



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ARTHUR BOSSI DO NASCIMENTO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Escherichia coli*
RESISTENTES À POLIMIXINA ISOLADAS DE HORTALIÇAS
COMERCIALIZADAS NO NORTE DO PARANÁ

LONDRINA
2025

ARTHUR BOSSI DO NASCIMENTO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Escherichia coli*
RESISTENTES À POLIMIXINA ISOLADAS DE HORTALIÇAS
COMERCIALIZADAS NO NORTE DO PARANÁ

Defesa de mestrado apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade
Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da
Rocha Universidade Estadual de Londrina

LONDRINA
2025

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

A788c Nascimento, Arthur Bossi do Nascimento.
Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* resistentes à polimixina isoladas de hortaliças comercializadas no norte do Paraná / Arthur Bossi do Nascimento Nascimento. - Londrina, 2025.
61 f. : il.

Orientador: Sergio Paulo Dejato da Rocha.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2025.
Inclui bibliografia.

1. Epidemiologia - Tese. 2. *Escherichia coli* - Tese. 3. Polimixinas - Tese. 4. *mcr-1* - Tese. I. Dejato da Rocha, Sergio Paulo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

ARTHUR BOSSI DO NASCIMENTO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Escherichia coli*
RESISTENTES À POLIMIXINA ISOLADAS DE HORTALIÇAS
COMERCIALIZADAS NO NORTE DO PARANÁ

Defesa de mestrado apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade
Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha
Universidade Estadual de Londrina

Prof^ª. Dr^ª. Renata Katsuko Takayama Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina

Prof^ª. Dr^ª. Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 25 de fevereiro de 2025

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha por ter acreditado em mim desde a minha iniciação científica e, desde então, me orientar. Suas valiosas discussões contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Sua constante disponibilidade, paciência e compromisso foram fundamentais ao longo desta trajetória.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, gostaria de registrar meu sincero agradecimento pelo compartilhamento de seus conhecimentos. As discussões, sugestões e ensinamentos deixaram contribuições valiosas para minha formação. Em especial, agradeço à Prof^a Dr^a Renata Katsuko Takayama Kobayashi e ao Prof. Dr. Gerson Nakazato, por participarem de importantes etapas do meu mestrado e por suas sugestões que me motivaram a buscar novas informações, enriquecendo minha trajetória como aluno.

Agradeço à Prof. Dr^a Eliana Carolina Vespero pela contribuição para a realização desse trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório, meu sincero agradecimento pela parceria, pelas trocas de conhecimento e pelos momentos de descontração que tornaram essa caminhada mais leve e produtiva.

À minha família, expresso minha eterna gratidão pelo apoio constante, compreensão e confiança, que foram fundamentais para superar os desafios enfrentados ao longo do meu mestrado.

Por fim, não poderia deixar de agradecer à minha gatinha, Cassandra, por sua companhia e afeto em todos os momentos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para esta conquista, meu mais sincero obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

NASCIMENTO, Arthur Bossi do Nascimento. **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Escherichia coli* RESISTENTES À POLIMIXINA ISOLADAS DE HORTALIÇAS COMERCIALIZADAS NO NORTE DO PARANÁ.** 2025. 60 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

RESUMO

Hortaliças são componentes essenciais de uma dieta saudável e frequentemente consumidas cruas, o que pode facilitar a transmissão de patógenos como *E. coli*. Além de causar infecções, *E. coli* pode disseminar genes para outros microrganismos, como o *mcr-1*, que confere resistência às polimixinas. A resistência a antimicrobianos, especialmente à polimixina, um dos últimos recursos terapêuticos contra infecções por bactérias multirresistentes, tem se tornado uma preocupação crescente. Diante disso, torna-se importante avaliar a prevalência desses microrganismos em hortaliças. Este estudo teve como objetivo caracterizar fenotipicamente e genotipicamente cepas de *E. coli* resistentes à polimixina isoladas de hortaliças comercializadas em Londrina, PR, entre outubro de 2022 e fevereiro de 2023. De 514 amostras analisadas, foram analisadas 10 cepas de *E. coli* resistentes à polimixina, sendo 5 provenientes de alface, 2 de almeirão e 3 distribuídos entre agrião, couve e rúcula. A resistência à polimixina foi determinada por microdiluição em caldo, onde 8 isolados apresentaram Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 4 mg/L, enquanto 2 cepas demonstraram CIM de 8 mg/L e 16 mg/L, respectivamente. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos mostrou que todas as cepas eram produtoras de AmpC, além de outras resistências. Quatro cepas transferiram a resistência à polimixina por conjugação, indicando a capacidade de transferência deste gene por plasmídeos. O sequenciamento do genoma revelou cepas de diferentes STs, sendo o mais prevalente o ST48 e presença de genes associados à patogenicidade, como *csg*, *ibeC*, *ibeB*, entre outros. Além de apresentar dois plasmídeos com o gene *mcr-1*, p0111_1__AP010962 e IncIII(Alpha)_1__AP005147. A análise filogenética indicou relações das cepas com fontes diversas, como ambiente e animais. Este estudo reporta, pela primeira vez no Brasil, a presença de *E. coli* resistente à polimixina em hortaliças, destacando o risco zoonótico e a disseminação de genes de resistência por meio de plasmídeos móveis. Os resultados reforçam a necessidade de um monitoramento contínuo desses alimentos para mitigar a propagação da resistência antimicrobiana e proteger a saúde pública.

Palavras-chave: Segurança dos alimentos, Conjugação bacteriana, Saúde Única

NASCIMENTO, Arthur Bossi do Nascimento. **PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF POLYMYXIN-RESISTANT *Escherichia coli* ISOLATED FROM VEGETABLES SOLD IN NORTHERN PARANÁ.** 2025. 60 p. Dissertation (Master's in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2025

ABSTRACT

Vegetables are essential components of a healthy diet and are often consumed raw, which can facilitate the transmission of pathogens such as *Escherichia coli* (*E. coli*). In addition to causing infections, *E. coli* can disseminate genes to other microorganisms, such as *mcr-1*, which confers resistance to polymyxins. Antimicrobial resistance, particularly to polymyxin one of the last-resort therapies against infections caused by multidrug-resistant bacteria has become an increasing concern. Therefore, assessing the prevalence of these microorganisms in vegetables is crucial. This study aimed to phenotypically and genotypically characterize polymyxin-resistant *E. coli* strains isolated from vegetables commercialized in Londrina, Paraná, between October 2022 and February 2023. Among the 514 samples analyzed, 10 *E. coli* strains resistant to polymyxin were identified, with 5 originating from lettuce, 2 from escarole, and 3 from watercress, kale, and arugula. Polymyxin resistance was determined by broth microdilution, where 8 isolates exhibited a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 4 mg/L, while 2 strains demonstrated MICs of 8 mg/L and 16 mg/L, respectively. Antimicrobial susceptibility testing revealed that all strains produced AmpC, in addition to exhibiting other resistances. Four strains transferred polymyxin resistance via conjugation, indicating the ability to transfer this gene through plasmids. Whole-genome sequencing revealed strains belonging to different sequence types (STs), with ST48 being the most prevalent, and the presence of genes associated with pathogenicity, such as *csg*, *ibeC*, and *ibeB*, among others. Additionally, two plasmids carrying the *mcr-1* gene were identified: p0111_1_AP010962 and IncIII(Alpha)_1_AP005147. Phylogenetic analysis indicated relationships between the strains and diverse sources, including the environment and animals. This study reports, for the first time in Brazil, the presence of polymyxin-resistant *E. coli* in vegetables, highlighting the zoonotic risk and the dissemination of resistance genes through mobile plasmids. The findings reinforce the need for continuous monitoring of these foods to mitigate the spread of antimicrobial resistance and safeguard public health.

Keywords: Food safety, Bacterial conjugation, One Health

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais fontes de contaminação das hortaliças	18
Figura 2. Mecanismos da patogênese de <i>E. coli</i> diarréiogenica	25
Figura 3. Estrutura e mecanismo de ação da polimixina B.....	28
Figura 4. Mecanismos de resistência de bactérias Gram-negativas contra polimixinas.....	30
Figura 5. Gráfico de calor demonstrando os dados da origem das amostras e suas características fenotípicas	38
Figura 6. Comparação entre os plasmídeos carregando o gene <i>mcr-1</i> de <i>E. coli</i> pO111_2.....	41
Figura 7. Comparação entre os plasmídeos carregando o gene <i>mcr-1</i> de <i>S. enterica</i> R64.....	42
Figura 8. Filogenia de <i>E. coli</i> isoladas de hortaliças portadoras do gene <i>mcr-1</i>	43
Figura 9. Árvores filogenéticas representando o coregenoma e o pangenoma de DEC...44	
Figura 10. Árvores filogenéticas representando o coregenoma e o pangenoma de ExPEC.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Filotipagem de Clermont, Sorotipo, ST, Complexo Clonal, Genes de resistência/Polimixina, Grupo Inc/Plasmídeo, das cepas isoladas de hortaliças na cidade Londrina-PR.....	38
Tabela 2. Genes relacionados as classes de antimicrobianos a resistência fenotípica encontrada no antibiograma.....	39
Tabela 3. Presença de genes relacionados a EXPEC e DEC encontrado nos genomas.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

LPS – Lipopolissacarídeo

MDR – Bactérias multirresistentes

OMS - Organização Mundial da Saúde

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

STEC - *E. coli* produtora de toxina Shiga

ARB – Bactérias resistentes a antibióticos

DEC - *E. coli* diarreiogênica

EPEC - *E. coli* enteropatogênica

EHEC - *E. coli* enterohemorrágica

EAEC - *E. coli* enteroagregativa

ETEC - *E. coli* enterotoxigênica

EIEC - *E. coli* enteroinvasiva

DAEC - *E. coli* aderente difusamente

A/E - *attaching and effacing*

LT - *heat-labile*

ST - *heat-stable*

EPEC-t - *E. coli* enteropatogênica típica

EPEC-a - *E. coli* enteropatogênica atípica

EAF - *adherence factor*

LEE - *locus of enterocyte effacement*

PAI - *pathogenicity island*

T3SS - sistema de secreção tipo III

BFP - *bundle forming-pilus*

LA - Adesão localizada

SHU - Síndrome Hemolítico-Urêmica

CH - Colite Hemorrágica

SLTs - *Shiga-like toxins*

AAF - Adesão Agregativa

AggR - Regulador de Adesão Agregativa

CFs - *colonization factors*

T2SS - Sistema de secreção tipo II

AMPc - Monofosfato cíclico de adenosina

CFTR - Regulador de condutância transmembranar da fibrose cística

ExPEC - *E. coli* patogênica extraintestinal

UPEC - *E. coli* uropatogênica

ITUs - Infecções do trato urinário

NMEC - *E. coli* associada à meningite neonatal

SEPEC - *E. coli* associada à sepse

APEC - *E. coli* patogênica aviária

MPEC - *E. coli* mamária patogênica

RAM - Resistência aos antimicrobianos

ME – Membrana externa

L-Ara4N - 4-amino-4-desoxi-L-arabinose

pEtN – Fosfoetanolamina

ECDC - Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças

EGM - Elementos genéticos móveis

ARGs - Genes de resistência a antibióticos

THG - Transferência horizontal de genes

MLST - Multilocus Sequence Typing

CIM - Concentração Inibitória Mínima

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Revisão Bibliográfica	17
2.1 Nutrição e segurança alimentar.....	17
2.2 <i>Escherichia coli</i>	18
2.3 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica	19
2.4 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica/produtora de toxina shiga	20
2.5 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	21
2.6 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica	22
2.7 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	23
2.8 <i>Escherichia coli</i> aderente difusa	24
2.9 <i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal	25
2.10 ExPEC e DEC isoladas de vegetais.....	26
2.11 Resistência aos antimicrobianos	26
2.12 Polimixinas	27
2.13 Mecanismos de resistência contra as polimixinas.....	28
2.14 Elementos genéticos móveis	30
2.15 Sequenciamento do genoma bacteriano	31
3. Objetivos	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. Material e métodos	34
4.1 Isolamento, identificação e amostragem bacteriana.....	34
4.2 Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos	34
4.2.1 Ensaio de microdiluição em caldo	34
4.2.2 Sensibilidade a antimicrobianos	34
4.3 Teste de transferência por conjugação	35
4.4 Sequenciamento do genoma total.....	35
4.4.1 Montagem e anotação.....	35
4.4.2 Análise filogenética e wgMLST.....	36
4.4.3 Caracterização dos plasmídeos mcr	36
4.4.4 Análise de genes relacionados com DEC e ExPEC.....	36

5. Resultados	37
5.1 Isolamento, identificação e amostragem bacteriana.....	37
5.2 Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos	37
5.2.1 Ensaio de microdiluição em caldo.....	37
5.2.2 Sensibilidade a antimicrobianos	37
5.3 Teste de transferência por conjugação	37
5.4 Sequenciamento do genoma total e análises filogenética.....	38
6. Discussão	46
7. Conclusão	50
8. Referências	51
Apêndices	61
Anexos	62

1. Introdução

1 As hortaliças são elementos essenciais de uma dieta saudável e equilibrada. Nos
2 últimos anos, houve um aumento global no consumo desses alimentos, devido à
3 promoção de estilos de vida mais saudáveis (CDC, 2024; MACHADO-MOREIRA et al.,
4 2019). Em muitos casos, esses produtos são consumidos frescos, sem passar por nenhum
5 processo de preparação prévia para garantir a remoção ou inativação eficaz de
6 contaminantes, como resíduos químicos ou microrganismos patogênicos (HEATON;
7 JONES, 2008; HÖLZEL; TETENS; SCHWAIGER, 2018; RAHMAN et al., 2021).

8 Entre os microrganismos que podem estar presentes em hortaliças, um dos mais
9 importantes é *Escherichia coli.*, microrganismo Gram-negativo pertencente à família
10 Enterobacteriaceae, comumente encontrada no trato gastrointestinal de humanos e
11 animais homeotérmicos como parte da microbiota intestinal. Entretanto alguns isolados
12 dessa bactéria podem ser patogênicos e causar infecções no trato urinário, no sistema
13 digestório e na corrente sanguínea (NATARO; KAPER, 1998).

14 Sua transmissão ocorre principalmente através do consumo de alimentos
15 contaminados como carnes mal cozidas e vegetais crus (BASTIDAS-CALDES et al.,
16 2022). Além disso, esse microrganismo possui uma notável habilidade em acumular
17 mecanismos de resistência a antibióticos, sendo um deles o *mcr-1*, responsável pela
18 resistência às polimixinas e disseminado por meio da transferência horizontal de genes
19 (NANG; LI; VELKOV, 2019). Elementos genéticos móveis, como transposons e
20 plasmídeos de resistência múltipla, desempenham um papel crucial na propagação desses
21 genes (LIU et al., 2018; POIREL et al., 2018).

22 O primeiro relato do gene *mcr-1* foi em novembro de 2015 na República Popular
23 da China, este gene foi encontrado em *E. coli* isoladas em suínos em matadouros e carnes
24 vendidas em estabelecimentos comerciais (LIU et al., 2016). Antes dessa descoberta, a
25 resistência às polimixinas era reconhecida apenas como uma característica mediada pelo
26 cromossomo bacteriano (MOHAPATRA; DWIBEDY; PADHY, 2021; NANG; LI;
27 VELKOV, 2019). No entanto, esse achado representa uma preocupação significativa para
28 a saúde global, devido ao aumento da disseminação da resistência aos antimicrobianos,
29 através de alimentos (LIU et al., 2016).

30 O grupo de antibióticos conhecido como polimixinas foi descoberto em 1947 a
31 partir da bactéria *Bacillus polymyxa*. Desde então, mais de quinze variações foram
32 identificadas, destacando-se a polimixina B e a polimixina E. Esses antibióticos

33 apresentam um espectro de ação restrito a bactérias Gram-negativas, sua atividade
34 antimicrobiana ocorre principalmente no LPS, alterando sua carga através de interações
35 eletrostáticas, causadas pela região peptídica catiônica desses elementos (MOHAPATRA;
36 DWIBEDY; PADHY, 2021; NANG et al., 2021).

37 Desde a década de 1970, as polimixinas foram amplamente abandonadas no
38 tratamento clínico de infecções bacterianas devido às reações adversas como, danos ao
39 sistema nervoso e sua baixa capacidade de excreção pelos rins (LI et al., 2022a). No
40 entanto, essa realidade mudou devido ao aumento de bactérias multirresistentes (MDR)
41 favorecidas pelo uso intensivo de antibióticos (BARLAAM et al., 2019;
42 LAXMINARAYAN et al., 2020). Sendo assim, é de extrema importância monitorar a
43 prevalência epidemiológica dos genes *mcr* na comunidade, para que seja possível manter
44 um controle sobre o uso de medicamentos, visando prevenir o aumento da resistência
45 bacteriana a uma das últimas opções no tratamento clínico e veterinário.

46

47 2. Revisão bibliográfica

48 2.1 Nutrição e segurança de alimentos

49 A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para
50 Alimentação e Agricultura (FAO) recomendam enfaticamente o consumo diário de frutas
51 e vegetais como parte essencial de uma dieta saudável, devido ao seu elevado valor
52 nutricional (FAO, 2021). Esses alimentos desempenham um papel fundamental na
53 manutenção da saúde humana, contribuindo significativamente para a prevenção de
54 doenças (MOSTAFIDI et al., 2020).

55 No entanto, o consumo de vegetais frescos, incluindo folhosos, não folhosos, e
56 frutas, pode expor os indivíduos a patógenos transmitidos por alimentos, destacando-se
57 as bactérias resistentes a antibióticos. Esses microrganismos representam uma séria
58 ameaça à segurança dos alimentos, pois podem contaminar os alimentos em diversas
59 etapas da produção e processamento (ARORA; THANGAVELU; KARANIKOLOS,
60 2020; RAHMAN et al., 2021).

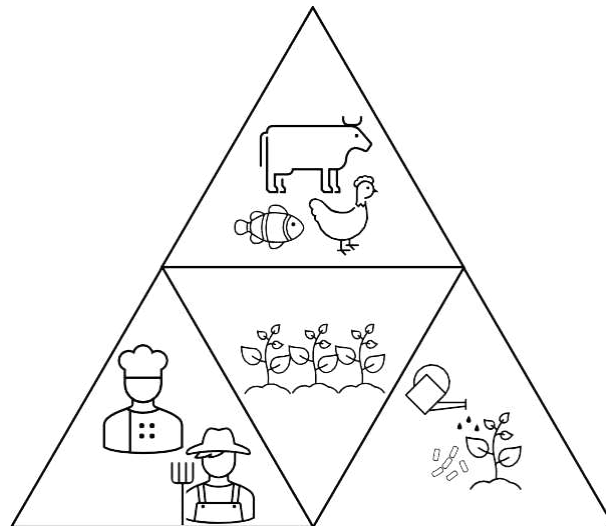
61 Produtos frescos podem ser contaminados por patógenos em várias etapas da
62 produção e distribuição, incluindo práticas agrícolas como a irrigação com águas
63 residuais e o uso de biossólidos ou esterco como fertilizante. Além disso, a contaminação
64 pode ocorrer durante o transporte e manuseio dos produtos. Nas últimas décadas, tem-se
65 observado globalmente um aumento nas doenças causadas por patógenos presentes em
66 verduras (MACHADO-MOREIRA et al., 2019; UYTENDAELE et al., 2015).

67 Estudos demonstraram uma associação entre o consumo de vegetais frescos e
68 produtos relacionados a surtos de doenças transmitidas por alimentos na Europa.
69 *Salmonella* geralmente são mais comuns nesses surtos, porém outros patógenos
70 recorrentes incluem *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *Listeria monocytogenes*
71 (AUTHORITY, 2018; VOJKOVSKÁ et al., 2017). Existem vários relatos sobre a
72 presença de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos (ARB) em verduras,
73 especialmente da família Enterobacteriaceae (ELSHAFIEE et al., 2022; LUNA-
74 GUEVARA et al., 2019; WONG; WAN; CHEN, 2013)

75

76

77
78
79
80
81
82
83



84 Figura 1. Principais fontes de contaminação das hortaliças. Origem animal, como fezes de animais (topo);
85 Irrigação com água de fontes contaminadas (direita); Origem humana, por erros no manuseio, tanto no
86 ambiente agrícola quanto no doméstico (esquerda). Fonte: Imagem do autor (2025).

87 2.2 *Escherichia coli*

88 O gênero *Escherichia*, nomeado em homenagem ao pediatra alemão Theodor
89 Escherich, engloba bacilos Gram-negativos anaeróbicos facultativos da família
90 Enterobacteriaceae. Entre suas espécies, *E. coli* destaca-se por sua relevância na
91 microbiota intestinal humana devido à sua ampla presença (GOMES et al., 2016). Sua
92 colonização no trato gastrointestinal em humanos ocorre logo após o nascimento,
93 geralmente estabelecendo uma relação mutualística duradoura com o hospedeiro. Embora
94 a maioria dos isolados de *E. coli* no intestino sejam da microbiota normal, algumas
95 possuem características genéticas específicas que lhes permitem causar doenças, como
96 diarreia e infecções do trato urinário (BRAZ; MELCHIOR; MOREIRA, 2020; KAPER;
97 NATARO; MOBLEY, 2004).

98 As cepas diarreio gênicas de *E. coli* (DEC) constituem um grupo homogêneo de
99 patógenos intestinais que adquirem determinantes de virulência distintos por meio de
100 transferência horizontal de genes, além de possuírem fatores cromossômicos e em certos
101 casos ilhas de patogenicidade (MARE et al., 2021). Essas características definem
102 diferentes patótipos de *E. coli*, cada um com mecanismos de virulência específicos e
103 manifestações clínicas características. Os principais patótipos incluem *E. coli*
104 enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica/produtora de toxina shiga
105 (EHEC/STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E.*
106 *coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* aderente difusamente (DAEC). Cada patótipo
107 representa um conjunto de clones que compartilham fatores de virulência específicos, o

108 que é crucial para sua patogenicidade no contexto clínico e epidemiológico (GOMES et
109 al., 2016; GOVINDARAJAN et al., 2020; NATARO; KAPER, 1998).

110 **2.3 *Escherichia coli* enteropatogênica**

111 EPEC é uma das principais causas de doenças diarreicas e surtos em lactentes com
112 menos de seis meses, apresentando alta morbidade e mortalidade. Embora sua prevalência
113 tenha diminuído em países em desenvolvimento, elas continuam sendo uma preocupação
114 significativa de saúde pública (NATARO; KAPER, 1998; PEARSON et al., 2016).

115 EPEC é definida pela capacidade de produzir lesões *attaching and effacing* (A/E)
116 no epitélio intestinal, sem produzir toxinas Shiga e enterotoxinas *heat-labile* (LT) ou
117 *heat-stable* (ST). Esse patotipo é classificado em EPEC típica (EPEC-t) e EPEC atípica
118 (EPEC-a). A EPEC-t possui os genes de virulência completos, sendo *eae+* e *bfpA+*. Já a
119 EPEC-a não possui o plasmídeo *adherence factor* (EAF), mas mantém outros fatores de
120 virulência no *locus of enterocyte effacement* (LEE), como *eae+*, entretanto não apresenta
121 os genes *bfp* (*bfpA-*) (GOMES et al., 2016; MARE et al., 2021).

122 Os principais genes de virulência de EPEC estão localizados em uma
123 *pathogenicity island* (PAI) cromossômica de 35 kb, denominada de região LEE, e no
124 plasmídeo EAF. (GOMES et al., 2016; PEARSON et al., 2016). LEE carrega genes que
125 codificam, sistema de secreção tipo III (T3SS), reguladores, translocadores, chaperonas
126 e moléculas efetoras que alteram diversos processos de sinalização celular (ELLIOTT et
127 al., 2000; HERNANDES et al., 2009). O plasmídeo EAF contém os genes para o *bundle-*
128 *forming-pilus* (BFP), que facilita a adesão localizada (LA) às células epiteliais. Neste
129 plasmídeo encontram-se dois operons, o operon BFP, formado pelos genes *bfpA* a *bfpL* é
130 essencial para a síntese de BFP, pois codifica o componente estrutural BfpA, da fimbria
131 BFP. Enquanto o segundo operon no plasmídeo EAF codifica o regulador Per, composto
132 por três genes *perA*, *perB* e *perC*, que ativa os genes presentes em LEE e do operon BFP
133 (TEIXEIRA et al., 2015; TOBE et al., 1999).

134 Seu processo de patogênese de EPEC ocorre ao se aderirem firmemente às células
135 epiteliais intestinais, desfazerem as microvilosidades e inserirem moléculas efetoras no
136 citoplasma da célula hospedeira através de um sistema de secreção tipo III (T3SS), um
137 complexo proteico que injeta proteínas na célula-alvo. Inicialmente, utilizam a fimbria
138 BFP e EspA como mediadores, seguido por Tir intimina e diversos efetores que
139 aumentam a colonização bacteriana e controlam a sinalização das células hospedeiras. A
140 adesão é facilitada pela intimina (codificada por *eae*), que se liga a Tir, formando um

141 pedestal sob as bactérias. Isso resulta em disfunção da barreira epitelial, alteração no
142 transporte de eletrólitos, respostas inflamatórias e aumento da gravidade da doença
143 (MARE et al., 2021; PAKBIN; BRÜCK; ROSSEN, 2021).

144 **2.4 *Escherichia coli* enterohemorrágica/produtora de toxina shiga**

145 EHEC, um subconjunto de STEC, caracteriza-se por sua associação com graves
146 quadros clínicos, especialmente o sorotipo O157:H7, responsável por diversos surtos
147 mundiais. Ao contrário do termo mais amplo STEC, EHEC se refere especificamente
148 àquelas cepas que causam Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU) e Colite Hemorrágica
149 (CH). Essas bactérias patogênicas, distinguidas pela produção de toxinas *Shiga* e pelas
150 lesões características de A/E em células epiteliais, são transmitidas principalmente por
151 alimentos e água contaminados, representando uma ameaça significativa à saúde pública.
152 É importante destacar que nem todas as cepas STEC causam doenças, mas todas as cepas
153 EHEC são inerentemente patogênicas (MENGISTU; MENGESHA, 2023; NATARO;
154 KAPER, 1998; PAKBIN; BRÜCK; ROSSEN, 2021).

155 A maioria das cepas de EHEC, semelhante a EPEC, possuem uma região
156 cromossômica conhecida como LEE, que codifica determinantes de virulência cruciais,
157 incluindo T3SS e intimina, a adesina que facilita a ligação firme às células intestinais e
158 leva à formação de lesões A/E. No entanto, o principal fator de virulência em EHEC
159 deriva da produção de *Shiga-like toxins* (SLTs), codificada pelo gene *stx*, são
160 responsáveis por casos clínicos graves em infecções por EHEC, como SHU e
161 insuficiência renal. As SLTs são classificadas em dois grupos principais (*stx1* e *stx2*) com
162 vários subtipos. Isolados de EHEC positivas para *stx2a*, *stx2c* e *stx2d* estão associadas a
163 um maior risco do desenvolvimento de CH e SHU em comparação com aquelas que
164 carregam outros subtipos de *stx* (JOSEPH et al., 2020; PAKBIN; BRÜCK; ROSSEN,
165 2021).

166 A patogênese da EHEC é iniciada pela ruptura dos canais de íon da membrana
167 epitelial intestinal. Essa ruptura é causada pela toxina Shiga ao entrar no hospedeiro, ela
168 atua como molécula de sinalização celular e modulador imunológico, desencadeando vias
169 pró-inflamatórias e de morte celular. A SHU, caracterizada por anemia hemolítica,
170 trombocitopenia e insuficiência renal aguda, é uma complicação principalmente
171 associada à lesão das células endoteliais dos rins, embora possa afetar outros órgãos com
172 menos frequência. Estudos indicam que os rins e o trato gastrointestinal são os órgãos

173 mais frequentemente comprometidos nesses casos (FAKHOURI et al., 2017; NGUYEN;
174 SPERANDIO, 2012; WELINDER-OLSSON; KAIJSER, 2005).

175 **2.5 *Escherichia coli* enteroagregativa**

176 Descrito inicialmente em 1987, o patotipo EAEC é altamente associado à diarreia
177 autolimitada em indivíduos saudáveis (ELIAS; NAVARRO-GARCIA, 2016). No entanto,
178 essa bactéria é endêmica em algumas regiões, sendo uma das principais causas de diarreia
179 do viajante e de quadros persistentes em imunocomprometidos (OKHUYSEN;
180 DUPONT, 2010; PAKBIN; BRÜCK; ROSSEN, 2021). Sua nomenclatura refere-se ao
181 seu mecanismo de patogênese: a capacidade de formar um padrão de adesão agregativo,
182 comparado a tijolos empilhados, devido à disposição das bactérias na parede intestinal
183 (MEZA-SEGURA et al., 2020).

184 O padrão de adesão agregativo de EAEC é mediado principalmente pela Fímbria
185 de Adesão Agregativa (AAF), regulada pelo Regulador de Adesão Agregativa (AggR),
186 codificado pelo gene *aggR*. Este regulador também controla a transcrição de vários outros
187 genes importantes para a virulência de EAEC (MEZA-SEGURA et al., 2020). Embora
188 nem todos os patógenos com o regulon AggR apresentem o padrão enteroagregativo, é
189 comum classificar EAECs em típicas (possuem AggR) e atípicas (não possuem AggR),
190 rastreando o patotipo pela detecção do gene *aggR* (MEZA-SEGURA et al., 2020;
191 NATARO, 2005). Existe uma grande heterogeneidade genética e sorológica nas cepas de
192 EAEC, com muitos genes de virulência, cromossomais e plasmidiais, variando em
193 prevalência conforme a região e o período de isolamento. Geralmente, estas cepas
194 apresentam toxinas, adesinas agregativas, e sistemas de secreção do tipo VI, entre outros
195 fatores de virulência (ELIAS; NAVARRO-GARCIA, 2016).

196 Embora a cepa EAEC 042, utilizada por NATARO et al., 1995 em modelos
197 humanos, ainda seja referência para estudos de adesão agregativa, diversos aspectos da
198 patogênese de EAEC permanecem obscuros. Em linhas gerais, o processo se inicia com
199 a adesão da bactéria à mucosa intestinal, facilitada por adesinas e pela formação de
200 biofilme mucoide, esse processo pode ocorrer em diferentes regiões do intestino. A seguir,
201 EAEC secreta toxinas que aumentam a permeabilidade das criptas intestinais, causam
202 danos as microvilosidades e induzem a extrusão de células epiteliais, resultando na
203 diarreia (ELIAS; NAVARRO-GARCIA, 2016; NATARO et al., 1995; PAKBIN; BRÜCK;
204 ROSSEN, 2021).

205 **2.6 *Escherichia coli* enterotoxigênica**

206 ETEC é uma das principais causas de diarreia, especialmente em crianças de
207 países em desenvolvimento. Anualmente, responsável por causar milhões de casos de
208 diarreia, afetando desproporcionalmente crianças menores de 5 anos. Segundo a OMS,
209 ETEC causa cerca de 220 milhões de episódios de diarreia globalmente, com 75 milhões
210 em crianças menores de 5 anos, resultando entre 18.700 e 42.000 mortes nessa faixa etária
211 (BUTKEVICIUTE et al., 2021; KHALIL et al., 2018; WHO, 2021). A contaminação
212 ocorre pela ingestão de alimentos ou água em regiões com infraestrutura sanitária
213 precária, tornando o controle desse microrganismo um desafio significativo e uma grande
214 preocupação de saúde pública em países de baixa renda (MADHAVAN; SAKELLARIS,
215 2015; ZHANG et al., 2022).

216 Um fator de virulência importante de ETEC está fortemente relacionado a
217 adesinas chamadas de *colonization factors* (CFs). Esses CFs apresentam vários formatos
218 e tamanhos, com diferentes maneiras de se aderirem às células do hospedeiro. Eles podem
219 ser categorizados em quatro grupos principais com base em sua estrutura: fimbriais,
220 fibrilares, helicoidais e afimbriais. Outros fatores de virulência responsáveis por
221 desencadear doenças são: enterotoxinas termolábeis (LT) e enterotoxinas
222 termoestáveis (ST) (MIRHOSEINI; AMANI; NAZARIAN, 2018; VIPIN MADHAVAN;
223 SAKELLARIS, 2015).

224 As enterotoxinas ST, são proteínas compactas codificadas por genes em
225 plasmídeos (*estA* e *estB*), se dividem em ST I e ST II. O grupo ST I possui dois subtipos
226 STp (cepas suínas) e STh (cepas humanas), com cepas isoladas de humanos podendo
227 carregar ambos. ST II está presente normalmente em bovinos, mas não em humanos. Em
228 contraste a enterotoxina LT, são proteínas maiores codificadas pelo operon *eltAB* em um
229 plasmídeo de virulência, que apresentam similaridade com toxinas da cólera. Inicialmente
230 sintetizadas como precursores inativos no periplasma, são liberadas pela membrana
231 externa e um sistema de secreção tipo II (T2SS). Categorizadas como LT I e LT II, o LT
232 I possui dois subtipos LTp (cepas suínas) e LTh (cepas humanas), similar a ST I. O LT II
233 é encontrado principalmente em cepas animais, mas ocasionalmente em humanos
234 (MENTZER; SVENNERHOLM, 2024; PAKBIN; BRÜCK; ROSSEN, 2021; ZHANG et
235 al., 2022).

236 ETEC inicia seu processo de patogênese no intestino delgado, aderindo-se ao
237 revestimento intestinal através de fimbrias como CFA/I, CFA/II e CFA/IV. Essa adesão

238 é crucial para a produção de toxinas, principalmente a LT e a ST. A LT atua dentro das
239 células intestinais, elevando os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), o
240 que leva à ativação do canal iônico regulador de condutância transmembranar da fibrose
241 cística (CFTR) que inibe a troca de íons e a reabsorção de sódio, contribuindo para a e à
242 secreção excessiva de água e eletrólitos, causando diarreia aquosa (PAKBIN; BRÜCK;
243 ROSSEN, 2021; ZHANG et al., 2022).

244 **2.7 *Escherichia coli* enteroinvasiva**

245 EIEC, identificada na década de 1940, é uma bactéria Gram-negativa causadora
246 da disenteria bacilar, uma doença diarreica grave semelhante às infecções por *Shigella*.
247 Apesar de algumas distinções fenotípicas, como padrões de fermentação de açúcares,
248 EIEC exibe semelhanças notáveis com *Shigella*. Isso inclui a invasão de células epiteliais,
249 a presença do plasmídeo pINV crucial para a virulência e um ciclo de vida intracelular.
250 Análises filogenéticas sugerem que EIEC e *Shigella* evoluíram independentemente de
251 ancestrais de *E. coli* por meio de múltiplas aquisições de fatores de virulência. Esse
252 processo resultou no surgimento desses dois patógenos entéricos intimamente
253 relacionados, porém distintos (CROXEN et al., 2013; GEURTSEN et al., 2022; GOMES
254 et al., 2016).

255 A virulência de EIEC envolve interação complexa entre fatores cromossômicos e
256 codificados por plasmídeo. As ilhas de patogenicidade codificadas cromossomicamente
257 (SHI-1, SHI-2) abrigam genes essenciais para a invasão e ruptura de células epiteliais.
258 Um grande plasmídeo de virulência (pINV) desempenha um papel crítico, codificando o
259 T3SS, que tem como função injetar proteínas efetoras em células hospedeiras, alterando
260 o ambiente do hospedeiro e beneficiando a colonização bacteriana. Alguns genes, como
261 *IpaA* e *VirA*, têm como alvo o citoesqueleto, promovendo a captação do patógeno pela
262 célula epitelial e inibindo a morte celular do hospedeiro. Outros, como *OspZ* e *IpaH4.5*,
263 modulam a resposta inflamatória. Além disso, as toxinas ShET codificadas no
264 cromossomo e no pINV contribuem para a diarreia aquosa, podendo progredir para
265 disenteria. Em conclusão, a virulência da EIEC depende de um esforço coordenado de
266 fatores cromossômicos e codificados por plasmídeo para invadir células epiteliais,
267 manipular o ambiente da célula hospedeira e estabelecer uma infecção bem-sucedida
268 (NATARO; KAPER, 1998; PAKBIN; BRÜCK; ROSSEN, 2021; VAN DEN BELD et
269 al., 2020).

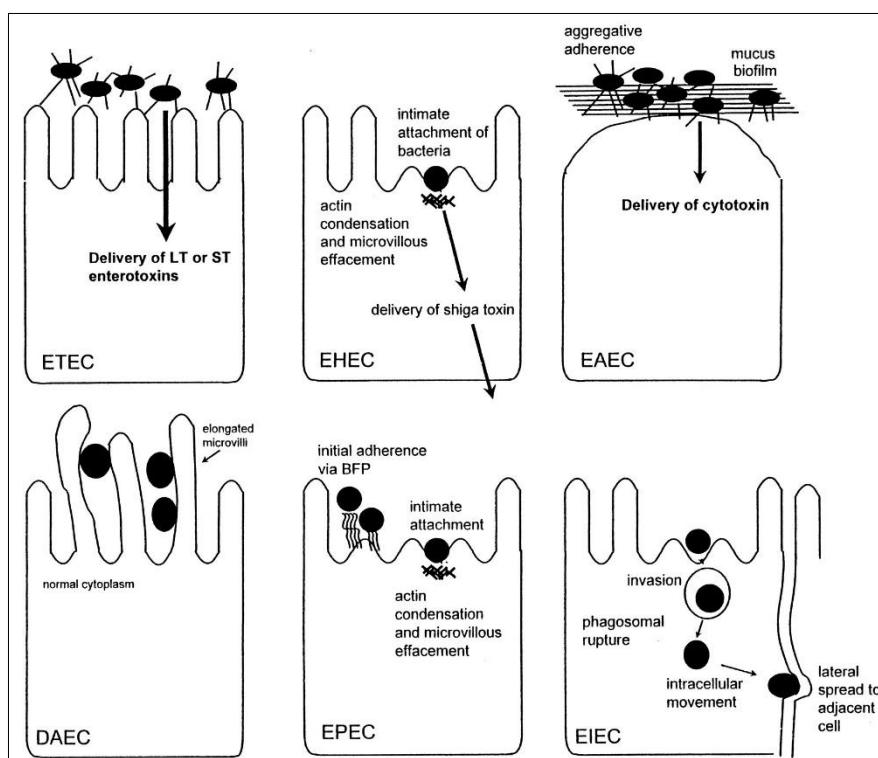
270 A patogênese de EIEC se estabelece pela infecção intestinal através de uma
271 cascata de eventos, espelhando a patogênese da *Shigella*. A invasão inicial utiliza células
272 epiteliais especializadas dentro do cólon que concedem acesso ao tecido subjacente. A
273 ruptura das junções do cólon, ainda mais agravada pela inflamação, facilita a infiltração
274 da mucosa por EIEC. Fagocitada por macrófagos, EIEC rompe o fagossomo, permitindo
275 a invasão aos colonócitos adjacentes. Uma vez dentro dos colonócitos, EIEC prospera
276 intracelularmente, exibindo movimento direcionado e se espalhando para células
277 adjacentes, causando a destruição inflamatória da barreira epitelial intestinal. Essa
278 estratégia de invasão coordenada destaca a adaptação de EIEC ao ambiente intestinal,
279 onde resiste a alterações de pH, temperatura e níveis de oxigênio. O resultado desse
280 processo é uma síndrome característica chamada de disenteria, caracterizada pela
281 presença de sangue, muco e glóbulos brancos nas fezes (CROXEN et al., 2013; PAKBIN;
282 BRÜCK; ROSSEN, 2021; PASQUA et al., 2017).

283 **2.8 *Escherichia coli* aderente difusa**

284 DAEC é diferenciada pelo seu padrão único de aderência difusa ao interagir com
285 células epiteliais. Essas cepas estão implicadas em uma série de problemas de saúde,
286 principalmente afetando crianças. DAEC é responsável por causar diarreia, mas também
287 tem sido associado a infecções do trato urinário e até mesmo complicações na gravidez.
288 Um fator crítico na virulência de DAEC é a adesina Afa/Dr, que desempenha um papel
289 central na aderência difusa, permitindo que a bactéria se estabeleça nas células
290 hospedeiras. Apesar de exibir diversidade genética, as cepas de DAEC Afa/Dr são
291 definidas por sua capacidade de induzir diarreia (MEZA-SEGURA; ESTRADA-
292 GARCIA, 2016; SERVIN, 2014).

293 DAEC causa diarreia através de vários fatores de virulência, incluindo adesinas,
294 toxinas e mecanismos de evasão do sistema imunológico. As adesinas são categorizadas
295 como fimbriais ou afimbriais Afa/Dr, codificado pelo operon *afa/daa/dra*, permitem que
296 DAEC se fixe as células intestinais. A toxina Sat enfraquece as junções entre essas
297 células, aumentando da permeabilidade intestinal e contribuindo para a diarreia. Algumas
298 cepas também produzem a toxina EAST1, codificado pelo gene *east1*, que danifica
299 diretamente o revestimento intestinal. Para sobreviver no hospedeiro, DAEC pode
300 produzir sideróforos e formar cápsulas ou alterar seus antígenos de superfície para evitar
301 a ação do sistema imunológico (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; MEZA-SEGURA;
302 ESTRADA-GARCIA, 2016; SERVIN, 2014).

303 DAEC estabelecem infecções intestinais aderindo às células epiteliais. Elas
 304 preferencialmente direcionam-se às células M nas placas de Peyer, mas também podem
 305 colonizar células indiferenciadas e enterócitos maduros. Essa adesão desencadeia a
 306 formação de projeções na superfície da célula hospedeira, incorporando parcialmente a
 307 bactéria, esse processo permite que DAEC consiga defender-se do sistema imunológico
 308 e antibióticos, favorecendo, dessa forma, sua capacidade de persistir e se desenvolver no
 309 ambiente intestinal (LIU, 2015; MEZA-SEGURA; ESTRADA-GARCIA, 2016;
 310 SERVIN, 2014).



311 Figura 2 Mecanismos da patogênese de *E. coli* diarréiogenica. Na parte superior esquerda, ETEC se adere
 312 à mucosa intestinal e libera enterotoxinas LT ou ST, provocando diarreia. Ao lado, a EHEC se liga as células
 313 intestinais, levando a perda das microvilosidades e liberando toxina shiga, causando lesões intestinais. No
 314 canto superior direito, EAEC adere de forma agregativa, formando um biofilme e, liberando citotoxinas.
 315 Na parte inferior esquerda, DAEC se liga às células intestinais, provocando o alongamento das
 316 microvilosidades. Ao lado, EPEC inicialmente se adere via BFPs, levando à condensação de actina e à
 317 perda das microvilosidades. No canto inferior direito, EIEC invade as células intestinais, rompe o
 318 fagossomo e se move intracelularmente, espalhando-se lateralmente para células adjacentes. Fonte: Nataro;
 319 Kaper, (1998).

320 2.9 *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

321 *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) é um grupo de bactérias que reside na
 322 microbiota gastrointestinal comensal de humanos e animais. Ao contrário de DEC, que
 323 causa infecções intestinais, cepas de ExPEC têm a capacidade de colonizar e invadir
 324 órgãos extraintestinais, resultando em uma ampla gama de infecções. A virulência dessas
 325 cepas é destacada pela diversidade de fatores que facilitam a infecção e a adaptação aos

326 tecidos alvo. ExPECs são categorizadas em patotipos com base em seus tecidos alvo
327 preferenciais. Por exemplo, *E. coli* uropatogênica (UPEC) é a mais comum, causando a
328 maioria das infecções do trato urinário (ITUs). Outros patotipos incluem *E. coli* associada
329 à meningite neonatal (NMEC), *E. coli* associada à sepse (SEPEC), *E. coli* patogênica
330 aviária (APEC) e *E. coli* mamária patogênica (MPEC), cada patotipo com seus conjuntos
331 distintos de fatores de virulência que facilitam a colonização e a persistência nos tecidos
332 alvo (SAROWSKA et al., 2019; SORA et al., 2021).

333 **2.10 ExPEC e DEC isoladas de vegetais**

334 A epidemiologia das infecções por ExPEC varia conforme o patotipo. Por
335 exemplo, ITUs causadas por UPEC são mais comuns em mulheres, devido a diferenças
336 anatômicas no trato urinário, além de outros fatores como cateteres urinários, uso recente
337 de antibióticos e comprometimento do sistema imunológico. NMEC afeta principalmente
338 recém-nascidos, frequentemente associada a complicações durante o parto, enquanto
339 SEPEC pode se desenvolver como complicação secundária de outras infecções. Por fim,
340 APEC consegue causar infecções em aves, como celulites aviárias e MPEC, responsável
341 por causar mastites em bovinos (JOHNSON; RUSSO, 2018; SHPI GEL;
342 ELAZAR; ROSENSHINE, 2008; SORA et al., 2021).

343 A presença desses patotipos foi relatada em vários tipos de vegetais. Em estudos
344 como os de Gómez-aldapa et al., 2016; Priyanka et al., 2021, foram identificadas DECs
345 como EHEC, STEC, ETEC, EAEC e EIEC, nas seguintes fontes: repolho, espinafre e
346 *nopalitos* (cacto do tipo palma). Em outro estudo de (PRIYANKA et al., 2023), observou-se
347 a presença de ExPEC, incluindo UPEC e SEPEC, em diversos tipos de vegetais como,
348 cenoura, tomate e entre outros. Essas descobertas destacam o potencial de verduras de
349 abrigar patógenos que representam riscos para a saúde pública. Além disso, a ausência da
350 detecção de certos patotipos não exclui sua possível presença, o que pode ser um indício
351 de uma subnotificação devido à não inclusão da patotipagem, em estudos de *E. coli*
352 isolados de verduras (J et al., 2020; ORTEGA-PAREDES et al., 2018).

353 **2.11 Resistência aos antimicrobianos**

354 A resistência aos antimicrobianos (RAM), considerada como pandemia
355 silenciosa, é uma ameaça global crescente à saúde humana. O uso extensivo de
356 antimicrobianos na medicina, agricultura e indústrias acelerou a seleção e a disseminação
357 de patógenos resistentes. A RAM tem consequências significativas para a saúde pública,

358 causando internações hospitalares prolongadas, aumento dos custos com cuidados de
359 saúde e maiores taxas de mortalidade. Outro fator crucial é a escassez de novos
360 antibióticos desenvolvidos nas últimas décadas, aliada à diminuição da eficácia dos
361 medicamentos existentes devido ao aumento da resistência antimicrobiana. Isso tem
362 levado ao retorno do uso de opções antigas, como as polimixinas (MAJUMDER et al.,
363 2020; MILLER; FERREIRA; LEJEUNE, 2022; PANERI; SEVTA, 2023).

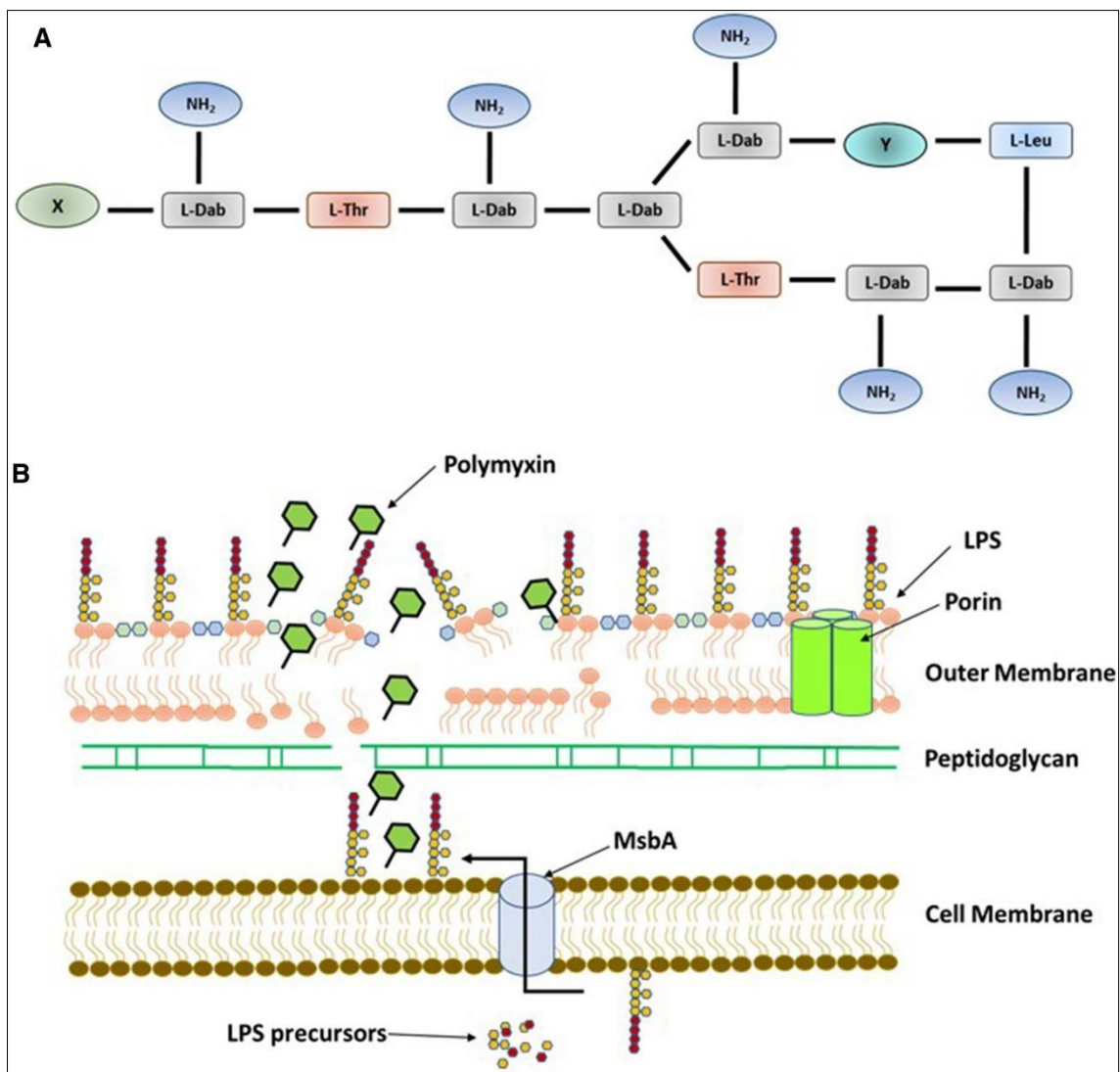
364 **2.12 Polimixinas**

365 Descobertas em 1947 a partir de *B. polymyxa*, as polimixinas representam uma
366 classe de lipopeptídeos com potente atividade contra bactérias Gram-negativas. Entre os
367 membros clinicamente mais relevantes, destacam-se a polimixina B e a colistina
368 (polimixina E). Esses antibióticos assumem um papel crucial como última linha de
369 tratamento para infecções causadas por patógenos multirresistentes, como *Klebsiella*
370 *pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, os quais demonstram
371 resistência aos medicamentos comumente utilizados (AYOUB MOUBARECK, 2020;
372 MOHAPATRA; DWIBEDY; PADHY, 2021).

373 Sua estrutura é constituída de lipopeptídios com uma estrutura característica de
374 anel e cauda. A porção do anel é um peptídeo policatiônico, contendo múltiplos resíduos
375 de ácido diaminobutírico carregados positivamente, enquanto a cauda consiste em uma
376 cadeia tripeptídica ligada a um ácido graxo. Essa dualidade estrutural confere as
377 polimixinas sua natureza anfipática: o anel catiônico confere propriedades hidrofílicas,
378 enquanto a cauda acil-graxo fornece características hidrofóbicas. Notavelmente, a
379 polimixina B e a colistina, os dois membros mais proeminentes desta classe, diferem-se
380 por um único aminoácido dentro do anel peptídico (D-fenilalanina na polimixina B e D-
381 leucina na colistina). A substituição desses aminoácidos pode modular a conformação
382 tridimensional da molécula, alterando potencialmente sua capacidade de interagir com a
383 membrana bacteriana (MOHAPATRA; DWIBEDY; PADHY, 2021; TRIMBLE et al.,
384 2016).

385 As polimixinas atuam rompendo a membrana externa (ME), esse processo ocorre
386 quando a região catiônica da polimixina é atraída e se liga eletrostaticamente ao
387 lipopolissacarídeo (LPS) carregado negativamente. Simultaneamente, a cauda
388 hidrofóbica do ácido graxo da polimixina se insere na porção lipídica A do LPS. Isso
389 desloca cátions estabilizadores como cálcio e magnésio, tornando a ME mais permeável
390 e levando ao vazamento de componentes celulares essenciais. Outros mecanismos de ação

391 das polimixinas, ainda não totalmente compreendidos, incluem a inibição da respiração
 392 bacteriana, produção de espécies reativas de oxigênio e redução da divisão celular
 393 (MOHAPATRA; DWIBEDY; PADHY, 2021; PADHY; DWIBEDY; MOHAPATRA,
 394 2024).
 395



396 Figura 3 Estrutura e mecanismo de ação da polimixina B. Fonte: Mohapatra et al., 2021

397 2.13 Mecanismos de resistência contra as polimixinas

398 O aumento das infecções MDR causadas por *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* e
 399 *A. baumannii* levou ao uso das polimixinas como último recurso terapêutico. No entanto,
 400 o uso excessivo desses antibióticos tem levado ao aumento de bactérias resistentes à
 401 polimixina. O problema se torna ainda mais complexo com o surgimento de genes de
 402 resistência à polimixina mediados por plasmídeo, especialmente o gene *mcr-1*,
 403 representando uma significativa ameaça à saúde pública (AYOUB MOUBARECK, 2020;
 404 LIU et al., 2016; TRIMBLE et al., 2016)

405 Os principais mecanismos de resistência a polimixinas envolvem mutações
406 cromossômicas que alteram a estrutura do LPS. Essas mudanças são frequentemente
407 reguladas por sistemas de dois componentes, PhoPQ e PmrAB, que detectam estímulos
408 no ambiente, como as polimixinas, e desencadeiam a expressão de genes que adicionam
409 grupos carregados positivamente, como 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) e
410 fosfoetanolamina (pEtN) ao LPS. Essas modificações diminuem a afinidade de ligação
411 das polimixinas à superfície bacteriana, conferindo a resistência. Mutações em genes
412 reguladores como *mgrB* e *mgrR* podem levar à ativação constante dessas vias,
413 perpetuando as modificações do LPS e mantendo a resistência às polimixinas. Além
414 disso, a perda da cápsula bacteriana e a expressão de bombas de efluxo foram propostas
415 como fatores que contribuem para a resistência às polimixinas, embora seus papéis
416 precisem de maior esclarecimento (AYOUB MOUBARECK, 2020; SATO et al., 2018;
417 TRIMBLE et al., 2016).

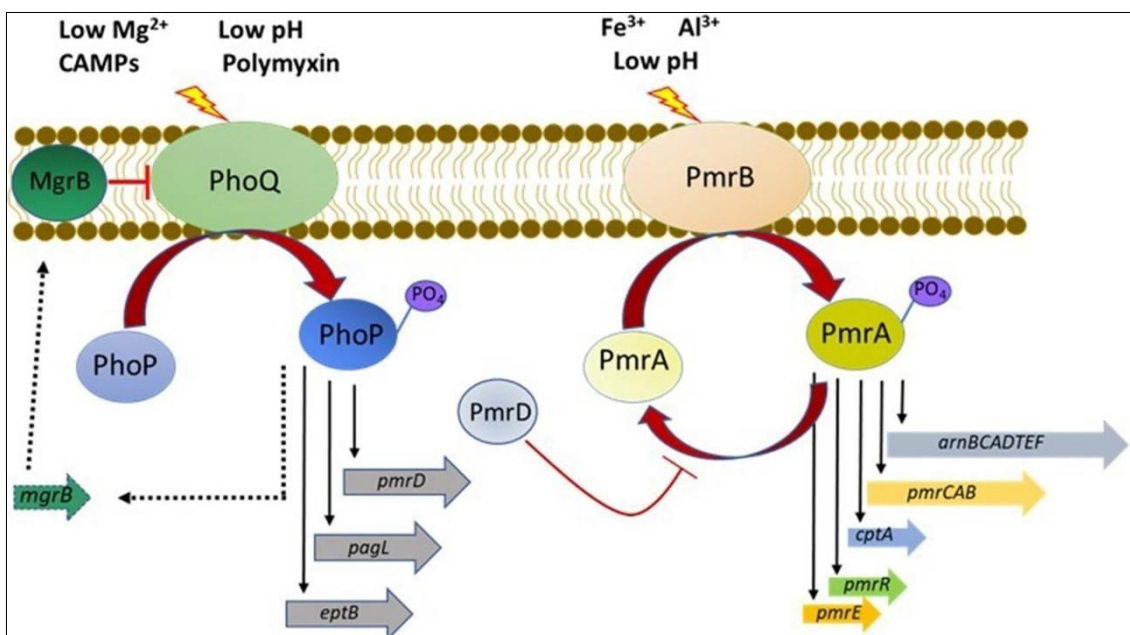
418 Outro mecanismo que as bactérias podem possuir é o gene *mcr-1*, que codifica
419 uma enzima transferase responsável por modificar o componente lipídico A do LPS. Esta
420 enzima catalisa a adição de pEtN aos grupos fosfato do lipídico A, reduzindo a carga
421 negativa e conseqüentemente, diminuindo a afinidade das polimixinas pela membrana
422 externa. Desde sua descoberta, variantes (*mcr-2* a *mcr-10*) foram identificadas em
423 diversas bactérias Gram-negativas. Essas variantes codificam enzimas semelhantes que
424 modificam a superfície da bactéria e reduzem a interação com as polimixinas
425 (ANDRADE et al., 2020; LIU et al., 2023).

426 A diferença da sequência entre esses genes levou à sua classificação em diferentes
427 variantes. O *mcr-2* é fortemente relacionado ao *mcr-1*, enquanto *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-7*,
428 *mcr-8*, *mcr-9* e *mcr-10* formam um subgrupo separado. Esses genes estão localizados em
429 diversos tipos de plasmídeos, como IncI2, IncHI2, IncX4, IncHI1, IncF, IncFI, IncFIB,
430 IncFII, IncP, IncP-1 e IncK, facilitando sua disseminação entre populações bacterianas.
431 De acordo com o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC), em 2017,
432 diferentes espécies bacterianas, como *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter*
433 *roggenkampii*., *Salmonella spp.*, e *E. coli*, foram identificadas com o gene *mcr*. Além
434 disso, há diversos relatos da presença desse gene em todo o mundo (AYOUB
435 MOUBARECK, 2020; LIU et al., 2023).

436
437
438

439

440



441 Figura 4 Mecanismos de resistência de bactérias Gram-negativas às polimixinas, mediados pelos sistemas
442 de dois componentes PhoQ e PmrAB. O sistema PhoQ é ativado por sinais ambientais como baixos
443 níveis de Mg^{2+} e Ca^{2+} , CAMPs e polimixinas. Essa ativação resulta na ativação do regulador de resposta
444 PmrA, que é mediada pela proteína PmrD. PmrA, por sua vez, ativa diversos genes e operons, como
445 *arnBCADTEF*, *pmrCAB*, *cptA*, *pmrR* e *pmrE* responsáveis pela modificação do LPS, adicionando grupos
446 carregados positivamente, como fosfoetanolamina (PEtN) e 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N).
447 Essas modificações diminuem a interação da membrana com a polimixina, ajudando a evitar seus efeitos
448 tóxicos. Fonte: Mohapatra et al., 2021.

449 2.14 Elementos genéticos móveis

450 Elementos genéticos móveis (EGMs) são segmentos de DNA capazes de se mover
451 entre e dentro de genomas. Esses elementos, que incluem plasmídeos, transposons e
452 integrons, desempenham um papel significativo na evolução bacteriana e na diversidade
453 genética. No entanto, eles são particularmente preocupantes porque podem possuir e
454 disseminar genes de resistência a antibióticos (ARGs) entre as bactérias. Essa capacidade
455 dos EGMs é um fator importante no aumento alarmante da resistência antimicrobiana
456 (BARLAAM et al., 2019; JIAN et al., 2021).

457 A propagação de ARGs é facilitada pelos EGMs por meio de um processo
458 conhecido como transferência horizontal de genes (THG), que inclui conjugação,
459 transformação e transdução. Esses processos permitem que microrganismos troquem
460 material genético além da transferência vertical. Na conjugação, a principal estrutura
461 relacionada são os plasmídeos, moléculas de DNA auto-replicantes que frequentemente
462 carregam múltiplos genes de resistência. Eles podem transferir esses genes entre bactérias
463 por meio de um processo chamado de conjugação, onde células doadoras e receptoras

464 trocam seu material genético. Além disso, os plasmídeos são considerados um dos
465 principais fatores na disseminação de ARGs, tornando-os uma ameaça para a saúde
466 pública que deve ser monitorada (BETHKE et al., 2020; VERRAES et al., 2013).

467 Ambientes como intestinos de animais, solo, água e biofilmes se tornam pontos
468 críticos para a THG devido à proximidade e interação entre diferentes bactérias. A cadeia
469 alimentar desempenha um papel importante na disseminação de genes de resistência. Os
470 EGMs presentes no esterco animal usado como fertilizante podem transferir genes de
471 resistência para bactérias do solo. A partir disso, os vegetais cultivados nesses locais
472 podem ser colonizados por esses microrganismos. Em seguida, ao serem consumidos,
473 esses alimentos possibilitam que os microrganismos presentes neles colonizem o intestino
474 de humanos e outros animais, aumentando assim a disseminação de genes de resistência
475 em diversas etapas da cadeia alimentar (MILLER; FERREIRA; LEJEUNE, 2022; WANG
476 et al., 2022).

477 **2.15 Sequenciamento do genoma bacteriano**

478 O sequenciamento genômico bacteriano, iniciado com o primeiro genoma
479 sequenciado de *Haemophilus influenzae* em 1995, representou um marco significativo na
480 microbiologia (FLEISCHMANN et al., 1995). Desde então, o número de genomas
481 bacterianos tem aumentado exponencialmente, impulsionado pelo desenvolvimento de
482 tecnologias de sequenciamento de próxima geração e ferramentas bioinformáticas para
483 montagem e anotação de genomas. Esses avanços possibilitaram uma compreensão mais
484 aprofundada da fisiologia, evolução e patogenicidade dos microrganismos (LAND et al.,
485 2015; LOMAN; PALLAN, 2015).

486 O sequenciamento de genomas bacterianos tornou-se uma ferramenta essencial no
487 monitoramento epidemiológico de patógenos bacterianos, além de também ser aplicado,
488 embora de forma menos frequente, a fungos e parasitas. A análise genômica facilita a
489 identificação e o rastreamento de genes de virulência e resistência bacteriana, tornando-
490 se indispensável para áreas como saúde pública, diagnóstico clínico e segurança
491 alimentar. Uma das análises que podem ser utilizadas a partir do sequenciamento é a
492 capacidade de diferenciar clones bacterianos e patótipos de *E. coli*, permitindo a
493 identificação de genes de virulência específicos utilizados na classificação de DEC e
494 ExPEC (LAND et al., 2015; LOMAN; PALLAN, 2015).

495 Entretanto, também existem outras técnicas importantes para a epidemiologia,
496 como o MLST (Multilocus Sequence Typing), que permite identificar clones bacterianos
497 disseminados mundialmente. Além disso, o sequenciamento permite identificar EGMs,

498 como plasmídeos e bacteriófagos. Diversos plasmídeos conhecidos globalmente, como o
499 plasmídeo NDM-1, foram identificados em diferentes países e são capazes de disseminar
500 genes de resistência a uma ampla gama de antibióticos, reforçando a necessidade do
501 monitoramento desses elementos (LIU et al., 2013; PÉREZ-LOSADA et al., 2013).

502 Com base nesse contexto, este estudo foi desenvolvido para avaliar a presença de
503 *E. coli* polimixina resistente em hortaliças na região de Londrina, Paraná, bem como
504 investigar o potencial desses microrganismos em disseminar genes de resistência as
505 polimixinas.

506

507

508 **3. Objetivos**

509 **3.1 Objetivo geral**

510 Realizar a caracterização genotípica e fenotípica da resistência a antimicrobianos
511 de *E. coli* resistentes à polimixina, isoladas de hortaliças comercializadas na região de
512 Londrina, Paraná.

513 **3.2 Objetivos específicos**

- 514 ❖ Isolar *E. coli* resistente a polimixinas de hortaliças;
- 515 ❖ Determinar a presença de genes de resistência a polimixina;
- 516 ❖ Avaliar a sensibilidade a antimicrobianos;
- 517 ❖ Avaliar a capacidade de conjugação;
- 518 ❖ Caracterizar os plasmídeos;
- 519 ❖ Identificar genes de resistência e virulência;
- 520 ❖ Determinar o perfil genético por MLST.

521 **4. Material e métodos**

522 **4.1 Isolamento, identificação e amostragem bacteriana**

523 O estudo foi realizado a partir de 514 amostras de hortaliças. Os isolados
524 bacterianos foram obtidos no período de outubro de 2022 até fevereiro de 2023 na cidade
525 de Londrina-PR e pertencem a Coleção de Bactérias do Laboratório de Bacteriologia da
526 UEL. As bactérias foram isoladas das hortaliças seguindo a metodologia de WONG;
527 WAN; CHEN, 2013, com modificações. Inicialmente, 25 gramas de cada amostra de
528 hortaliça foram adicionadas em um frasco esterilizado com 225 mL de água peptonada
529 tamponada, homogeneizadas por 5 minutos e incubadas por 24 horas a 37°C. Uma
530 alíquota de 1 mL da água peptonada foi então transferida para 9 mL de caldo BHI
531 (Difco™) suplementado com polimixina (4 mg/L) e incubada novamente por 24 horas a
532 37°C. Posteriormente, a cultura foi plaqueada em ágar MacConkey (Difco™) e incubada
533 por mais 24 horas a 37°C. Colônias suspeitas de *E. coli* (lisa, concava, arredondada e de
534 cor rosa) foram triadas bioquimicamente utilizando os testes EPM, MILi (PROBAC™,
535 BR) e citrato de Simmons (Difco™) para confirmação da espécie.

536 As amostras de hortaliças foram coletadas em proporções iguais entre cultivos
537 diretos e hidropônicos, abrangendo diferentes tipos de hortaliças, incluindo alface, rúcula,
538 almeirão, agrião, espinafre, repolho e escarola.

539 **4.2 Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos**

540 **4.2.1 Ensaio de microdiluição em caldo**

541 A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi conduzida
542 utilizando o método de microdiluição em caldo, seguindo as diretrizes recomendadas pelo
543 (“CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE”, 2023). Foram realizados
544 testes em triplicata, utilizando quatro concentrações diferentes de polimixina, em caldo
545 Mueller Hinton MHB (Difco™). A avaliação da CIM foi realizada de forma visual, e para
546 determinar a resistência dos isolados, foi considerada a maior concentração de polimixina
547 na qual ocorreu crescimento bacteriano.

548 **4.2.2 Sensibilidade a antimicrobianos**

549 Foi analisado o perfil de sensibilidade a antimicrobianos nos isolados obtidos de
550 *E. coli* das amostras de hortaliças, utilizando a técnica de disco difusão em ágar Mueller
551 Hinton (MHA) (Difco™) (BAUER et al., 1966). E para avaliar o perfil ESBL foi

552 realizada a técnica de disco de aproximação seguindo as diretrizes do CLSI, 2023. Foram
553 usados os antimicrobianos recomendados pelo CLSI, 2023. No teste, foram empregados
554 19 antimicrobianos, amplamente utilizados em humanos e animais, entre eles estão:
555 Piperacilina + Tazobactam (PPT), Amoxicilina + Clavulanato (AMC), Ampicilina
556 (AMP), Cefalotina (CFL), Cefoxitina (CFO), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO),
557 Ceftiofur (CTF), Cefepime (CPM), Aztreonam (ATM), Ertapenem (ERT), Enrofloxacino
558 (ENO), Levofloxacino (LEV), Fosfomicina (FOS), Sulfametoxazol (SUT), Norfloxacino
559 (NOR), Gentamicina (GEN), Ácido Nalidíxico (NAL) e Ciprofloxacino (CIP).

560 **4.3 Teste de transferência por conjugação**

561 Para avaliar a capacidade de conjugação, foi utilizado a metodologia de Gama et
562 al., 2020 com alterações. Foram preparados tubos de ensaio contendo caldo LB (Difco™),
563 com azida de sódio a 150 mg/L e polimixina B a 4 mg/L. Nos recipientes com azida de
564 sódio, foi inoculado *E. coli* J53 (F⁻ met pro Azi), enquanto nos recipientes com
565 polimixina, foram inoculados os isolados de *E. coli* deste estudo, sendo todos incubados
566 por 24 horas a 37°C. Após o crescimento, 20 µL da cultura doadora e 180 µL da cultura
567 receptora foram adicionados em placas de 96 poços em uma escala de 1:10, e incubado
568 por 24 horas a 37°C. Em seguida, 100 µL do crescimento foram transferidos para uma
569 placa de ágar MacConkey (Difco™) contendo 150 mg/L de azida de sódio e 4 mg/L de
570 polimixina, e o líquido foi espalhado com uma alça de Drigalski, com posterior incubação
571 por mais 24 horas a 37°C. Os resultados foram determinados pelo crescimento de colônias
572 nas placas, seguido da transferência de uma colônia para um tubo de ensaio contendo
573 azida de sódio e polimixina nas mesmas concentrações. O tubo foi então incubado a 37°C
574 por 24 horas, e, após a incubação, foi observado o crescimento do transconjugantes,
575 confirmando a o teste de conjugação.

576 **4.4 Sequenciamento do genoma total**

577 Os isolados bacterianos foram sequenciados na plataforma Illumina MiSeq. O
578 sequenciamento foi realizado pelo Instituto de Pesquisa do Câncer (IPEC) de acordo com
579 as normas do fabricante.

580 **4.4.1 Montagem e Anotação**

581 O controle de qualidade das reads, foi feito utilizando o Trimmomatic v0.39
582 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014), a montagem foi feita pelo SPAdes 4.0.0
583 (BANKEVICH et al., 2012), enquanto a anotação foi feita pelo Prokka v1.14.5
584 (SEEMANN, 2014). Os genes de resistência e virulência e plasmídeos foram

585 identificados utilizando o software ABRicate v1.0.0
586 (<https://github.com/tseemann/abricate>) (CARATTOLI et al., 2014; JIA et al., 2017;
587 ZANKARI et al., 2012). O sorotipo e o MLST, respectivamente pelo ECTyper v.1.0.0
588 (BESSONOV et al., 2021) e PubMLST (JOLLEY; BRAY; MAIDEN, 2018).

589 **4.4.2 Análise filogenética e wgMLST**

590 Para a análise filogenética das cepas portadoras do plasmídeo com o gene *mcr*, foi
591 gerada uma minimum spanning tree no Enterobase utilizando o algoritmo MSTree V2,
592 utilizando o wgMLST das cepas selecionadas (ZHOU et al., 2020). Genomas de *E. coli*
593 com o ST correspondente, disponíveis publicamente, foram incluídos, juntamente com
594 dados epidemiológicos relevantes (fonte de origem, ano de coleta e país) para uma análise
595 comparativa. As figuras foram produzidas com o software Interactive Tree of Life, iTOL
596 v6 (LETUNIC; BORK, 2024).

597 **4.4.3 Caracterização dos plasmídeos *mcr***

598 Para construir a imagem do plasmídeo, inicialmente foi utilizada a plataforma
599 BLAST/NCBI utilizando as sequências dos genes *mcr* presentes nos plasmídeos
600 AP005147 e AP010962 (ALTSCHUL et al., 1990). Em seguida, entre 100 plasmídeos
601 analisados, foram selecionados aqueles que apresentavam o gene *mcr*. A imagem foi
602 gerada utilizando o software BRIG (ALIKHAN et al., 2011).

603 **4.4.4 Análise de genes relacionados com DEC e EXPEC**

604 Foi avaliada a presença dos seguintes genes para determinar o perfil de DEC: *eae*,
605 *bfpA*, *tir*, *espA*, *espB*, *espD*, *aggR*, *aafA*, *aap*, *astA*, *estA*, *estB*, *elt*, *ipaH*, *stx1*, *stx2*, *daaE*
606 (GOMES et al., 2016). Para o perfil de ExPEC, foram analisados os genes: *fm*, *afa*, *dra*,
607 *pap*, *sfa*, *foc*, *iha*, *mat*, *crl*, *csg*, *agn43(fu)*, *ibeA*, *ibeB*, *ibeC*, *iuc*, *aer*, *irp*, *iroN*, *chu*, *hma*,
608 *sitA*, *sitB*, *sitC*, *traT*, *KpsMI-neuA*, *KpsMII*, *omp*, *iss*, *colV*, *cvaC*, *pic*, *sat*, *vat*, *hlyA*, *cnf*,
609 *cdt* (SAROWSKA et al., 2019). As análises foram feitas a partir do software virulence
610 factor database (VFDB) (LIU et al., 2022).

611 Além disso, foi realizada uma análise filogenética, utilizando o software BPGA
612 v1.3 (CHAUDHARI; GUPTA; DUTTA, 2016) das cepas deste estudo em comparação
613 com os genomas de cepas DEC e ExPEC, com o objetivo de observar possíveis relações.

614

615 **5. Resultados**

616 **5.1 Isolamento e identificação**

617 Dentre as 514 amostras de hortaliças, foram isoladas 10 (2%) cepas de *E. coli*
618 resistentes a polimixina, no período de outubro de 2022 até fevereiro de 2023 na cidade
619 de Londrina-PR. Sendo 5 provenientes de alface, 2 de almeirão e 1 de cada das seguintes
620 hortaliças: agrião, couve e rúcula. Com relação ao cultivo, 6 (60%) foram de cultivo direto
621 e 4 (40%) de cultivo hidropônico (Figura 5).

622 **5.2 Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos**

623 **5.2.1 Ensaio de microdiluição em caldo**

624 Todos os isolados foram submetidos ao teste de CIM, para determinar a resistência
625 a polimixina, dentre os 10 isolados, 8 apresentaram crescimento na concentração de 4
626 mg/L, enquanto os dois restantes apresentaram 8 mg/L e 16 mg/L, sendo classificados
627 resistentes com base no CLSI, 2023 (Figura 5).

628 **5.2.2 Sensibilidade a antimicrobianos**

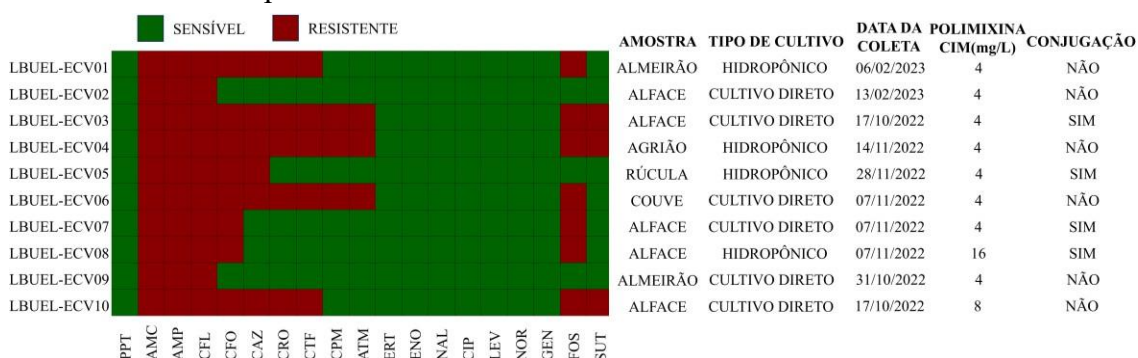
629 Conforme apresentado na Figura 5, todos os isolados mostraram resistência a
630 AMC, AMP e CFL. Além disso, 8 isolados foram resistentes a CFO, 7 a FOS, 6 a CAZ,
631 5 a CRO e CTF, e 3 isolados a ATM, CPM e SUT. Por fim, nenhum dos isolados
632 apresentou resistência a CIP, ENO, ERT, GEN, LEV, NAL, NOR e PPT

633 **5.3 Teste de transferência de genes por conjugação**

634 Foi realizado o teste de conjugação, dentre os 10 isolados 4 conseguiram transferir
635 o plasmídeo para a cepa receptora *E. coli* J53. Os transconjugantes foram inoculados em
636 um novo meio contendo polimixina e azida de sódio para confirmar a transferência do
637 plasmídeo e resistência a ambos antimicrobianos (Figura 5).

638
639
640
641
642
643
644
645
646
647

648 Figura 5. Gráfico de calor demonstrando os dados da origem das amostras e suas
 649 características fenotípicas



650
 651 Pteridilina + Tazobactam (PPT), Amoxicilina + Clavulanato (AMC), Ampicilina (AMP), Cefalotina
 652 (CFL), Cefoxitina (CFO), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO), Ceftiofur (CTF), Cefepime (CPM),
 653 Aztreonam (ATM), Ertapenem (ERT), Enrofloxacino (ENO), Ácido Nalidíxico (NAL), Ciprofloxacino
 654 (CIP), Levofloxacino (LEV), Norfloxacino (NOR), Gentamicina (GEN), Fosfomicina (FOS),
 655 Sulfametoxazol (SUT).

656 5.4 Sequenciamento do genoma total e análises filogenética

657
 658 A análise dos genomas revelou uma diversidade entre as 10 cepas estudadas em
 659 relação à filotipagem de Clermont, com a presença dos grupos B1 e A (Tabela 1).
 660 Variações similares foram observadas nos sorotipos, que apresentaram classificações
 661 distintas. Em relação aos STs, três cepas compartilharam o ST48, pertencente ao
 662 complexo clonal ST10, enquanto as demais exibiram maior diversidade (Tabela 1).
 663 Quanto aos genes relacionados à resistência à polimixina, todas as cepas possuíam o gene
 664 cromossomal *pmr*, e quatro apresentavam o gene plasmidial *mcr*. Entre os plasmídeos
 665 identificados, dois plasmídeos (AP010962 e AP005147) abrigavam o gene *mcr-1* e
 666 estavam presentes em quatro das cepas analisadas (Tabela 1). A análise dos genes de
 667 resistência a antimicrobianos, com base nos resultados fenotípicos, revelou um perfil
 668 semelhante entre as cepas, com a identificação dos mesmos genes na maioria delas.
 669 Contudo, diferenças foram observadas nos genes associados à resistência a cefalosporinas
 670 e aminoglicosídeos (Tabela 2).

671 Tabela 1. Filotipagem de Clermont, Sorotipo, ST, Complexo Clonal, Genes de
 672 resistência/Polimixina, Grupo Inc/Plasmídeo, das cepas isoladas de hortaliças na cidade
 673 Londrina-PR.

ID	Filotipagem de Clermont	Sorotipo	ST	Complexo Clonal ST	Genes de resistência/Polimixina	Grupo Inc/Plasmídeo
LBUEL-ECV01	B1	H28	3640	-	<i>PmrD</i> ; <i>PmrB</i> ; <i>PmrR</i>	-
LBUEL-ECV02	B1	O134H21	345	ST23 Cplx	<i>PmrD</i> ; <i>PmrB</i> ; <i>PmrR</i>	-

LBUEL-ECV03	A	O15H11	48	ST10 Cplx	<i>PmrD</i> ; <i>PmrB</i> ; <i>PmrR</i> ; <i>mcr-1</i> .	p0111_1_AP010962; IncII-I(Alpha)_1_AP005147; IncQ1_1_M28829
LBUEL-ECV04	B1	O32H40	58	ST155 Cplx	<i>PmrD</i> ; <i>PmrB</i> ; <i>PmrR</i>	-
LBUEL-ECV05	A	O99H9	48	ST10 Cplx	<i>PmrB</i> ; <i>PmrR</i> ; <i>PmrD</i> ; <i>mcr-1</i>	Col(pHAD28)1_KU674895; p0111_1_AP010962
LBUEL-ECV06	B1	H21	602	ST446 Cplx	<i>PmrD</i> ; <i>PmrR</i> ; <i>PmrB</i>	Col(pHAD28)1_KU674895
LBUEL-ECV07	A	O15H11	48	ST10 Cplx	<i>PmrD</i> ; <i>PmrR</i> ; <i>PmrB</i> ; <i>mcr-1</i>	IncQ1_1_M28829; p0111_1_AP010962
LBUEL-ECV08	B1	O8H7	196	-	<i>PmrD</i> ; <i>PmrR</i> ; <i>PmrB</i> ; <i>mcr-1</i>	IncI2(Delta)_1_AP002527; Col156_1_NC_009781; IncIII(Alpha)_1_AP005147
LBUEL-ECV09	B1	O134H53	345	ST23 Cplx	<i>PmrD</i> ; <i>PmrR</i> ; <i>PmrB</i>	-
LBUEL-ECV10	A	O89H10	10	ST10 Cplx	<i>PmrF</i> ; <i>PmrC</i>	-

674

675 Tabela 2. Genes relacionados as classes de antimicrobianos a resistência fenotípica
676 encontrada no antibiograma

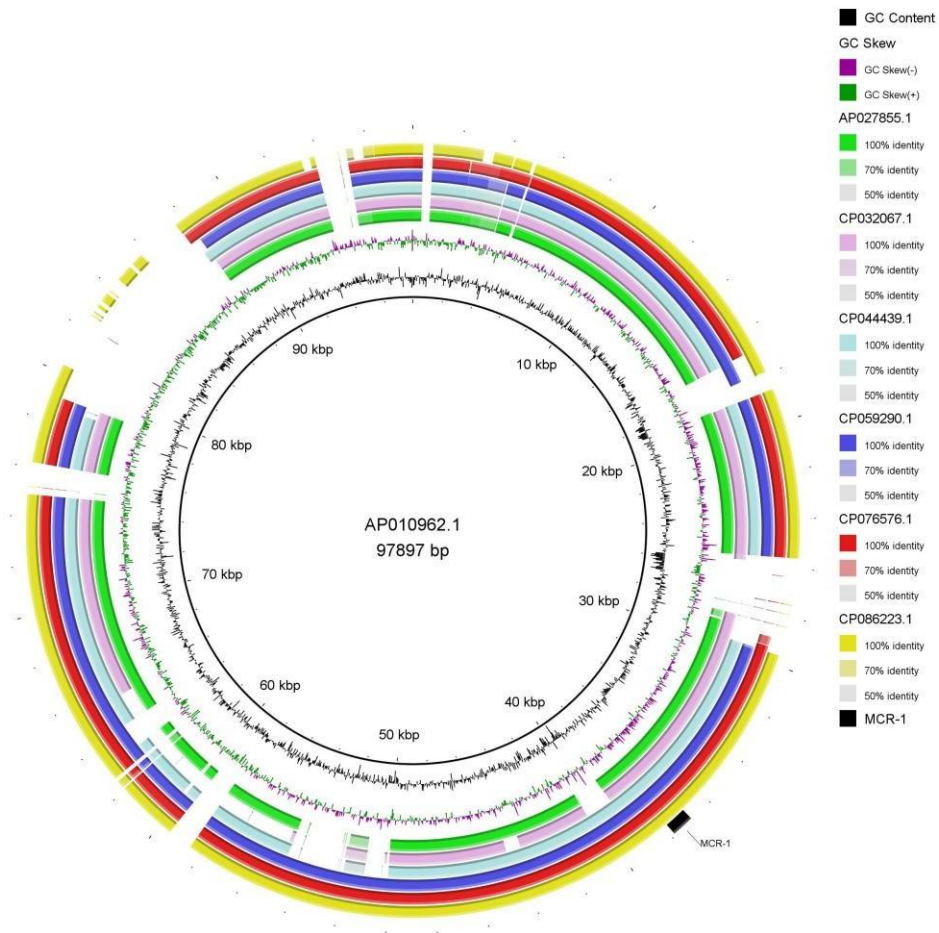
ID	PEN	CEF	MON	CAR	QUI	AMI	FOS	SUL
LBUEL-ECV01	<i>blaAMPC</i>	<i>EC-18, acrS, acrE, acrF, acrB, acrA, blaAMPC</i>	-	<i>marA</i>	-	<i>kdpE, acrD</i>	<i>mdtG</i>	-
LBUEL-ECV02	<i>blaAMPC</i>	<i>EC-18, acrA, acrS, acrE, acrF, acrB, blaAMPC</i>	-	<i>marA</i>	-	<i>kdpE,</i>	-	-
LBUEL-ECV03	<i>blaAMPC</i>	<i>EC-15, acrF, acrE, acrS, acrB, acrA, blaAMPC</i>	-	<i>marA</i>	-	-	<i>mdtG</i>	-
LBUEL-ECV04	<i>blaAMPC</i>	<i>EC-18, acrF, acrE, acrS, acrB, acrA, blaAMPC</i>	-	<i>marA</i>	-	<i>kdpE, acrD, baeR, cpxA</i>	<i>mdtG</i>	-
LBUEL-ECV05	<i>blaAMPC</i>	<i>EC-15, acrA, acrB, blaAMPC</i>	-	<i>marA</i>	-	<i>acrD, kdpE</i>	-	-
LBUEL-ECV06	<i>blaAMPC</i>	<i>EC-18, acrE, acrS, acrF, acrA, acrB, blaAMPC</i>	-	<i>marA</i>	-	<i>kdpE, AcrD</i>	<i>mdtG</i>	-
LBUEL-ECV07	<i>blaAMPC</i>	<i>EC-15, acrE, acrS, acrF, acrB, acrA, blaAMPC</i>	-	<i>marA</i>	-	<i>acrD, kdpE</i>	<i>mdtG</i>	-
LBUEL-ECV08	<i>blaAMPC</i>	<i>EC-18, acrA, acrB, acrE, acrS, AcrF, blaAMPC</i>	-	<i>marA</i>	-	<i>acrD, kdpE, baeR, baeS, cpxA</i>	<i>mdtG</i>	-
LBUEL-ECV09	<i>blaAMPC</i>	<i>EC-18, acrB, acrA, acrE, acrS, acrF, blaAMPC</i>	-	<i>marA</i>	-	<i>kdpE, acrD, cpxA</i>	<i>mdtG</i>	-

LBUEL- ECV10	<i>blaAMPC</i>	<i>acrE, acrS, acrF, acrA, acrB, blaAMPC</i>	-	<i>marA</i>	-	<i>kdpE, acrD</i>	<i>mdtG</i>	-
-------------------------	----------------	--	---	-------------	---	-----------------------	-------------	---

677 PEN (Penicilina), CEF (Cefalosporina), MON (Monobactâmico), CAR (Carbapenêmico), QUI
678 (Quinolonas), AMI (Aminoglicosídeo), FOS (Fosfomicina), SUL (Sulfonamida).

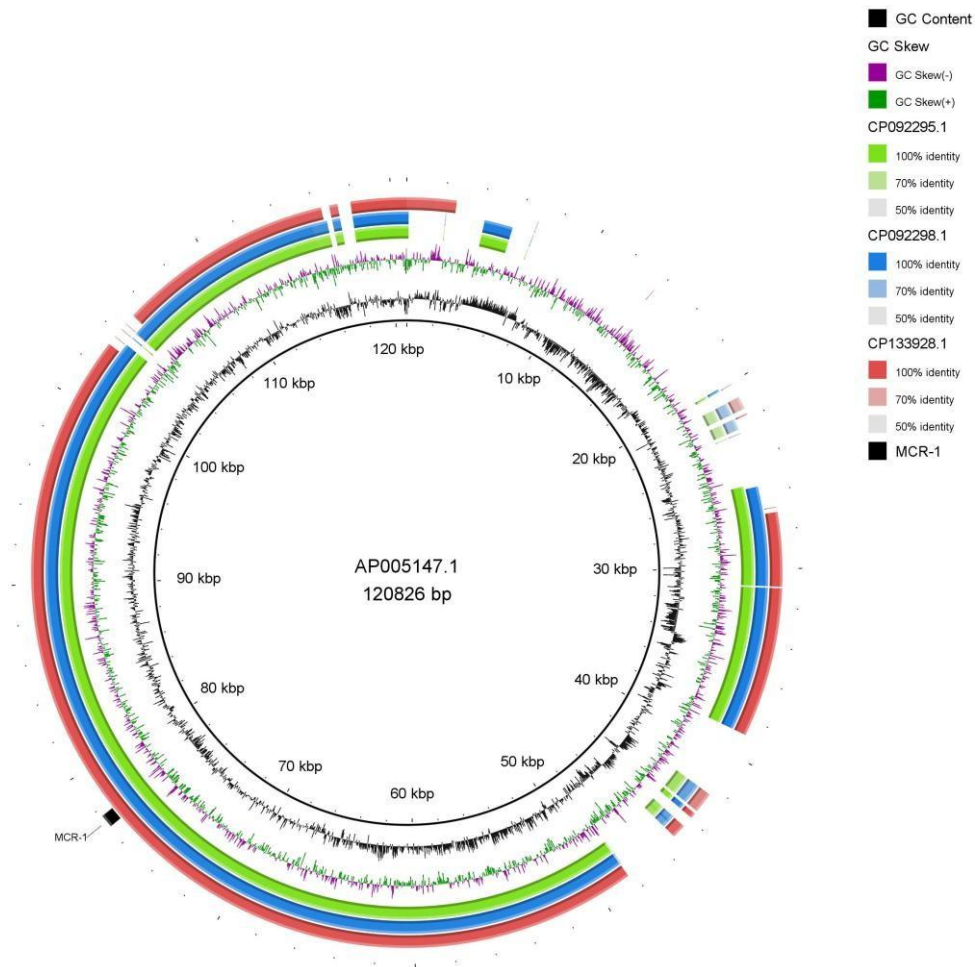
679 Foram identificados dois plasmídeos contendo o gene *mcr-1*,
680 p0111_1_AP010962 e IncIII(Alpha)_1_AP005147. O plasmídeo circular AP010962,
681 com 97.897 bp (Figura 6), apresentou cobertura e identidade de 100% e 98,64%,
682 respectivamente. Já o plasmídeo circular AP005147, com 120.826 bp (Figura 7),
683 apresentou cobertura de 93,66% e identidade de 88,97%. A análise BLAST indicou que
684 AP005147 está relacionado a plasmídeos de *Salmonella enterica* e *E. coli* contendo o
685 gene *mcr-1*, isolados de amostras humanas. Por sua vez, AP010962 foi associado a
686 plasmídeos de *E. coli* de diferentes fontes, como suínos, aves e humanos. Outros
687 plasmídeos identificados, incluindo KU674895, M28829, NC_009781 e AP002527,
688 foram analisados, mas não apresentaram genes relacionados à resistência à polimixina
689 (Tabela 1). Por fim, ambos os plasmídeos apresentaram genes relacionados com sua
690 mobilização como: *repA, parA, parB, traW, traY, traC, traE, traF*.

691 Figura 6. Comparação entre os plasmídeos carregando o gene *mcr-1* de *E. coli* pO111_2
692 (AP010962), *E. coli* p2017-19-1CC (AP027855), *E. coli* p.E166-P1 (CP032067), *E. coli*
693 pHeN100_02 (CP044439), *E. coli* p1506-2 (CP059290), *E. coli* pCPWWCT-p0111
694 (CP076576), *E. coli* p779-3 (CP086223).



695

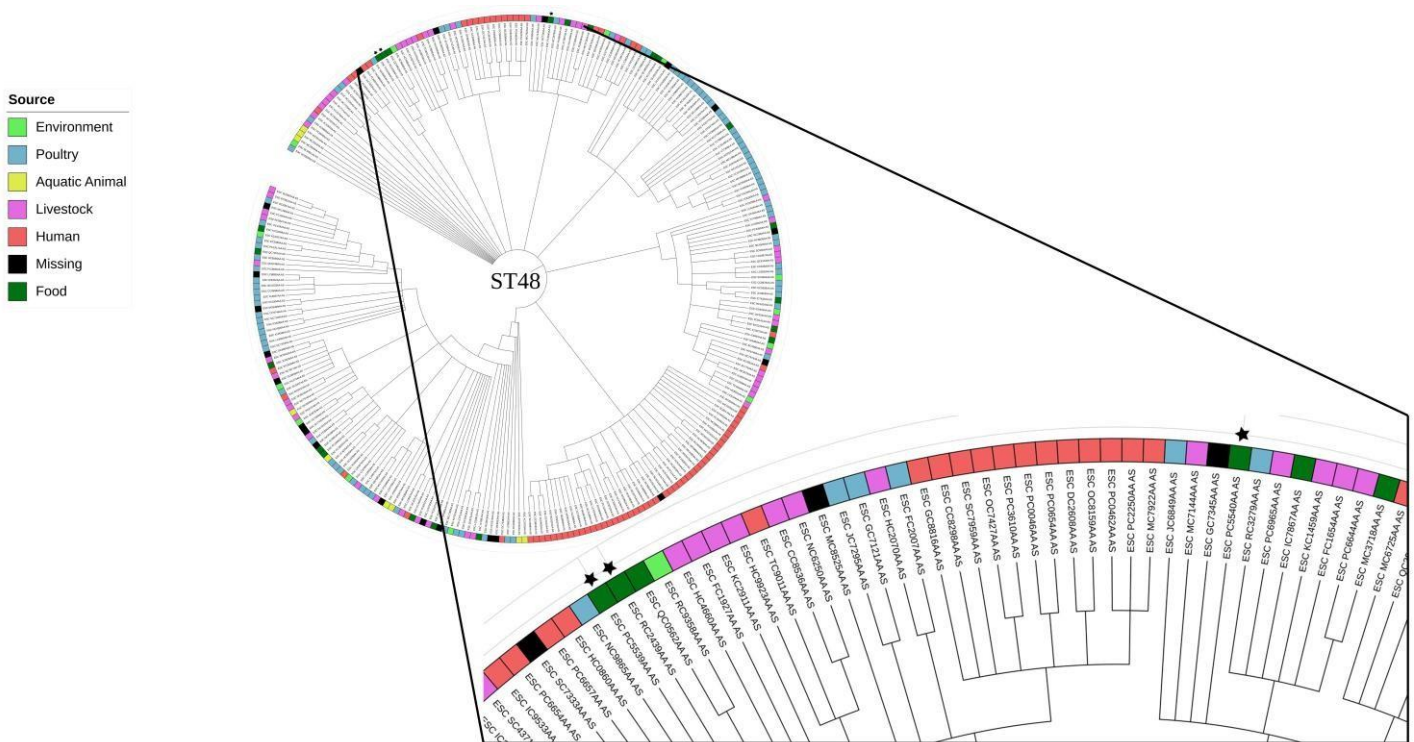
696 Figura 7. Comparação entre os plasmídeos carregando o gene *mcr-1* de *S. enterica* R64
 697 (AP005147), *S. enterica* PNUSAS070160_1 (CP092295), *S. enterica* PNUSAS041145_1
 698 (CP092298), *E. coli* pEco_M22546_100 (CP133928).



699

700 A análise da árvore filogenética revelou que as cepas do nosso estudo pertencente
 701 ao ST 48, LBUEL-ECV03 (ESC_PC5539AA_AS), LBUEL-ECV07
 702 (ESC_RC2349AA_AS) e LBUEL-ECV05 (ESC_PC5540AA_AS), estão associadas a
 703 diferentes fontes. Observou-se uma relação entre as cepas LBUEL-ECV03 e LBUEL-
 704 ECV07 com isolados provenientes do ambiente e de galinhas. Já a cepa LBUEL-ECV05
 705 apresentou uma relação significativa com isolados de gado e galinhas (Figura 8).

706 Figura 8. Filogenia de *E. coli* isoladas de hortaliças portadoras do gene *mcr-1*. wgMLST
 707 de 277 cepas de *E. coli* do ST48, isoladas entre 2022 e 2024. Foi construída uma minimum
 708 spanning tree com as cepas do banco de dados Enterobase, utilizando a ferramenta
 709 MSTree V2. Cada quadrado representa a origem das cepas, enquanto as estrelas indicam
 710 as cepas deste estudo.



711

712 Todas as 10 cepas (100%) apresentaram o gene *csg*. Os genes *ibeC* e *ibeB* foram
 713 detectados em 9 (90%) e 8 (80%) das cepas, respectivamente. O gene *omp* foi identificado
 714 em 7 cepas (70%), enquanto os genes *astA* e *afa* foram encontrados em apenas 1 cepa
 715 cada (10%) (Tabela 3).

716 A análise filogenética do coregenoma para DEC revelou semelhanças entre as
 717 cepas LBUEL-ECV02 e EHEC, LBUEL-ECV08 e EIEC, e LBUEL-ECV07, LBUEL-
 718 ECV03 e ETEC. Na análise do pangenoma, foi observada semelhança apenas entre
 719 LBUEL-ECV08 e EIEC (Figura 9). A análise filogenética do coregenoma de ExPEC
 720 indicou semelhança entre LBUEL-ECV10 e MPEC. No entanto, na análise do
 721 pangenoma, não foram identificadas semelhanças entre os patótipos e as cepas avaliadas
 722 neste estudo (Figura 10).

723 Tabela 3. Presença de genes relacionados a EXPEC e DEC encontrado nos genomas.

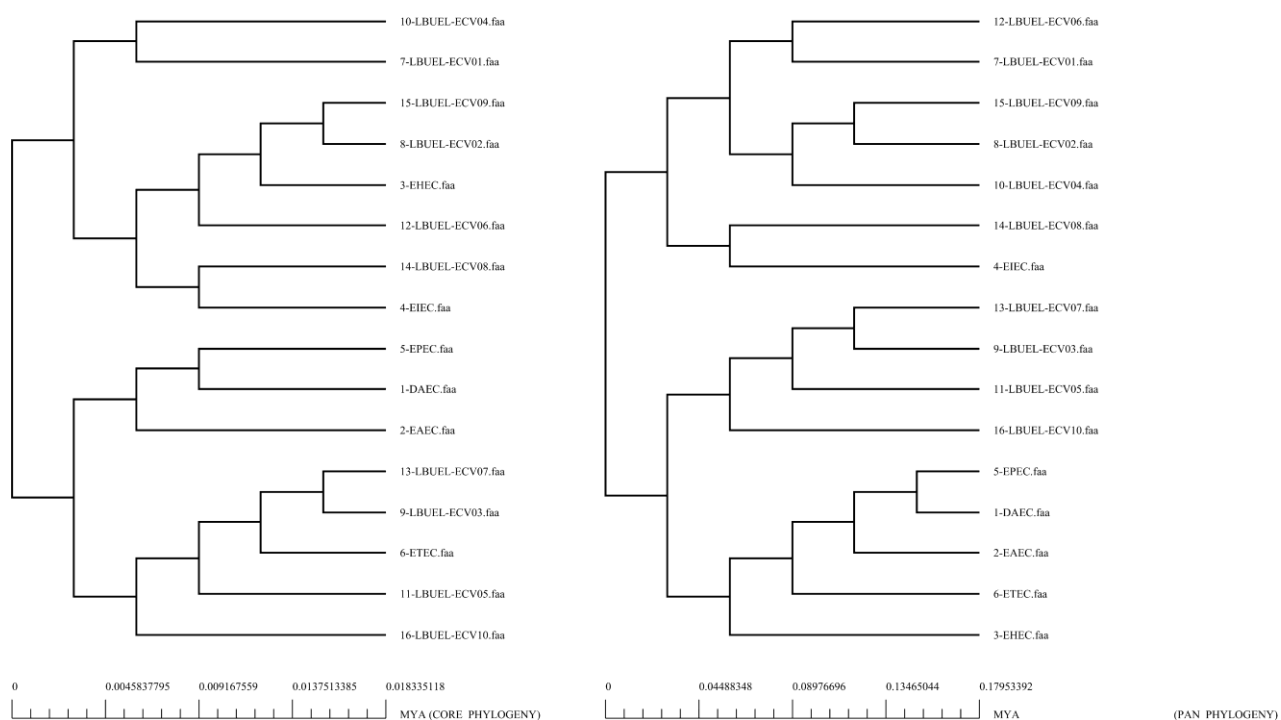
ID	EAEC	EPEC	EHEC	EIEC	DAEC	ETEC	ExPEC
LBUEL-ECV01							<i>csg, ompD, ibeC</i>
LBUEL-ECV02							<i>csg, ompD</i>
LBUEL-ECV03							<i>csg, ompD, ibeB</i>

LBUEL-ECV04		<i>csg ibeB,ibeC</i>
LBUEL-ECV05		<i>csg, ompD,ibeB,ibeC</i>
LBUEL-ECV06		<i>afa, csg, ompD, ibeB,ibeC</i>
LBUEL-ECV07		<i>csg, ibeB,ibeC</i>
LBUEL-ECV08		<i>csg,ompD, ibeB,ibeC</i>
LBUEL-ECV09		<i>csg ibeB,ibeC</i>
LBUEL-ECV10	<i>astA</i>	<i>csg, ompD, ibeB,ibeC</i>

724

725 Figura 9. Árvores filogenéticas representando o coregenoma (à esquerda) e o pangenoma (à direita) das cepas analisadas neste estudo, comparadas com genomas de cepas de DEC.

726



727

728

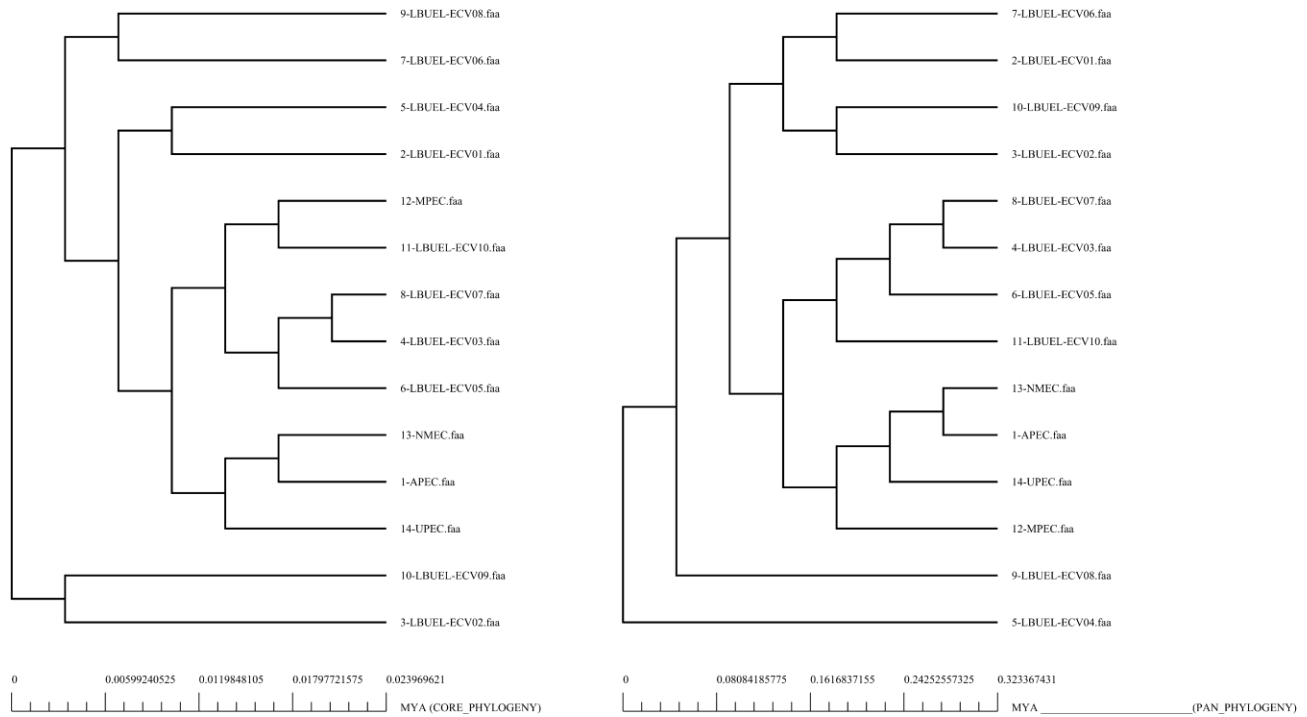
729

730

731

732

733 Figura 10. Árvores filogenéticas representando o coregenoma (à esquerda) e o
 734 pangênoma (à direita) das cepas analisadas neste estudo, comparadas com genomas de
 735 cepas de EXPEC.
 736



737
 738
 739

740 6. Discussão

741 O consumo de hortaliças é essencial para uma vida saudável. Entretanto, esses
742 alimentos são frequentemente consumidos crus sem preparo prévio, o que pode torná-los
743 vetores de patógenos. Os principais microrganismos relacionados a esses alimentos são
744 *E. coli* e *S. enterica*. Estudos relatam diversos surtos associados a essas bactérias, que
745 ocorrem mundialmente (BALALI et al., 2020; BERGER et al., 2010; MARSHALL,
746 2020). Em nosso estudo, foi observado que a presença de *E. coli* pode ser atribuída a
747 diversos tipos de hortaliças, resultado que se alinha a outros estudos (LI et al., 2023;
748 WILLIS et al., 2020). Isso evidencia que provavelmente não há relação exclusiva entre
749 esse microrganismo e hortaliças específicas. No entanto, pode haver maior prevalência
750 em certos tipos, como alfaces (GONZÁLEZ et al., 2017; MANAGEIRO et al., 2020).

751 O método de cultivo desses alimentos pode ser realizado de diferentes formas. No
752 cultivo direto, as hortaliças são inseridas no solo e se desenvolvem até a colheita (FUSSY;
753 PAPENBROCK, 2022). No cultivo hidropônico, as hortaliças não estão em contato com
754 o solo, e suas raízes ficam imersas em água com nutrientes necessários para o
755 desenvolvimento da planta (KANNAN et al., 2022). Em nosso estudo, os isolados foram
756 provenientes de ambos os sistemas de cultivo. Estudos com *E. coli* O157:H7 mostraram
757 que essa bactéria, em cultivo hidropônico e direto, pode penetrar pelas raízes e infectar a
758 planta. Em ambos os casos, acredita-se que o processo tenha início em danos presentes
759 nas raízes (MACARISIN; PATEL; SHARMA, 2014; SHAW et al., 2016). Dessa forma,
760 os resultados obtidos neste estudo sugerem que a prevalência de *E. coli* em hortaliças não
761 está diretamente relacionada ao tipo de cultivo, mas possivelmente a outros fatores.

762 Bactérias resistentes às polimixinas representam um grave problema para a saúde
763 global, apresentando um risco significativo para o tratamento de infecções bacterianas
764 MDR (MAGIORAKOS et al., 2012; MOHAPATRA; DWIBEDY; PADHY, 2021). A
765 situação se agrava pela presença de microrganismos resistentes às polimixinas em
766 hortaliças. Apesar de não utilizarem a mesma metodologia de isolamento, estudos
767 similares obtiveram os mesmos achados em diferentes países, como na Coreia do Sul
768 (7/1474), China (2/712) e Portugal (1/333)(JONES-DIAS et al., 2016; LIU; SONG, 2019;
769 MANAGEIRO et al., 2020; OH et al., 2020). Apesar da baixa prevalência, sua ampla
770 detecção em diferentes países é notável, evidenciando a capacidade de disseminação da
771 resistência às polimixinas.

772 O gene *mcr-1*, responsável pela resistência à polimixina, está localizado em
773 plasmídeos e já foi relatado em bactérias como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *S.*

774 *enterica* (DOUMITH et al., 2016; KIEFFER et al., 2017). Diversos plasmídeos contendo
775 esse gene foram identificados, sendo isolados de diversas fontes, incluindo humanos,
776 produtos animais e vegetais, em países como China, Dinamarca e Reino Unido
777 (MANAGEIRO et al., 2020; SUN et al., 2017). Esses plasmídeos podem ser transmitidos
778 para outra célula bacteriana, através da conjugação, o que facilita a disseminação do gene
779 *mcr-1* para outras bactérias e ambientes. O processo de conjugação contribui para a
780 propagação de resistência, aumentando o risco de disseminação desses genes
781 mundialmente (LI et al., 2022b; ZHANG et al., 2019).

782 Bactérias produtoras de *blaAMPC* representam um grande obstáculo para o
783 tratamento de infecções bacterianas. Esse problema torna-se ainda mais grave quando as
784 bactérias carregam tanto os genes responsáveis por *blaAMPC* quanto aqueles
785 relacionados à resistência a polimixinas. Embora haja poucos relatos da ocorrência
786 conjunta desses genes, sua presença já foi observada em diferentes países, como Estônia
787 e Espanha (ANYANWU; JAJA; NWOBI, 2020; BRAUER et al., 2016; OTEO et al.,
788 2018). No Brasil, já foi relatada a presença de *E. coli* carregando simultaneamente os
789 genes *mcr-1* e *blaCTX-M*, isolada de humanos e de gado. No entanto, ainda não há
790 registros de isolados provenientes de hortaliças que contenham os genes *mcr-1* e
791 *blaAMPC* (FERNANDES et al., 2016; PALMEIRA et al., 2018).

792 A fosfomicina é um antimicrobiano amplamente utilizado no tratamento de
793 infecções bacterianas, especialmente no trato urinário humano (FALAGAS et al., 2016).
794 Estudos têm demonstrado a presença de bactérias com genes que conferem resistência
795 tanto à fosfomicina quanto à polimixina. O gene *fosA*, por exemplo, é o mais prevalente
796 e foi identificado em diferentes contextos, como em supermercados no Egito, em animais
797 na França e em galinhas na Malásia (KARIM et al., 2023; LUPO et al., 2018;
798 RAMADAN et al., 2021). Por outro lado, o gene *mdtG*, identificado neste estudo e
799 conhecido por estar associado à resistência à fosfomicina, ainda não havia sido relatado
800 em associação com genes de resistência à polimixina (HUSSAIN et al., 2017). A
801 resistência à fosfomicina é particularmente preocupante, pois elimina uma das opções de
802 tratamento para infecções frequentemente causadas por *E. coli* (JOHNSON, 1991a).
803 Além disso, a presença de cepas com um amplo arsenal de genes de resistência agrava a
804 situação, tornando essas infecções potencialmente letais devido à falta de opções
805 terapêuticas eficazes.

806 Outro fator alarmante é a presença desses patógenos em hortaliças, o que aumenta
807 o risco de contaminação cruzada durante o manejo de alimentos. Essa contaminação pode

808 facilitar a disseminação de bactérias resistentes em diferentes situações (GORMAN;
809 BLOOMFIELD; ADLEY, 2002). Durante o processamento desses alimentos na cozinha,
810 o manuseio inadequado é um dos principais fatores, envolvendo mãos, facas e tábuas de
811 corte como fontes potenciais de contaminação (MYLIUS; NAUTA; HAVELAAR, 2007).
812 Entretanto, a maior parte da contaminação ocorre nas tábuas onde os alimentos são
813 processados, especialmente quando o mesmo utensílio é utilizado para diferentes
814 alimentos sem a devida higienização. Um exemplo comum é cortar carne de frango crua
815 e, em seguida, utilizar a mesma tábua para cortar vegetais sem limpeza prévia
816 (IULIETTO; EVERS, 2024). De acordo com a EFSA AND ECDC, 2019,
817 aproximadamente 40% das contaminações desses alimentos ocorre na cozinha, durante o
818 manuseio.

819 Os grupos de incompatibilidade (Inc) mais prevalentes em plasmídeos que
820 possuem o gene *mcr-1* são IncI2, IncX4 e IncHI2 (MATAMOROS et al., 2017). Existem
821 poucos estudos que relataram plasmídeos contendo o gene *mcr-1* nos grupos IncI1 ou
822 p0111 (BROUWER et al., 2020; WANG et al., 2024a). Esses plasmídeos estão
823 frequentemente associados a genes que codificam ESBL, sendo isolados comumente de
824 humanos, gado e galinhas (ROZWANDOWICZ et al., 2018). De acordo com a literatura,
825 acredita-se que o gene *mcr-1* se propaga por diferentes plasmídeos, em vez de um clone
826 predominante (MATAMOROS et al., 2017). Isso pode facilitar o surgimento de novos
827 plasmídeos capazes de disseminar a resistência a polimixina, dificultando seu
828 monitoramento epidemiológico.

829 Multilocus sequence typing (MLST) é um método de tipagem bacteriana
830 amplamente utilizado para identificar e agrupar molecularmente cepas bacterianas, sendo
831 uma ferramenta importante no estudo de populações bacterianas (MAIDEN, 2006). O
832 ST48 já foi relatado em diversos países e fontes, como na China, em hospitais e galinhas;
833 na França, em água; e na República Tcheca, em aves. Além disso, bactérias pertencentes
834 a esse ST podem carregar diversos genes de resistência, como *blaKPC*, *blaNDM*,
835 *blaCTX-M*, *mcr-1* e *qnrS1* (LIU et al., 2017; MADEC et al., 2016; MIKHAYEL et al.,
836 2021; RÖDEROVA et al., 2017; WANG et al., 2020) A partir desse estudo, foi possível
837 observar uma relação entre cepas isoladas de hortaliças, gado, galinhas e diferentes
838 ambientes. A diversidade de fontes associadas ao ST48 sugere que este grupo bacteriano
839 está amplamente disseminado e não se limita a uma origem específica. A presença de
840 genes de resistência em bactérias desse ST, combinada com sua ampla distribuição em
841 diferentes países e fontes, evidencia seu risco zoonótico. Esse problema se agrava ainda

842 mais quando esses microrganismos estão presentes em alimentos consumidos crus, como
843 hortaliças, o que pode facilitar na sua disseminação.

844 A virulência é definida como a capacidade de um organismo causar doença em
845 um hospedeiro específico. Em *E. coli*, a virulência resulta do impacto cumulativo de
846 diversos fatores de virulência, que diferenciam os potenciais patógenos entre as cepas
847 (JOHNSON, 1991b). Métodos moleculares permitem identificar DEC e ExPEC com base
848 nesses fatores de virulência. Na análise dos genes para os patotipos, observa-se que a
849 maioria dos genes encontrados foi relacionada a ExPEC, enquanto apenas um gene foi
850 identificado para DEC. No entanto, mesmo com a presença desses genes, não é possível
851 afirmar de forma definitiva que essas cepas pertencem a esses patotipos, sendo necessário
852 encontrar outros genes comumente encontrados em ExPEC. Apesar disso, é possível
853 obter indícios dos grupos aos quais essas cepas podem estar associadas.

854 A análise filogenética revelou que algumas cepas demonstraram maior
855 similaridade com determinados patotipos, mesmo na ausência de genes específicos
856 relacionados a eles, sugerindo a possibilidade da existência de outros fatores presentes no
857 genoma dessas bactérias que possam estar associados a esses grupos. Dessa forma, a
858 análise do genoma permite apenas levantar hipóteses sobre os patotipos quando os genes
859 específicos relacionados a eles não estão presentes. Portanto, a avaliação da presença dos
860 genes relacionados é fundamental, considerando que os grupos dessas bactérias estão
861 envolvidos em diversas infecções em humanos e outros animais (SMITH; FRATAMICO;
862 GUNTHER, 2007). A falta de estudos voltados à identificação desses patotipos em
863 hortaliças dificultam definir sua prevalência, isso evidencia a necessidade de mais
864 pesquisas com foco nos fatores de virulência nesses alimentos.

865

866 7. Conclusão

867 Em nosso estudo, identificamos pela primeira vez no Brasil a presença de *E. coli*
868 resistentes à polimixina em hortaliças, com genes plasmidiais e cromossomais. Este
869 achado ressalta o risco potencial representado por esses patógenos nesses alimentos e
870 reforça a necessidade de seu monitoramento. Além disso, todas as cepas analisadas
871 apresentaram o gene AmpC em conjunto com a resistência à polimixina, o que pode
872 diminuir as opções de tratamento de infecções causadas por essas bactérias. Foi detectada
873 a presença de dois plasmídeos móveis carregando o gene *mcr-1*. A capacidade de
874 conjugação desses plasmídeos foi avaliada e comprovada fenotipicamente, destacando o
875 potencial de disseminação desse gene. A análise do genoma revelou que as cepas
876 pertencem ao ST48, apresentando relação com diferentes fontes, o que evidencia o risco
877 zoonótico relacionado com essas bactérias. Esses resultados enfatizam a necessidade do
878 monitoramento desses alimentos e mostram a necessidade de estudos para avaliar a fonte
879 da contaminação em hortaliças.
880

881 **8. Referências**

- 882 ALIKHAN, N.-F. et al. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome
883 comparisons. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 402, 8 ago. 2011.
- 884 ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215,
885 n. 3, p. 403–410, 1990.
- 886 ANDRADE, F. F. et al. Colistin update on its mechanism of action and resistance, present and
887 future challenges. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1716, 2020.
- 888 ANYANWU, M. U.; JAJA, I. F.; NWOBI, O. C. Occurrence and characteristics of mobile colistin
889 resistance (mcr) gene-containing isolates from the environment: a review. **International journal
890 of environmental research and public health**, v. 17, n. 3, p. 1028, 2020.
- 891 ARORA, N.; THANGAVELU, K.; KARANIKOLOS, G. N. Bimetallic nanoparticles for
892 antimicrobial applications. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 412, 2020.
- 893 AUTHORITY. **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses,
894 zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017 - - 2018 - EFSA Journal - Wiley Online
895 Library.** Disponível em:
896 <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2018.5500>>. Acesso em: 18 jun.
897 2024.
- 898 AYOUB MOUBARECK, C. Polymyxins and Bacterial Membranes: A Review of Antibacterial
899 Activity and Mechanisms of Resistance. **Membranes**, v. 10, n. 8, p. 181, ago. 2020.
- 900 BALALI, G. I. et al. Microbial Contamination, an Increasing Threat to the Consumption of Fresh
901 Fruits and Vegetables in Today's World. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1–
902 13, 22 maio 2020.
- 903 BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to
904 Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, maio 2012.
- 905 BARLAAM, A. et al. Global emergence of colistin-resistant *Escherichia coli* in food chains and
906 associated food safety implications: a review. **Journal of food protection**, v. 82, n. 8, p. 1440–
907 1448, 2019.
- 908 BASTIDAS-CALDES, C. et al. Worldwide prevalence of mcr-mediated colistin-resistance
909 *Escherichia coli* in isolates of clinical samples, healthy humans, and livestock—a systematic
910 review and meta-analysis. **Pathogens**, v. 11, n. 6, p. 659, 2022.
- 911 BASTIDAS-CALDES, C. et al. **Co-harboring of beta-lactamases and mcr-1 genes in
912 Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from healthy carriers and backyard animals in
913 rural communities in Ecuador. Antibiotics (Basel). 2023; 12 (5): 856.** , 2023. Disponível em:
914 <<https://www.academia.edu/download/104627832/pdf.pdf>>. Acesso em: 28 nov. 2024
- 915 BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.
916 **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4_ts, p. 493–496, 1966.
- 917 BERGER, C. N. et al. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human
918 pathogens. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 2385–2397, set. 2010.
- 919 BESSONOV, K. et al. ECTyper: in silico *Escherichia coli* serotype and species prediction from
920 raw and assembled whole-genome sequence data. **Microbial Genomics**, v. 7, n. 12, 24 dez. 2021.

- 921 BETHKE, J. H. et al. Environmental and genetic determinants of plasmid mobility in pathogenic
922 *Escherichia coli*. **Science Advances**, v. 6, n. 4, p. eaax3173, 24 jan. 2020.
- 923 BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina
924 sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- 925 BRAUER, A. et al. Plasmid with Colistin Resistance Gene *mcr-1* in Extended-Spectrum- β -
926 Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Pig Slurry in Estonia. **Antimicrobial
927 Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6933–6936, nov. 2016.
- 928 BRAZ, V. S.; MELCHIOR, K.; MOREIRA, C. G. *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic
929 and Versatile Bacterium. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 548492,
930 21 dez. 2020.
- 931 BROUWER, M. et al. Mobile colistin resistance gene *mcr-1* is detected on an Inc11 plasmid in *E.*
932 *coli* from meat. 2020.
- 933 BUTKEVICIUTE, E. et al. Global diarrhoea-associated mortality estimates and models in
934 children: Recommendations for dataset and study selection. **Vaccine**, v. 39, n. 32, p. 4391–4398,
935 22 jul. 2021.
- 936 CARATTOLI, A. et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and
937 plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p.
938 3895–3903, jul. 2014.
- 939 CDC. **CDC and Food Safety**. Disponível em: <[https://www.cdc.gov/food-safety/about/what-
940 cdc-is-doing.html](https://www.cdc.gov/food-safety/about/what-cdc-is-doing.html)>. Acesso em: 11 jun. 2024.
- 941 CHAUDHARI, N. M.; GUPTA, V. K.; DUTTA, C. BPGA-an ultra-fast pan-genome analysis
942 pipeline. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 24373, 2016.
- 943 CLEMENTE, L. et al. Prevalence and characterization of ESBL/AmpC producing *Escherichia*
944 *coli* from fresh meat in Portugal. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1333, 2021.
- 945 **CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE**. Disponível em:
946 <<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>>. Acesso em: 26 fev. 2025.
- 947 CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*.
948 **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.
- 949 DOUMITH, M. et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance
950 in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales.
951 **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2300–2305, 2016.
- 952 ELIAS, W. P.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). Em:
953 TORRES, A. G. (Ed.). **Escherichia coli in the Americas**. Cham: Springer International
954 Publishing, 2016. p. 27–57.
- 955 ELLIOTT, S. J. et al. The Locus of Enterocyte Effacement (LEE)-Encoded Regulator Controls
956 Expression of Both LEE- and Non-LEE-Encoded Virulence Factors in Enteropathogenic and
957 Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 11, p. 6115–6126, nov.
958 2000.
- 959 ELSHAFIEE, E. A. et al. Extended-spectrum-beta-lactamases and carbapenemase-producing
960 *Klebsiella pneumoniae* isolated from fresh produce farms in different governorates of Egypt.
961 **Veterinary World**, v. 15, n. 5, p. 1191, 2022.

- 962 EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE
963 PREVENTION AND CONTROL (EFSA AND ECDC). The European Union One Health 2018
964 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, v. 17, n. 12, dez. 2019.
- 965 FACCONI, D. et al. Multidrug-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and *blaCTX-M* genes
966 isolated from swine in Argentina. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 18, p. 160–162,
967 2019.
- 968 FAKHOURI, F. et al. Haemolytic uraemic syndrome. **The Lancet**, v. 390, n. 10095, p. 681–696,
969 12 ago. 2017.
- 970 FALAGAS, M. E. et al. Fosfomycin. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 321–347,
971 abr. 2016.
- 972 FAO, F. **Promoting fruit and vegetable consumption**. [s.l.] FAO, 2021.
- 973 FERNANDES, M. R. et al. First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying
974 the *mcr-I* Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a Human
975 Infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6415–6417, out.
976 2016.
- 977 FLEISCHMANN, R. D. et al. Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of
978 *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 496–512, 28 jul. 1995.
- 979 FUSSY, A.; PAPENBROCK, J. An overview of soil and soilless cultivation techniques—chances,
980 challenges and the neglected question of sustainability. **Plants**, v. 11, n. 9, p. 1153, 2022.
- 981 GAMA, J. A. et al. Dominance Between Plasmids Determines the Extent of Biofilm Formation.
982 **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 26 ago. 2020.
- 983 GEURTSSEN, J. et al. Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. **FEMS**
984 **Microbiology Reviews**, v. 46, n. 6, p. fuac031, 1 nov. 2022.
- 985 GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.
986 47, n. Suppl 1, p. 3–30, 5 nov. 2016.
- 987 GÓMEZ-ALDAPA, C. A. et al. Presence of Multidrug-Resistant Shiga Toxin-Producing
988 *Escherichia coli*, Enteropathogenic *E. coli* and Enterotoxigenic *E. coli*, on Raw Nopalitos
989 (*Opuntia ficus-indica* L.) and in Nopalitos Salads from Local Retail Markets in Mexico.
990 **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 5, p. 269–274, maio 2016.
- 991 GONZÁLEZ, J. et al. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from
992 vegetables in Argentina. **International journal of food microbiology**, v. 261, p. 57–61, 2017.
- 993 GORMAN, R.; BLOOMFIELD, S.; ADLEY, C. C. A study of cross-contamination of food-borne
994 pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. **International journal of food**
995 **microbiology**, v. 76, n. 1–2, p. 143–150, 2002.
- 996 GOVINDARAJAN, D. K. et al. Adherence patterns of *Escherichia coli* in the intestine and its
997 role in pathogenesis. **Medicine in Microecology**, v. 5, p. 100025, 1 set. 2020.
- 998 HEATON, J. C.; JONES, K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour
999 of enteropathogens in the phyllosphere: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n.
1000 3, p. 613–626, mar. 2008.

- 1001 HERNANDES, R. T. et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS**
1002 **Microbiology Letters**, v. 297, n. 2, p. 137–149, 1 ago. 2009.
- 1003 HÖLZEL, C. S.; TETENS, J. L.; SCHWAIGER, K. Unraveling the Role of Vegetables in
1004 Spreading Antimicrobial-Resistant Bacteria: A Need for Quantitative Risk Assessment.
1005 **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 11, p. 671–688, nov. 2018.
- 1006 HUSSAIN, H. I. et al. Virulence and transcriptome profile of multidrug-resistant *Escherichia coli*
1007 from chicken. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 8335, 2017.
- 1008 IULIETTO, M. F.; EVERS, E. G. Cross-contamination in the kitchen: A model for quantitative
1009 microbiological risk assessment. **Risk Analysis**, v. 44, n. 5, p. 1156–1175, maio 2024.
- 1010 J, S. et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from raw
1011 vegetables in South Korea. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 11 dez. 2020.
- 1012 JIA, B. et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic
1013 resistance database. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D566–D573, 4 jan. 2017.
- 1014 JIAN, Z. et al. Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. **Journal**
1015 **of Basic Microbiology**, v. 61, n. 12, p. 1049–1070, dez. 2021.
- 1016 JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical**
1017 **Microbiology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 80–128, jan. 1991a.
- 1018 JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical**
1019 **Microbiology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 80–128, jan. 1991b.
- 1020 JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular Epidemiology of Extraintestinal Pathogenic
1021 *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, p. 10.1128/ecosalplus.ESP-0004–2017, 31 dez. 2018.
- 1022 JOLLEY, K. A.; BRAY, J. E.; MAIDEN, M. C. J. Open-access bacterial population genomics:
1023 BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. **Wellcome Open Research**,
1024 v. 3, p. 124, 2018.
- 1025 JONES-DIAS, D. et al. Architecture of class 1, 2, and 3 integrons from gram negative bacteria
1026 recovered among fruits and vegetables. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1400, 2016.
- 1027 JOSEPH, A. et al. Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review.
1028 **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 67, 21 jan. 2020.
- 1029 KANNAN, M. et al. Hydroponic farming—A state of art for the future agriculture. **Materials**
1030 **today: proceedings**, v. 68, p. 2163–2166, 2022.
- 1031 KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews**
1032 **microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.
- 1033 KARIM, M. R. et al. Antimicrobial resistance profiles and co-existence of multiple antimicrobial
1034 resistance genes in mcr-Harboured Colistin-resistant Enterobacteriaceae isolates recovered from
1035 poultry and poultry meats in Malaysia. **Antibiotics**, v. 12, n. 6, p. 1060, 2023.
- 1036 KHALIL, I. A. et al. Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic *Escherichia coli*
1037 diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990–2016. **The Lancet Infectious Diseases**, v.
1038 18, n. 11, p. 1229–1240, 1 nov. 2018.

- 1039 KIEFFER, N. et al. High rate of MCR-1-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*
1040 among pigs, Portugal. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 12, p. 2023, 2017.
- 1041 LAND, M. et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. **Functional &**
1042 **Integrative Genomics**, v. 15, n. 2, p. 141–161, mar. 2015.
- 1043 LAXMINARAYAN, R. et al. The Lancet Infectious Diseases Commission on antimicrobial
1044 resistance: 6 years later. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, p. e51–e60, 2020.
- 1045 LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic
1046 tree display and annotation tool. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. W1, p. W78–W82, 5 jul. 2024.
- 1047 LI, C.-A. et al. Whole-Genome Analysis of bla_{NDM}-Bearing *Proteus mirabilis* Isolates and mcr-
1048 1-Positive *Escherichia coli* Isolates Carrying bla_{NDM} from the Same Fresh Vegetables in China.
1049 **Foods**, v. 12, n. 3, p. 492, jan. 2023.
- 1050 LI, Q. et al. Colistin Resistance and Molecular Characterization of the Genomes of mcr-1-Positive
1051 *Escherichia coli* Clinical Isolates. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p.
1052 854534, 2022a.
- 1053 LI, W. et al. Conjugative transfer of mcr-1-bearing plasmid from *Salmonella* to *Escherichia coli*
1054 in vitro on chicken meat and in mouse gut. **Food Research International**, v. 157, p. 111263,
1055 2022b.
- 1056 LIU, B. et al. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. **Nucleic**
1057 **acids research**, v. 50, n. D1, p. D912–D917, 2022.
- 1058 LIU, B.-T.; SONG, F.-J. Emergence of two *Escherichia coli* strains co-harboring mcr-1 and bla_{NDM}
1059 in fresh vegetables from China. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 12, p. 2627–2635,
1060 ago. 2019.
- 1061 LIU, D. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*. Em: TANG, Y.-W. et al. (Eds.). **Molecular Medical**
1062 **Microbiology (Second Edition)**. Boston: Academic Press, 2015. p. 1133–1146.
- 1063 LIU, H. et al. A novel mcr-1 variant carried by an IncI2-type plasmid identified from a multidrug
1064 resistant enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 815, 2018.
- 1065 LIU, J.-H. et al. Plasmid-mediated colistin-resistance genes: mcr. **Trends in Microbiology**, 2023.
- 1066 LIU, Y.-Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in
1067 animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The**
1068 **Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 2016.
- 1069 LIU, Z. et al. Identification and characterization of the first *Escherichia coli* strain carrying NDM-
1070 1 gene in China. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e66666, 2013.
- 1071 LIU, Z. et al. Plasmid-Mediated Novel bla_{NDM-17} Gene Encoding a Carbapenemase with Enhanced
1072 Activity in a Sequence Type 48 *Escherichia coli* Strain. **Antimicrobial Agents and**
1073 **Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. e02233-16, maio 2017.
- 1074 LOMAN, N. J.; PALLAN, M. J. Twenty years of bacterial genome sequencing. **Nature Reviews**
1075 **Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 787–794, 2015.
- 1076 LUNA-GUEVARA, J. J. et al. The Role of Pathogenic *E. coli* in Fresh Vegetables: Behavior,
1077 Contamination Factors, and Preventive Measures. **International Journal of Microbiology**, v.
1078 2019, n. 1, p. 2894328, 2019.

- 1079 LUPO, A. et al. Emergence of bla CTX-M-55 associated with fosA, rmtB and mcr gene variants
1080 in Escherichia coli from various animal species in France. **Journal of Antimicrobial**
1081 **Chemotherapy**, v. 73, n. 4, p. 867–872, 2018.
- 1082 MACARISIN, D.; PATEL, J.; SHARMA, V. K. Role of curli and plant cultivation conditions on
1083 Escherichia coli O157: H7 internalization into spinach grown on hydroponics and in soil.
1084 **International journal of food microbiology**, v. 173, p. 48–53, 2014.
- 1085 MACHADO-MOREIRA, B. et al. Microbial Contamination of Fresh Produce: What, Where, and
1086 How? **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 6, p. 1727–1750,
1087 nov. 2019.
- 1088 MADEC, J.-Y. et al. Sequence Type 48 Escherichia coli Carrying the bla_{CTX-M-1} IncII/ST3
1089 Plasmid in Drinking Water in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10,
1090 p. 6430–6432, out. 2016.
- 1091 MADHAVAN, T. P. V.; SAKELLARIS, H. Colonization factors of enterotoxigenic Escherichia
1092 coli. **Advances in Applied Microbiology**, v. 90, p. 155–197, 2015.
- 1093 MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant
1094 bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance.
1095 **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.
- 1096 MAIDEN, M. C. J. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. **Annual Review of Microbiology**,
1097 v. 60, n. 1, p. 561–588, 1 out. 2006.
- 1098 MAJUMDER, M. A. A. et al. Antimicrobial Stewardship: Fighting Antimicrobial Resistance and
1099 Protecting Global Public Health. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 4713–4738, 29 dez.
1100 2020.
- 1101 MANAGEIRO, V. et al. Plasmid-Mediated Colistin Resistance (mcr-1) in Escherichia coli from
1102 Non-Imported Fresh Vegetables for Human Consumption in Portugal. **Microorganisms**, v. 8, n.
1103 3, p. 429, mar. 2020.
- 1104 MARE, A. D. et al. Enteropathogenic Escherichia coli—A Summary of the Literature.
1105 **Gastroenterology Insights**, v. 12, n. 1, p. 28–40, mar. 2021.
- 1106 MARSHALL, K. E. Investigations of possible multistate outbreaks of Salmonella, Shiga toxin–
1107 producing Escherichia coli, and Listeria monocytogenes infections—United States, 2016.
1108 **MMWR. Surveillance Summaries**, v. 69, 2020.
- 1109 MATAMOROS, S. et al. Global phylogenetic analysis of Escherichia coli and plasmids carrying
1110 the mcr-1 gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. **Scientific reports**, v. 7, n. 1,
1111 p. 15364, 2017.
- 1112 MENGISTU, D. Y.; MENGESHA, Y. New approaches for severity intervention and rapid
1113 diagnosis of enterohemorrhagic Escherichia coli: a review. **All Life**, v. 16, n. 1, p. 2218582, 31
1114 dez. 2023.
- 1115 MENTZER, A. VON; SVENNERHOLM, A.-M. Colonization factors of human and animal-
1116 specific enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). **Trends in Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 448–
1117 464, 1 maio 2024.
- 1118 MEZA-SEGURA, M. et al. New insights into DAEC and EAEC pathogenesis and phylogeny.
1119 **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 572951, 2020.

- 1120 MEZA-SEGURA, M.; ESTRADA-GARCIA, T. Diffusely Adherent *Escherichia coli*. Em:
 1121 TORRES, A. G. (Ed.). **Escherichia coli in the Americas**. Cham: Springer International
 1122 Publishing, 2016. p. 125–147.
- 1123 MIKHAYEL, M. et al. Occurrence of the Colistin Resistance Gene *mcr-1* and Additional
 1124 Antibiotic Resistance Genes in ESBL/AmpC-Producing *Escherichia coli* from Poultry in
 1125 Lebanon: A Nationwide Survey. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 2, p. e00025-21, 31 out. 2021.
- 1126 MILLER, S. A.; FERREIRA, J. P.; LEJEUNE, J. T. Antimicrobial use and resistance in plant
 1127 agriculture: a one health perspective. **Agriculture**, v. 12, n. 2, p. 289, 2022.
- 1128 MIRHOSEINI, A.; AMANI, J.; NAZARIAN, S. Review on pathogenicity mechanism of
 1129 enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, p. 162–
 1130 169, abr. 2018.
- 1131 MOHAPATRA, S. S.; DWIBEDY, S. K.; PADHY, I. Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode
 1132 of action, resistance emergence, and potential solutions. **Journal of Biosciences**, v. 46, n. 3, p.
 1133 85, 26 ago. 2021.
- 1134 MOSTAFIDI, M. et al. A review of recent trends in the development of the microbial safety of
 1135 fruits and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**, v. 103, p. 321–332, 1 set. 2020.
- 1136 MYLIUS, S. D.; NAUTA, M. J.; HAVELAAR, A. H. Cross-Contamination During Food
 1137 Preparation: A Mechanistic Model Applied to Chicken-Borne *Campylobacter*. **Risk Analysis**, v.
 1138 27, n. 4, p. 803–813, ago. 2007.
- 1139 NANG, S. C. et al. Rescuing the last-line polymyxins: achievements and challenges.
 1140 **Pharmacological reviews**, v. 73, n. 2, p. 679–728, 2021.
- 1141 NANG, S. C.; LI, J.; VELKOV, T. The rise and spread of *mcr* plasmid-mediated polymyxin
 1142 resistance. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 131–161, 4 mar. 2019.
- 1143 NATARO, J. P. et al. Heterogeneity of Enteroaggregative *Escherichia Coli* Virulence
 1144 Demonstrated. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 2, p. 465–468, 1 fev. 1995.
- 1145 NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Current Opinion in**
 1146 **Gastroenterology**, v. 21, n. 1, p. 4, jan. 2005.
- 1147 NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. v. 11, 1998.
- 1148 NGUYEN, Y.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. **Frontiers in**
 1149 **cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 90, 2012.
- 1150 OH, S.-S. et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli*
 1151 isolates from fresh vegetables and healthy food animals in South Korea. **International Journal**
 1152 **of Infectious Diseases**, v. 92, p. 53–55, 2020.
- 1153 OKHUYSEN, P. C.; DUPONT, H. L. **Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of**
 1154 **acute and persistent diarrhea of worldwide importance**. **The Journal of infectious**
 1155 **diseases** The University of Chicago Press, , 2010. Disponível em:
 1156 <<https://academic.oup.com/jid/article-abstract/202/4/503/2192058>>. Acesso em: 24 jun. 2024
- 1157 ORTEGA-PAREDES, D. et al. *Escherichia coli* hyperepidemic clone ST410-A harboring
 1158 *bla*CTX-M-15 isolated from fresh vegetables in a municipal market in Quito-Ecuador.
 1159 **International Journal of Food Microbiology**, v. 280, p. 41–45, 2 set. 2018.

- 1160 OTEO, J. et al. Colonization with Enterobacteriaceae-Producing ESBLs, AmpCs, and OXA-48
1161 in Wild Avian Species, Spain 2015–2016. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 7, p. 932–938,
1162 set. 2018.
- 1163 PADHY, I.; DWIBEDY, S. K.; MOHAPATRA, S. S. A molecular overview of the polymyxin-
1164 LPS interaction in the context of its mode of action and resistance development. **Microbiological
1165 Research**, v. 283, p. 127679, 1 jun. 2024.
- 1166 PAKBIN, B.; BRÜCK, W. M.; ROSSEN, J. W. A. Virulence Factors of Enteric Pathogenic
1167 *Escherichia coli*: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 9922,
1168 14 set. 2021.
- 1169 PALMEIRA, J. D. et al. Draft genome of a ST443 mcr-1-and blaCTX-M-2-carrying *Escherichia*
1170 *coli* from cattle in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, p. 269–270, 2018.
- 1171 PANERI, M.; SEVTA, P. Overview of antimicrobial resistance: an emerging silent pandemic.
1172 **Global Journal of Medical, Pharmaceutical, and Biomedical Update**, v. 18, 2023.
- 1173 PASQUA, M. et al. The Intriguing Evolutionary Journey of Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward
1174 Pathogenicity. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 5 dez. 2017.
- 1175 PEARSON, J. S. et al. The genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. **Annual
1176 review of genetics**, v. 50, p. 493–513, 2016.
- 1177 PÉREZ-LOSADA, M. et al. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of
1178 molecular epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 16, p. 38–53, 2013.
- 1179 POIREL, L. et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n.
1180 4, p. 6.4.14, 27 jul. 2018.
- 1181 PRIYANKA et al. Leafy greens as a potential source of multidrug-resistant diarrhoeagenic
1182 *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Microbiology**, v. 167, n. 6, 1 jun. 2021.
- 1183 PRIYANKA, P. et al. Urinary tract infection and sepsis causing potential of multidrug-resistant
1184 Extraintestinal pathogenic *E. coli* isolated from plant-origin foods. **International Journal of
1185 Food Microbiology**, v. 386, p. 110048, 2 fev. 2023.
- 1186 RAHMAN, M. et al. Contamination of fresh produce with antibiotic-resistant bacteria and
1187 associated risks to human health: A scoping review. **International journal of environmental
1188 research and public health**, v. 19, n. 1, p. 360, 2021.
- 1189 RAMADAN, H. et al. Emergence of multidrug-resistant *Escherichia coli* producing CTX-M,
1190 MCR-1, and FosA in retail food from Egypt. **Frontiers in cellular and infection microbiology**,
1191 v. 11, p. 681588, 2021.
- 1192 RÖDEROVA, M. et al. Characteristics of quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from
1193 humans, animals, and the environment in the Czech Republic. **Frontiers in Microbiology**, v. 7,
1194 p. 2147, 2017.
- 1195 ROZWANDOWICZ, M. et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in
1196 Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 5, p. 1121–1137, 2018.
- 1197 SAROWSKA, J. et al. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal
1198 pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. **Gut Pathogens**, v. 11,
1199 n. 1, p. 10, 21 fev. 2019.

- 1200 SATO, T. et al. Contribution of Novel Amino Acid Alterations in PmrA or PmrB to Colistin
1201 Resistance in mcr-Negative Escherichia coli Clinical Isolates, Including Major Multidrug-
1202 Resistant Lineages O25b:H4-ST131-H30Rx and Non-x. **Antimicrobial Agents and**
1203 **Chemotherapy**, v. 62, n. 9, p. 10.1128/aac.00864-18, 27 ago. 2018.
- 1204 SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics (Oxford,**
1205 **England)**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 15 jul. 2014.
- 1206 SERVIN, A. L. Pathogenesis of Human Diffusely Adhering Escherichia coli Expressing Afa/Dr
1207 Adhesins (Afa/Dr DAEC): Current Insights and Future Challenges. **Clinical Microbiology**
1208 **Reviews**, v. 27, n. 4, p. 823–869, out. 2014.
- 1209 SHAW, A. et al. Growth of Escherichia coli O157: H7, non-O157 Shiga toxin-producing
1210 Escherichia coli, and Salmonella in water and hydroponic fertilizer solutions. **Journal of food**
1211 **protection**, v. 79, n. 12, p. 2179–2183, 2016.
- 1212 SHPIGEL, N. Y.; ELAZAR, S.; ROSENSHINE, I. Mammary pathogenic *Escherichia coli*.
1213 **Current Opinion in Microbiology**, Host–Microbe Interactions: Bacteria. v. 11, n. 1, p. 60–65, 1
1214 fev. 2008.
- 1215 SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia*
1216 *coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 134–163, jun. 2007.
- 1217 SORA, V. M. et al. Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli: Virulence Factors and Antibiotic
1218 Resistance. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1355, nov. 2021.
- 1219 SUN, J. et al. Genetic analysis of the IncX4 plasmids: implications for a unique pattern in the
1220 mcr-1 acquisition. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 424, 2017.
- 1221 SUN, J. et al. Antibiotic susceptibility and genomic analysis of ciprofloxacin-resistant and
1222 ESBLs-producing Escherichia coli in vegetables and their irrigation water and growing soil.
1223 **International Journal of Food Microbiology**, v. 414, p. 110629, 2024.
- 1224 TEIXEIRA, N. B. et al. Genetic analysis of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) adherence
1225 factor (EAF) plasmid reveals a new deletion within the EAF probe sequence among O119 typical
1226 EPEC strains. **BMC Microbiology**, v. 15, p. 200, 5 out. 2015.
- 1227 TOBE, T. et al. Complete DNA Sequence and Structural Analysis of the Enteropathogenic
1228 Escherichia coli Adherence Factor Plasmid. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5455–5462,
1229 out. 1999.
- 1230 TRIMBLE, M. J. et al. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. **Cold**
1231 **Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 10, p. a025288, 10 jan. 2016.
- 1232 UYTTENDAELE, M. et al. Microbial Hazards in Irrigation Water: Standards, Norms, and Testing
1233 to Manage Use of Water in Fresh Produce Primary Production. **Comprehensive Reviews in Food**
1234 **Science and Food Safety**, v. 14, n. 4, p. 336–356, 2015.
- 1235 VAN DEN BELD, M. J. C. et al. A Multifactorial Approach for Surveillance of Shigella spp. and
1236 Entero-Invasive Escherichia coli Is Important for Detecting (Inter)national Clusters. **Frontiers in**
1237 **Microbiology**, v. 11, 19 out. 2020.
- 1238 VERRAES, C. et al. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. **International**
1239 **Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 7, p. 2643–2669, jul. 2013.

- 1240 VIPIN MADHAVAN, T. P.; SAKELLARIS, H. Colonization Factors of Enterotoxigenic
1241 Escherichia coli. Em: **Advances in Applied Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2015. v. 90p. 155–197.
- 1242 VOJKOVSKÁ, H. et al. Occurrence and characterization of food-borne pathogens isolated from
1243 fruit, vegetables and sprouts retailed in the Czech Republic. **Food Microbiology**, v. 63, p. 147–
1244 152, 1 maio 2017.
- 1245 WANG, Q. et al. The prevalent dynamic and genetic characterization of mcr-1 encoding multi-
1246 drug resistant Escherichia coli strains recovered from poultry in Hebei, China. **Journal of Global
1247 Antimicrobial Resistance**, 2024a.
- 1248 WANG, Y. et al. Coexistence of blaKPC-2–IncN and mcr-1–IncX4 plasmids in a ST48
1249 Escherichia coli strain in China. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 23, p. 149–153,
1250 2020.
- 1251 WANG, Y. et al. Animal waste antibiotic residues and resistance genes: A review. **Open
1252 Agriculture**, v. 7, n. 1, p. 688–710, 1 jan. 2022.
- 1253 WANG, Z. et al. Identification and Genomic Analyses of a Multidrug Resistant Avian Pathogenic
1254 Escherichia coli Coharboring mcr-1, blaTEM-176 and blaCTX-M-14 Genes. **Transboundary
1255 and Emerging Diseases**, v. 2024, p. 1–9, 16 fev. 2024b.
- 1256 WELINDER-OLSSON, C.; KAIJSER, B. Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC).
1257 **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 37, n. 6–7, p. 405–416, 1 jan. 2005.
- 1258 WHO, G. **WHO preferred product characteristics for vaccines against enterotoxigenic
1259 Escherichia coli (ETEC)**. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-
1260 SA 3.0 IGO. 1st ed ed. Geneva: World Health Organization, 2021.
- 1261 WILLIS, C. et al. Occurrence of Listeria and Escherichia coli in frozen fruit and vegetables
1262 collected from retail and catering premises in England 2018–2019. **International Journal of
1263 Food Microbiology**, v. 334, p. 108849, 2020.
- 1264 WONG, M. H. Y.; WAN, H. Y.; CHEN, S. Characterization of Multidrug-Resistant *Proteus
1265 mirabilis* Isolated from Chicken Carcasses. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p.
1266 177–181, fev. 2013.
- 1267 ZANKARI, E. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **The Journal of
1268 Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2640–2644, nov. 2012.
- 1269 ZHANG, P. et al. Characterization of Five Escherichia coli Isolates Co-expressing ESBL and
1270 MCR-1 Resistance Mechanisms From Different Origins in China. **Frontiers in Microbiology**, v.
1271 10, 29 ago. 2019.
- 1272 ZHANG, Y. et al. Enterotoxigenic Escherichia coli: intestinal pathogenesis mechanisms and
1273 colonization resistance by gut microbiota. **Gut Microbes**, v. 14, n. 1, p. 2055943, 2022.
- 1274 ZHOU, Z. et al. The EnteroBase user’s guide, with case studies on Salmonella transmissions,
1275 Yersinia pestis phylogeny, and Escherichia core genomic diversity. **Genome Research**, v. 30, n.
1276 1, p. 138–152, jan. 2020.
- 1277
- 1278
- 1279

1280

APÊNDICES

1281

Qualidade da água: um enfoque na avaliação microbiológica e físico-química para a
saúde pública

1282

1283

1284

1285

ANEXOS

1286

1287 Clonal relationship, virulence genes, and antimicrobial resistance of *Morganella*
1288 *morganii* isolated from community-acquired infections and hospitalized patients: a
1289 neglected opportunistic pathogen

1290

1291 Water quality monitoring in southern Brazil and the assessment of risk factors related to
1292 contamination by coliforms and *Escherichia coli*

1293

1294 Genomic insights into a *Proteus mirabilis* strain inducing avian cellulitis

1295

1296 Impact of COVID-19 pandemic on antimicrobial resistance of *Proteus mirabilis* in a
1297 Brazilian hospital

1298

1299 Os gêneros proteus, morganella e providencia: importância e implicações das infecções
1300 bacterianas em humanos e animais

1301