolated from an asymptomatic carrier. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **12**, 183–184. doi: 10.1016/j.jgar.2018.01.015 (2018).
33. Xia, L. *et al.* Prevalence of ST1193 clone and IncI1/ST16 plasmid in E-coli isolates carrying blaCTX-M-55 gene from urinary tract infections patients in China. *Sci. Rep.* **7**, 1–8. doi: 10.1038/srep44866 (2017).

34. Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J. R. & Plaza, O. B. Institute for Molecular Genetics and department of Pediatrics , Baylor College of Medicine ,. *Cell* **19**, 6823–6831 (1991).
35. Heras, J. *et al.* GelJ - a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics* **16**, 1–8. doi: 10.1186/s12859-015-0703-0 (2015).
36. Larsen, M. V. *et al.* Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1355–1361. doi: 10.1128/JCM.06094-11 (2012).
37. Bortolaia, V. *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* **75**, 3491–3500. doi: 10.1093/jac/dkaa345 (2020).
38. Kleinheinz, K. A., Joensen, K. G. & Larsen, M. V. Applying the ResFinder and VirulenceFinder web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and E. coli virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences . *Bacteriophage* **4**, e27943. doi: 10.4161/bact.27943 (2014).
39. Carattoli, A. *et al.* In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 3895–3903. doi: 10.1128/AAC.02412-14 (2014).
40. Roer, L. *et al.* Development of a web tool for Escherichia coli subtyping based on fimh alleles. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 2538–2543. doi: 10.1128/JCM.00737-17 (2017).
41. Joensen, K. G., Tetzschner, A. M. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M. & Scheutz, F. Rapid and easy in silico serotyping of Escherichia coli isolates by use of whole-genome sequencing data. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 2410–2426. doi: 10.1128/JCM.00008-15 (2015).
42. Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Rensing, C., Kristiansson, E. & Larsson, D. G. J. BacMet: Antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic Acids Res.* **42**, 737–743 doi: 10.1093/nar/gkt1252 (2014).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir:

- a maioria das *E. coli* isoladas foram classificadas como multirresistentes;
- o gene mais comum associado à resistência aos β -lactâmicos é *bla*_{TEM-1B};
- a *E. coli* ST117 produtora de CTX-M-55 foi identificada nas três origens estudadas;
- o gene de ESBL mais prevalente em humanos foi *bla*_{CTX-M-15}, estando relacionada com ST131;
- ST38, ST131, ST354 e ST1196 foram detectados somente em isolados de urina e carne de frango;
- entre isolados de urina e de carne de suínos, o ST410 foi identificado;
- há uma variedade de clones de *E. coli* produtora de ESBL entre isolados de urina e carnes de frango e suíno para consumo, indicando que a disseminação de genes de resistência pode ocorrer entre as diversas origens.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E., CHAIN, E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. **Nature**, 146, 837, 1940.
- ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal) Relatório Anual, 2020. Disponível em: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf. Acesso em 16 de abril 2021.
- ADEGOKE, A. A. *et al.* Antibigram and beta-lactamase genes among cefotaxime resistant *E. coli* from wastewater treatment plant. **Antimicrob Resist Infect Control**, 9, 46, 2020.
- AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. **Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.
- BERENDONK, T. U. *et al.* Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 310, 2015.
- BEZERRA, W. G. A. *et al.* Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. **Archivos de Zootecnia**, v. 66, n. 254, p. 301-307, 2017.
- BEVAN, E. R.; JONES, A. M.; HAWKEY, P. M. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. **J. Antimicrob. Chemother.** 72, 2145–2155, 2017.
- BLAAK, H. *et al.* Distribution, numbers, and diversity of 36 ESBL-producing *E. coli* in the poultry farm environment. **PloS One**, v. 10, n. 8, p. e0135402, 2015.
- BONOMO, R. A. β -Lactamases: a focus on current challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 1, p. a025239, 2017.
- BUSH, K. Characterization of β -lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.33, n.3, p.259-263, 1989.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.
- CARNEVALI, C. *et al.* Occurrence of mcr-1 in colistin-resistant *Salmonella enterica* isolates recovered from humans and animals in Italy, 2012 to 2015. **Antimicrob. Agents Chemother.** 60, 7532–7534, 2016.
- CLERMONT, O. *et al.* Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. **Environmental microbiology**, 21(8), 3107-3117, 2019.
- CYOIA, P. S. *et al.* Distribution of ExPEC virulence factors, blaCTX-M, fosA3, and mcr-1 in *Escherichia coli* isolated from commercialized chicken carcasses. **Front. Microbiol**, 10, 1–9, 2019.

DADGOSTAR, P. Antimicrobial resistance: implications and costs. **Infect. Drug Resist.** 12, 3903–3910, 2019.

DALE, A. P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. **Journal of Infection**, v. 71, n. 6, p. 615–626, 2015.

DE CARVALHO, M. P. N. *et al.* International clones of extended-spectrum β -lactamase (CTX-M)-producing *Escherichia coli* in peri-urban wild animals, Brazil. **Transbound. Emerg. Dis.** 67, 1804–1815, 2020.

DEMIRAL, I. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome pathway by uropathogenic *Escherichia coli* is virulence factor-dependent and influences colonization of bladder epithelial cells. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 8, 1–14, 2018.

DHILLON, R.H.-P.; CLARK, J. ESBLs: a clear and present danger? **Critical Care Research and Practice**, v. 2012, p. 1 - 11, 2011.

DIERIKX, C., GOOT, J., ESSEN-ZANDBERGEN, A., MEVIUS, D. J. Dynamics of cefotaxime resistant *Escherichia coli* in broilers in the first week of life. **Veterinary Microbiology**, v. 222, p. 64-68, 2018.

DONNENBERG, M. *Escherichia coli*: pathotypes and principles of pathogenesis. **Academic Press**, 2^o ed., p. 621, 2013.

ENSOR, V. *et al.* Isolation of quinolone-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from raw chicken meat sold in retail outlets in the West Midlands, UK. **Clinical Microbiology and Infection**, 13, 274-5, 2007.

FASUGBA, O. *et al.* Ciprofloxacin resistance in community- and hospital-acquired *Escherichia coli* urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 545, 2015.

FLAMENT-SIMON, S. C. *et al.* Clonal structure, virulence factor-encoding genes and antibiotic resistance of *Escherichia coli*, causing urinary tract infections and other extraintestinal infections in humans in Spain and France during 2016. **Antibiotics**, 9, 1–17, 2020.

FROST, I. *et al.* Global geographic trends in antimicrobial resistance: the role of international travel. **J Travel Med**, 2019.

GROHN, Y. T *et al.* A proposed analytic framework for determining the impact of an antimicrobial resistance intervention. **Anim. Health Res. Rev.** 18, 1–25, 2017.

HATTON, N. E.; BAUMANN, C. G.; FASCIONE, M. A. Developments in Mannose-Based Treatments for Uropathogenic *Escherichia coli*-Induced Urinary Tract Infections. **ChemBioChem**, 22, 613–629, 2021.

HOOTON, T.M. Uncomplicated urinary tract infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, p.1028-1037, 2012.

- HUTTON, T. A. *et al.* Phylogroup and virulence gene association with clinical characteristics of *Escherichia coli* urinary tract infections from dogs and cats. **J. Vet. Diagnostic Investig**, 30, 64–70, 2018.
- KAESBOHRER, A. *et al.* Diversity in prevalence and characteristics of ESBL/pAmpC producing *E. coli* in food in Germany. **Veterinary Microbiology**, 233, 52–60, 2019.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123–140, 2004.
- KIM, D. H. *et al.* Virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection in Korea. **Genes & genomics**, 40(6), 625-634, 2018.
- KIRCHHELLE, C. Toxic confusion: the dilemma of antibiotic regulation in West German food production (1951–1990). **Endeavour**, 40, 114–127, 2016.
- KLEIN, E. Y. *et al.* Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, 115(15), 3463-3470, 2018
- KOGA, V. L. *et al.* Characterization of CMY-2-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses and human infection in a city of South Brazil. **BMC microbiology**, v. 19, n. 1, p. 174, 2019.
- KÖHLER, C. D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 642–647, 2011.
- LA COMBE, B. *et al.* Pneumonia-specific *Escherichia coli* with distinct phylogenetic and virulence profiles, France. **Emerging Infectious Diseases**, 2012–2014, 2019.
- LAMMIE, S. L., HUGHES, J. M. Antimicrobial resistance, food safety, and one health: the need for convergence. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.7, p. 287-312, 2016.
- LANDERS, T. F. *et al.* A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy and potential. **Public Health Reports**, v. 127, n. 1, p. 4-22, 2015.
- LARA, F. B. M. *et al.* Virulence markers and phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains with hybrid EAEC/UPEC genotypes recovered from sporadic cases of extraintestinal infections. **Front. Microbiol.** 8, 1–11, 2017.
- LUDDEN, C. *et al.* One health genomic surveillance of *Escherichia coli* demonstrates distinct lineages and mobile genetic elements in isolates from humans versus livestock. **Bio**, 2019.
- MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTACIMENTO). Legislação – Alimentação Animal. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos->

pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/uso-responsavel-de-antimicrobianos. Acesso em: 16 de abril de 2020.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTACIMENTO). Legislação – Alimentação Animal. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/legislacao/agroprevine>. Acesso em: 16 de abril de 2020.

MASAJTIS-ZAGAJEWS, A.; NOWICKI, M. New markers of urinary tract infection. **Clin. Chim. Acta**, 471, 286–291, 2017.

MAYNOU, G.; BACH, A., TERRÉ, M. Feeding of waste milk to Holstein calves affects antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* isolated from fecal and nasal swabs. **J Dairy Sci**, 100, 2682-2694, 2017.

MCEWEN, S.A.; COLLIGNON, P.J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. In Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals, 2018.

MELO, L. C. *et al.* Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-producing *Enterobacteriaceae* in healthy and diseased companion animals in Brazil. **Vet. Microbiol.** 221, 59–66, 2018.

MÉRIC, G. *et al.* From Escherich to the *Escherichia coli* genome. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 634-636, 2016.

MORA-RILLO, M. *et al.* Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. **Virulence**, v. 6, n. 1, p. 93–100, 2015.

NAGAMATSU, K. *et al.* Dysregulation of *Escherichia coli* α -hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 112, E871–E880, 2015.

NADON, C. *et al.* PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 23, 2017.

NESME, J.; SIMONET, P. The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. **Environ Microbiol**, 17, 913-930, 2017.

NUESCH-INDERBINEN, M. *et al.* Raw meat -based diets for companion animals: a potential source of transmission of pathogenic and antimicrobial resistant *Enterobacteriaceae*. **Royal Society Open Science**, 6, 191-170, 2019.

PANA, Z. D.; ZAOUTIS, T. Treatment of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBLs) infections: what have we learned until now?. **F1000Research**, 7, 1347, 2021.

- PEDROSO, C. R. et al. Inactivation of indicator microorganisms of faecal contamination by ultraviolet radiation and evaluation of photoreactivation and dark repair phenomena. **Eng. Sanit. e Ambient.** 23, 987–994, 2018.
- PEIRANO, G. et al. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 58, 305-9, 2006.
- PITOUT, J.D.D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 1 – 7, 2012.
- RASEALA, C. M.; EKWANZALA, M. D.; MOMBA, M. N. B. Multilocus-based phylogenetic analysis of extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* O157:H7 uncovers related strains between agriculture and nearby water sources. **J. Infect. Public Health**, 13, 1899–1906, 2020.
- RIAÑO, I. et al. Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Salmonella enterica* strains of health food animals in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 58:844-7, 2016.
- ROCHA, F. R., PINTO, V. P., BARBOSA, F.C. The spread of CTX-M-Type extended spectrum beta-Lactamases in Brazil: A systematic Review. **Microb Drug Resist** 22, 301-311, 2016.
- ROBERTSON, J. et al. Antimicrobial medicines consumption in Eastern Europe and Central Asia – an updated cross-national study and assessment of quantitative metrics for policy action. **Front Pharmacol**, 9, 1156, 2019.
- SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 31–37, 2016.
- SORLOZANO, A. et al. Evolution of their resistance to antibiotic of involved in urinary tract infections: A 7-year surveillance study. **American Journal Infection Control**, v. 42, p. 1033-1038, 2014.
- SPAULDING, C. N.; HULTGREN, S. J.. Adhesive pili in UTI pathogenesis and drug development. **Pathogens**, 5:30, 2016.
- TALAN, D. A. et al. Fluoroquinolone-Resistant and Extended-Spectrum β -Lactamase– Producing *Escherichia coli* Infections in Patients with Pyelonephritis, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 9, 2017.
- TERLIZZI, M. E., GRIBAUDO, G. & MAFFEI, M. E. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: Virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. **Front. Microbiol.** 8, 2017.

VACAHVANICHSANONG, P.; MCNEIL, E.; DISSANEEWATE, P. Extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infections. **Epidemiology and Infection**, 149, 12, 2021.

VAN DER MEE-MARQUET, N. L. *et al.* Marked increase in incidence for bloodstream infections due to *Escherichia coli*, a side effect of previous antibiotic therapy in the elderly. **Front. Microbiol.** 6, 2015.1.

VAN PUYVELDE, S.; DEBORGGRAEVE, S.; JACOBS, J. Why the antibiotic resistance crisis requires a One Health approach. **Lancet Infectious Diseases**, 18, 132-134, 2018.

VERMA, V. *et al.* Involvement of NLRP3 and NLRC4 Inflammasome in Uropathogenic *E. coli* Mediated Urinary Tract Infections. **Front. Microbiol.** 10, 1–15, 2019.

VILA, J. *et al.* *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 4, p. 437–463, 2016.

WEILL, F. X. *et al.* Emergence of extended-spectrum β -lactamases (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 5767-73, 2004.