



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ARIANE TIEMY TIZURA

**CARACTERIZAÇÃO DE *E. COLI* ISOLADAS DA
MICROBIOTA INTESTINAL DE VEGETARIANOS, VEGANOS
E ONÍVOROS E DE INFECÇÕES COMUNITÁRIAS DO
TRATO URINÁRIO**

Londrina
2021

ARIANE TIEMY TIZURA

**CARACTERIZAÇÃO DE *E. COLI*/ISOLADAS DA
MICROBIOTA INTESTINAL DE VEGETARIANOS, VEGANOS
E ONÍVOROS E DE INFECÇÕES COMUNITÁRIAS DO
TRATO URINÁRIO**

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

Orientador: Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero

Londrina
2021

ARIANE TIEMY TIZURA

**CARACTERIZAÇÃO DE *E. COLI* ISOLADAS DA
MICROBIOTA INTESTINAL DE VEGETARIANOS, VEGANOS
E ONÍVOROS E DE INFECÇÕES COMUNITÁRIAS DO
TRATO URINÁRIO**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Marcia Regina Eches Perugini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dra. Renata Katsuko T. Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 16 de julho de 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram comigo nessa caminhada. Desde os que me viram quase que diariamente até os que estiveram ao meu lado mesmo há quilômetros de distância.

À minha orientadora, professora Dra. Eliana Carolina Vespero, que esteve comigo desde a graduação e sempre me ensinou, motivou e inspirou de todas as formas possíveis.

Aos amigos de laboratório que tornaram os dias mais leves. Em especial à Vanessa Lumi Koga que nos ensinou muito e compartilhou conosco os mais diversos sentimentos e ao João Gabriel Material Soncini, que foi meu braço direito e meu ombro sem nunca ter hesitado. Meu companheiro de laboratório e amigo para toda a vida.

Aos funcionários e professores da Microbiologia e da Biologia Molecular, em especial às professoras Márcia Regina Eches Perugini, Marsilene Pelisson e Renata Katsuko Kobayashi que sempre foram e sempre serão grandes exemplos de profissionais e seres humanos, com quem eu tive o grato prazer de conviver desde a minha graduação.

Aos meus pais e à minha avó, que foram minha certeza nos momentos de indecisão e nunca deixaram de sonhar meus sonhos e de acreditar em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava.

Por fim, mas sempre em primeiro lugar, a Deus, por guiar meus passos, me ouvir e me mostrar sempre o único caminho a ser seguido.

“Para ser grande, sê inteiro:
nada teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda

Brilha, porque alta vive.”

Fernando Pessoa

Tizura, Ariane Tiemy. **Caracterização de *E. coli* isoladas da microbiota intestinal de vegetarianos, veganos e onívoros e de infecções comunitárias do trato urinário.** 2021. 75 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Escherichia coli coloniza a microbiota intestinal sem causar danos ao hospedeiro, o que pode estar relacionado a diferentes hábitos alimentares. Entretanto, alguns tipos patogênicos, como ExPEC são capazes de gerar infecções, sendo o trato urinário (ITU) o principal sítio, podendo apresentar diferentes fatores de virulência e mecanismos de resistência. O objetivo do estudo foi analisar os hábitos alimentares e de vida dos participantes e *E. coli* de onívoros, vegetarianos e veganos e analisar os dados epidemiológicos e sociodemográficos de pacientes da comunidade com infecção do trato urinário por *E. coli*. Este estudo incluiu 60 isolados de *E. coli* de amostras fecais de onívoros, e 58 de vegetarianos/ veganos (41 vegetarianos e 17 veganos) e 22.810 isolados de urina de paciente da comunidade com ITU. Os genes dos fatores de virulência (VFs), ilhas de patogenicidade (PAIs), β -Lactamase de Espectro Estendido (ESBL) do tipo cefotaximase (CTX-M) e classificação filogenética (A, B1, B2, C, D, E e F) das 118 amostras de onívoros, vegetarianos e veganos, foram pesquisados por reações em cadeia da polimerase (PCR). As amostras de urina, foram analisadas quanto aos perfis de sensibilidade dos isolados de *E. coli* e sociodemográficos. Ambos os grupos de onívoros e vegetarianos/ veganos mostraram uma alta taxa de resistência à ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico e ácido nalidíxico e alguns foram ainda positivos para o teste ESBL (12% dos vegetarianos / veganos e 5% dos onívoros). Os genes de virulência mais predominantes entre os onívoros foram *fimH* (70%); *iutA* (32%); *fyuA* (32%) e *traT* (32%), enquanto entre vegetarianos / veganos, os genes de virulência mais predominantes foram *traT* (62%), *kpsMT k1* (28%) e *iutA* (22%). A maioria dos onívoros (55%) foi positiva para PAI I536, enquanto a maioria dos vegetarianos / veganos (59%) foi positiva para PAI IV₅₃₆. O grupo filogenético A, que caracteriza os isolados comensais não patogênicos que sobrevivem no sistema intestinal, foi o mais prevalente em ambos os grupos. Já as ITU ocorrem em ambos os sexos e em todas as faixas etárias, entretanto sua incidência foi maior em mulheres (91,9%) e aumentou com a faixa etária, sendo a média de idade entre os pacientes com amostras positivas para ESBL de 64 anos. A ocorrência de microrganismos resistentes inclusive comensais e o consequente agravo no desenvolvimento das infecções se deve principalmente ao aumento da exposição ao uso de antibióticos, uma vez que as enterobactérias produtoras de ESBL são frequentemente resistentes à maioria dos antibióticos orais utilizados no tratamento das ITU. Por isso, é necessário conhecer o perfil dos principais microrganismos e da população local, visando melhorar as diretrizes e criar medidas rigorosas no controle de antimicrobianos, a fim de uma utilização adequada desses medicamentos, como forma de conter e prevenir a disseminação dos mecanismos de resistência e as infecções causadas por esses microrganismos.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; ExPEC; infecções do trato urinário; fatores de virulência; ESBL.

Tizura, Ariane Tiemy. **Characterization of *E. coli* isolated from the gut microbiota of vegetarians, vegans and omnivorous and from community urinary tract infections.** 75 p. Dissertation (Masters in Clinical and Laboratory Physiopathology) - State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Escherichia coli colonizes the gut microbiota without causing damage to the host, which may be related to different eating habits. However, some pathogenic types, such as ExPEC are capable of generating diseases, such as urinary tract infections being the main among them. These strains may have different virulence factors and resistance mechanisms. The objective of the study is to analyze the lifestyle and food habits and the resistance and virulence factors in fecal samples of *E. coli* from omnivorous, vegetarians and vegans and to analyze the epidemiological and sociodemographic data of patients in the community with urinary tract infection. This study included 60 *E. coli* isolates from the fecal sample of omnivorous, 58 from vegetarians / vegans (41 vegetarians and 17 vegans) and 22.810 urine isolates from community patients with UTI. With the 118 samples of omnivorous, vegetarians and vegans, polymerase chain reactions (PCR) were performed for virulence factors (VFs), pathogenicity islands (PAIs), Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) of the cefotaximal type (CTX-M) and phylogenetic classification (A, B1, B2, C, D, E and F). With the urine samples, analyzes of the susceptibility profile of the isolates and sociodemographic of the patients were realized. Both groups of omnivorous and vegetarians/ vegans had a high rate of resistance to ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid and nalidixic acid and some of them were still positive for the ESBL test (12% of vegetarians / vegans and 5% of omnivorous). The most prevalent virulence genes among omnivorous were *fimH* (70%); *iutA* (32%); *fyuA* (32%) and *traT* (32%), while among vegetarians / vegans, the most prevalent virulence genes were *traT* (62%), *kpsMT k1* (28%) and *iutA* (22%). The majority of omnivorous (55%) were positive for PAI I536, while the majority of vegetarians / vegans (59%) were positive for PAI IV₅₃₆. Phylogenetic group A, a non-pathogenic commensal strain that survives in the intestinal system, was the most prevalent in both groups. UTIs occur in both genders and in all age groups, however their incidence was higher in women (91.9%) and increased with age, with an average age among patients with ESBL positive samples of 64 years old. The occurrence of resistant microorganisms including commensals and the consequent aggravation in the development of infections is mainly due to the increased exposure to the use of antibiotics, since ESBL-producing *Enterobacteria* are often resistant to most oral antibiotics used in the treatment of UTIs. Therefore, it is necessary to know the profile of the main microorganisms and the local population, in order to improve the guidelines and create rigorous measures in order to properly use these drugs as a way to contain and prevent the spread of resistance mechanisms and the infections caused by these microorganisms.

Keywords: *Escherichia coli*; ExPEC; urinary tract infections; virulence factors; ESBL.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGPs	Promotores de crescimento
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária
CNF	Fator citotóxico necrotizante
CAM	Complexo de Ataque a Membrana
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
ESBL	Extended-spectrum beta-lactamase
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
FV	Fator de Virulência
IPEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Intestinal
LPS	Lipopolissacarídeos
ITU	Infecção do Trato Urinário
NMEC	<i>Escherichia coli</i> associada à meningite neonatal
OMPs	Proteínas da Membrana Externa
PAI	Ilha de patogenicidade
PCR	Polymerase Chain Reaction
SEPEC	<i>Escherichia coli</i> causadora de sepse
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
TBE	Tris/Borato/EDTA
TGI	Trato gastrointestinal
TSB	Caldo de Soja e Trypticaseína
UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uropatogênica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	ESCHERICHIA COLI	9
1.2	INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO.....	10
1.3	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	11
1.3.1	Adesinas.....	11
1.3.2	Toxinas	13
1.3.3	Sistemas de Aquisição de Ferro.....	15
1.3.4	Cápsulas Polissacarídicas	17
1.3.5	Resistência Sérica.....	18
1.3.6	Invasinas	19
1.4	ILHAS DE PATOGENICIDADE.....	20
1.5	CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA	21
1.6	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	22
1.7	VEGETARIANISMO E VEGANISMO.....	23
1.8	ALIMENTAÇÃO E ANTIMICROBIANOS	23
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL.....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	AMOSTRAS	27
3.2	COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO INICIAL DAS AMOSTRAS	27
3.2.1	E. coli de fezes de Onívoros, Vegetarianos e Veganos.....	27
3.2.2	Isolamento de E. coli urinária	28
3.3	EXTRAÇÃO DO DNA	29
3.4	DETECÇÃO DE B-LACTAMASES.....	29
3.5	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	30
3.6	ILHAS DE PATOGENICIDADE.....	30
3.7	CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA	30
3.8	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	31
3.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	34

4	RESULTADOS	35
4.1	ARTIGO I - ESCHERICHIA COLI FROM THE INTESTINAL MICROBIOTA OF VEGANS, VEGETARIANS AND OMNIVOROUS: VIRULENCE FACTORS, ISLANDS OF PATHOGENICITY AND PHYLOGENETIC CLASSIFICATION	36
4.2	ARTIGO II - CHARACTERISTICS OF URINARY TRACT INFECTIONS CAUSED BY ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM COMMUNITY PATIENTS IN LONDRINA, PARANÁ, BRAZIL, FROM JUNE 2016 TO MAY 2019	52
5	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICES	71
	APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	71
	APÊNDICE B - Formulário vegetarianos/veganos X onívoros.....	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli é um Bacilo Gram-Negativo, anaeróbio facultativo, que faz parte da ordem Enterobacteriales, membro da família Enterobacteriaceae e compõe a microbiota intestinal de animais de sangue quente, sem causar danos ao hospedeiro. Entretanto, existem também alguns tipos patogênicos, capazes de causar doenças gastrointestinais e extraintestinais, como infecções do trato urinário (ITU), meningite e sepse. Sua transmissão ocorre principalmente via fecal-oral, através do consumo de alimentos derivados ou de origem animal (JANG et al., 2017).

Entre os patótipos de *E. coli* capazes de causar infecções intestinais, classificada como *E. coli* diarreiogênica (DEC) (KÖHLER; DOBRINDT, 2011), encontram-se *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC); *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), um tipo de STEC capaz de causar doenças entéricas graves; *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC). Essas cepas são classificadas por propriedades de virulência e mecanismos de patogenicidade que levam a doenças gastrointestinais, como diarreia (JANG et al., 2017).

As cepas capazes de causar doenças extraintestinais são chamadas de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) e inclui *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* causadora de sepse (SEPEC) (JANG et al., 2017). Esses grupos apesar de divididos de forma específica, também foram capazes de causar infecções em vários outros sítios anatômicos (DALE; WOODFORD, 2015).

Os fatores de virulência característicos foram definidos para esses patótipos individuais e desempenham um papel decisivo na patogênese, de forma a ser possível em alguns casos discriminar *E. coli* de patótipo diarreiogênico de ExPEC ou não patogênico. Além disso, cepas que causam infecção sistêmica em aves, *E. coli* patogênica aviária (APEC), assemelham-se a algumas variantes patogênicas humanas do tipo ExPEC (KÖHLER; DOBRINDT, 2011).

No atual cenário, onde vemos um rápido aumento da multirresistência e um arsenal de antimicrobianos cada vez menos eficazes contra as cepas resistentes, as

infecções extraintestinais por *E. coli* são um sério problema de saúde pública, associada a um significativo impacto também na economia mundial (DALE; WOODFORD, 2015).

1.2 INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO

As ITU estão entre as infecções bacterianas mais comuns que afetam seres humanos, sendo UPEC seu principal agente etiológico, presente em 75% a 95% de ITU em indivíduos saudáveis (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2016). Acredita-se que a maior parte de UPEC seja proveniente da microbiota do trato gastrointestinal, mesmo em indivíduos saudáveis. Da mesma forma, algumas evidências indicam que outros animais também podem ser reservatórios potenciais para esses patógenos (FEGAN; GOBIUS, 2013) e, uma vez que obtenham acesso a outros locais fora do intestino, são capazes de colonizar esses sítios de forma eficiente, causando assim, infecções em seu hospedeiro (KÖHLER; DOBRINDT, 2011).

Aproximadamente 150 milhões de pessoas são acometidas por ITU ao ano em todo o mundo, sendo até quatro vezes mais frequente em mulheres do que em homens. Isso acontece principalmente devido ao menor comprimento da uretra e uma menor distância entre o ânus e a abertura uretral em mulheres (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2016). Estima-se que, ao longo da vida, 40% das mulheres desenvolvam pelo menos um episódio de ITU (MICALI et al., 2014) e que 11% das mulheres com mais de 18 anos apresentem um episódio por ano (FOXMAN; BROWN, 2003)

UPEC são capazes de colonizar a bexiga através de uma variedade de fatores de virulência que desempenham papéis críticos na patogênese da ITU, incluindo componentes estruturais de superfície, como as cápsulas de polissacarídeo, flagelos, vesículas da membrana externa, adesinas, proteínas da membrana externa (OMPs) e sistemas de absorção de ferro, incluindo receptores de sideróforos (TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEI, 2017).

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

UPEC pode utilizar diversos fatores de virulência (FV) para penetrar, aderir e adquirir os nutrientes necessários para multiplicar-se em um ambiente hostil, causando danos aos tecidos e disseminando-se no trato urinário (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2016).

FVs são codificados no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos, onde geralmente estão localizados dentro de ilhas de patogenicidade (PAI) e são separados em cinco grupos, incluindo adesinas; toxinas; sistemas de aquisição de ferro e sideróforos; produção de cápsulas polissacarídicas, resistência sérica e invasinas. Evidências indicam que, de forma isolada, nenhum FV seja capaz de causar doença, mas que a expressão de um conjunto de genes de FV sim estejam relacionados à patogenicidade do microrganismo (DALE; WOODFORD, 2015).

Esses FVs facilitam a colonização das superfícies do hospedeiro pelo microrganismo, além de defender-se contra mecanismos de defesa, lesionando e invadindo células e tecidos hospedeiros e, assim, iniciando então uma resposta inflamatória nociva, levando ao desenvolvimento de uma doença infecciosa (MORARILLO et al., 2015).

1.3.1 Adesinas

A maioria das bactérias comensais e patogênicas interagem com o hospedeiro eucariótico através da expressão de moléculas adesivas em suas superfícies que promovem a interação com receptores de células hospedeiras ou com macromoléculas solúveis. Apesar dessa ligação bacteriana a células epiteliais ser benéfica para a colonização bacteriana, a adesão pode ter um custo, visto que também pode estimular a infiltração e ativação de células e fagocitose, o que facilita a eliminação bacteriana. Por isso, algumas dessas bactérias patogênicas resolveram esse dilema, produzindo uma camada na superfície que impede o reconhecimento imunológico ou fagocitose e expressando suas adesinas em estruturas poliméricas que se estendem para fora da superfície da célula, permitindo que as interações iniciais com o hospedeiro aconteçam (KLINE et al., 2009).

Essas estruturas de adesão foram chamadas de "Fímbrias" e "Pili" por DUGUID et al., (1954), mas hoje é aconselhável dar o último nome apenas aos apêndices envolvidos na conjugação de plasmídeo (MAINIL, 2013).

Essas fímbrias de *E. coli*, segundo Mainil et al. (2013), podem ser divididas em pelo menos três classes gerais diferentes como fímbrias, fibrilas e curli. Outras estruturas de adesão englobam a família afimbrial (Afa) e proteínas específicas da membrana externa (OMPs).

As fímbrias são organelas filamentosas curtas usadas por bactérias para aderir a diversas superfícies e, em geral, as cepas de UPEC carregam um número significativamente maior de genes fimbriais do que as cepas fecais e comensais (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2016). Estas são compostas por estruturas poliméricas que se estendem para fora da superfície celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e estão envolvidas na adesão, motilidade, transferência de DNA e formação de biofilme (VO et al., 2017).

Entre as fímbrias do tipo 1 (Fim), a adesina FimH liga-se a um receptor de células epiteliais da bexiga, permitindo a invasão e formação de estruturas intracelulares semelhantes a um biofilme (SAROWSKA et al., 2019), através da interação com D-manose nas glicoproteínas. Já as fímbrias do tipo P (Pap), são encontradas exclusivamente em ilhas de patogenicidade distribuídas entre as cepas de UPEC, que possuem um tipo único de pili codificado pelos genes *pap*, associadas à pielonefrite. As fímbrias P foram assim denominadas devido à ligação com receptores Gal α -4Gal β glicolipídicos dos glóbulos vermelhos e são necessárias para a aglutinação resistente à manose de eritrócitos humanos e PapG é a adesina de ponta fimbrial que confere uma especificidade para adesão mediada por essas fímbrias, visto que se liga a glicosfingolipídios contendo porções digalactosídeo encontradas no epitélio renal. Além de seu papel na aderência, as fímbrias P também estão envolvidas na regulação da motilidade (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2016)

Já as fímbrias do tipo S, codificadas pelo gene *sfa*, permitem a invasão de patógenos aos tecidos do hospedeiro e são frequentemente detectadas em cepas responsáveis por causar meningite e ITU ascendentes, incluindo pielonefrite ou sepse (SAROWSKA et al., 2019). Elas reconhecem e se ligam a moléculas receptoras na superfície celular que contêm ácido α -siálico presentes em eritrócitos

e células tubulares renais (KORHONEN; VAISANEN-RHEN; RHEN, 1984). Essas adesinas, expressas por ExPEC, são codificadas por um operon localizado em PAIs no cromossomo bacteriano, como por exemplo PAI III₅₃₆ (BALSALOBRE et al., 2003; KÖHLER; DOBRINDT, 2011).

As cepas de *E. coli* não produtoras de fímbrias também podem causar aglutinação de eritrócitos. Essas hemaglutininas, na verdade, formam uma família de diferentes adesinas geneticamente relacionadas, a família AFimbrial (Afa), codificados por genes localizados em plasmídeos ou cromossomos e reagrupadas em variantes Afa, Dr e M, que são verdadeiras adesinas afimbriais, F1845 e AAF, que formam pequenas fibrilas e Nfa, que possui estruturas semelhantes a cápsulas ao redor da célula bacteriana (MAINIL, 2013). Os isolados de *E. coli* patogênica que expressam Afa são frequentemente associadas a diarreia persistente e infecções extraintestinais crônicas ou recorrentes. Isso se deve porque depois de entrarem nas células epiteliais, os isolados que expressam Afa podem criar nichos especiais que permitem que as bactérias persistam intracelularmente. Pelo menos dois produtos Afa (AfaD e AfaE) contribuem para diferentes processos de internalização, demonstrando a complexidade das interações entre bactérias afa-expressoras e células epiteliais (LE BOUGUÉNEC, 2005).

Evidências indicam que as adesinas auxiliam na formação do biofilme pela UPEC, promovendo uma persistência bacteriana no trato urinário e protegendo as bactérias das forças hidrodinâmicas, agentes antibacterianos e mecanismos de defesa do hospedeiro (FERACO et al., 2016).

1.3.2 Toxinas

A hemolisina A (HlyA) é uma toxina formadora de poros codificada pelo gene *hlyA*, produzida por vários tipos patogênicos de *E. coli*, capazes de causar diversos tipos de infecções extraintestinais, como cistite, pielonefrite, meningite e sepse (MAINIL, 2013) e está entre os genes altamente expressos durante o crescimento de UPEC dentro das células da bexiga, desempenhando assim um papel significativo na patogênese das ITU (TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEI, 2017).

O papel da hemolisina como fator de virulência parece variar de acordo com a cepa e o local de infecção no hospedeiro, mas sua principal propriedade é lisar os

glóbulos vermelhos e sua atividade citotóxica contra diversos tipos de células nucleadas, incluindo células imunes, endoteliais e epiteliais no trato urinário, tendo sua patogênese relacionada à morte de células do epitélio do hospedeiro, como as células uroepiteliais e também de monócitos, linfócitos e neutrófilos (RISTOW; WELCH, 2016). Além disso, o ambiente hospedeiro em que se encontram os isolados de ExPEC são pobres em nutrientes e devido à presença de HlyA causando destruição celular, a liberação de fatores críticos para o crescimento bacteriano, como o ferro e outros nutrientes, é facilitada (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008). HlyA possui também atividade proteolítica, sendo capaz de degradar proteínas do citoesqueleto e outras proteínas envolvidas com o NF- κ B, interferindo na via de sinalização pró-inflamatória (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2016).

A hemolisina F (HlyF) é codificada pelo plasmídeo ColV e um marcador epidemiológico de APEC, ligado, portanto, ao estabelecimento de infecções extraintestinais em aves. Antes foi associado também a uma potencial função de lise aos glóbulos vermelhos, mas atualmente pouco se sabe sobre sua real contribuição para a virulência (MURASE et al., 2015).

Os fatores citotóxicos necrotizantes (CNF1 e CNF2) são proteínas de 114 kDa codificadas pelo gene *cnfA*, e aproximadamente um terço dos isolados de UPEC codificam essas proteínas capazes de afetar várias funções celulares eucarióticas. Para isso, é necessário que o CNF1 acesse o citosol do hospedeiro, onde as condições ácidas dentro deste compartimento induzem sua translocação através de uma membrana vesicular e por fim acabe estimulando uma família de Rho GTPases, que atuam como interruptor molecular nas vias de transdução de sinal que envolvem componentes do citoesqueleto, como actina, miosina e microtúbulos e estão presentes em vários processos celulares, incluindo fagocitose e explosão oxidativa em neutrófilos (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

A expressão de CNF1 por UPEC pode impactar a patogênese da ITU de múltiplas formas, promovendo a apoptose de células epiteliais da bexiga ao estimular sua esfoliação e aumentando o acesso bacteriano ao tecido subjacente; estimulando um enrugamento da membrana plasmática levando à formação de filopódios e aumentando assim a motilidade da célula hospedeira e a absorção bacteriana; inibindo as atividades fagocíticas e quimiotáticas de neutrófilos do

hospedeiro. Em geral, estes mecanismos mediados por CNF1 podem facilitar a disseminação e persistência de UPEC dentro do trato urinário (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008), de forma que cepas de *E. coli* deficientes em CNF1, têm menos potencial para colonizar o trato urinário (KNUST; SCHMIDT, 2010).

Os CNFs estão associados também a vários outros fatores de virulência, como aerobactina, fímbrias P e hemolisina e os casos de infecções por UPEC com a presença desse fator é acompanhada por um aumento na taxa de inflamação. Além disso, CNF1 e CNF3 são codificados cromossomicamente, enquanto CNF2 está localizado em um plasmídeo transmissível. (KNUST; SCHMIDT, 2010).

1.3.3 Sistemas de Aquisição de Ferro

O ferro é essencial para a vida e o funcionamento adequado de todos os organismos vivos, incluindo vertebrados, invertebrados e organismos procarióticos, como as bactérias, desempenhando um papel fundamental nos processos celulares básicos, como a respiração celular, a replicação do DNA e transporte de oxigênio. Para promover adequadamente os processos metabólicos e compartilhar as propriedades patogênicas, as bactérias precisam ter acesso ao ferro e esse acesso é difícil porque embora o ferro seja um dos metais mais abundantes, apenas uma pequena quantidade está disponível para os organismos na natureza (SAROWSKA et al., 2019).

Os patógenos encontram limitações na sua utilização, devido a uma defesa inata dos humanos contra as bactérias, de forma que o ferro elementar é ligado pelas glicoproteínas, como a transferrina e a lactoferrina ou incorporado nas porções heme de proteínas, tais como a hemoglobina e a mioglobina. Para garantir níveis adequados de ferro intracelular, UPEC regula positivamente a expressão de genes envolvidos na aquisição de ferro em resposta à limitação de ferro encontrado no trato urinário de mamíferos, podendo adquirir ferro férrico usando sideróforos, ferro ferroso por meio de transportadores de ferro e heme através dos receptores de heme da membrana externa (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2016).

Três sistemas de sideróforos são mais prevalentes em ExPEC, o sistema de aerobactina, caracterizado pelo receptor *lutA*, o sistema yersiniabactina, sintetizado por genes localizados em uma ilha de alta patogenicidade e caracterizado pelo

receptor FyuA e o sistema salmoquelina, caracterizado pelo receptor de sideróforos IroN (NÈGRE et al., 2004).

No caso de cepas ExPEC, o acesso ao ferro no soro sanguíneo é de suma importância, visto que *E. coli* pode causar sepse e diferentes infecções em vários órgãos com uma disponibilidade muito baixa de ferro, desenvolvendo diversas estratégias para obtenção de ferro nos locais infectados através de sistemas especializados para captar indiretamente o ferro, baseado no chamado mecanismo de transporte envolvendo moléculas pequenas (200-2.000 Da) com alta afinidade para íons ferro (fortes propriedades quelantes) chamados sideróforos, que permitem a captura de ferro trivalente da ferritina e transferrina. Um estudo de Sarowska et al. (2019), relatou uma prevalência de 100% do gene para esses fatores em amostras de *E. coli* isoladas de fezes de frango.

O gene *iroN* é um marcador de salmoquelina e um importante gene de virulência em ExPEC, visto pela primeira vez em *Salmonella entérica* (SAROWSKA et al., 2019).

Já a Aerobactina, isolada pela primeira vez de *Aerobacter aerogenes*, é similar à salmoquelina, mas codificada por ColV e plasmídeos de virulência ColBM de ExPEC, de forma que o receptor de aerobactina tem uma eficiência muito maior na captura de ferro do que a enterobactina (SAROWSKA et al., 2019). A proteína de transporte da membrana externa é codificada pelo gene *iutA* e o fornecimento de ferro via aerobactina férrica contribui para virulência de patógenos de *E. coli* (GARÉNAUX; CAZA; DOZOIS, 2011).

ExPEC podem ter também outros tipos de sideróforos, como a yersiniabactina, que foi detectada originalmente em *Yersinia pestis*, principalmente durante a colonização do trato urinário, codificada em uma ilha de alta patogenicidade encontrada em ExPEC e contribui para a patogenicidade de UPEC, protegendo as células bacterianas contra a resposta imune do hospedeiro (SAROWSKA et al., 2019).

1.3.4 Cápsulas Polissacarídicas

E. coli possuem uma superfície formada por uma matriz complexa de proteínas e polissacarídeos que dão origem a antígenos celulares, sendo os principais deles, os antígenos do tipo O, derivados das cadeias laterais variáveis de lipopolissacarídeos (LPS), e os antígenos K (da palavra alemã kapsel), representando diferentes polissacarídeos capsulares. Essas cápsulas formam uma camada estrutural envolvente nas superfícies de bactérias, capaz de protegê-las contra as defesas do hospedeiro ou estresses físicos ambientais (WHITFIELD, 2009) e esses polissacarídeos capsulares são essenciais para a virulência bacteriana, uma vez que estão envolvidos em processos biológicos importantes, incluindo adesão e resistência às respostas imunológicas do hospedeiro. Além disso, conferem também uma resistência à morte mediada pelo sistema complemento e à fagocitose (ABREU; BARBOSA, 2017).

Os genes envolvidos na biossíntese, especificidade do serotipo e na exportação de cápsulas em UPEC estão localizadas em três diferentes grupos de genes, designados como regiões 1, 2 e 3, respectivamente (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2016).

Essas cápsulas foram classificadas em quatro grupos, de 1 a 4, baseados em suas características, incluindo a organização genética e a regulação dos *locus* relevantes e os mecanismos de biossíntese e montagem. De uma perspectiva exclusivamente biossintética, existem apenas duas vias de montagem, definidas pelos protótipos dos grupos 1 e 2. Os grupos 3 e 4 são essencialmente variantes genéticas dos grupos 2 e 1, respectivamente (WHITFIELD, 2009).

As cápsulas dos grupos 1 e 4 são encontradas em isolados de *E. coli* responsáveis por causar infecções intestinais, incluindo EPEC, ETEC e EHEC (WHITFIELD, 2009). Já as cápsulas do grupo 2 (K1, K4, K5, K7, K12) e 3 (K2, K3, K10, K11, K19, K54) são encontradas em isolados responsáveis por causar infecções extraintestinais, como meningite neonatal (WHITFIELD, 2009).

A maioria das cepas patogênicas extraintestinais de *E. coli*, incluindo UPEC, produzem cápsulas do grupo 2, altamente heterogêneas e semelhantes a glicoconjugados encontrados em hospedeiros vertebrados, o que se torna uma boa estratégia de evasão do sistema imunológico. O tipo capsular K1 mimetiza o ácido

polissialcico e o tipo K4 mimetiza o esqueleto de condroitina. Além disso, a cápsula K1 é também relacionada a um desenvolvimento bem-sucedido de comunidade bacteriana intracelular dentro da bexiga (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2016) e crucial para o desenvolvimento e sobrevivência de *E. coli* nem infecções da corrente sanguínea, podendo causar altos níveis de bacteremia (ABREU; BARBOSA, 2017).

Assim como a cápsula K1, a cápsula K5 também está envolvida na patogênese das infecções extraintestinais, como bacteremia, ITU e meningite neonatal e confere resistência, tanto ao sistema imunológico inato quanto ao adaptativo humano, além de prevenir UPEC da ação de neutrófilos (BLUNDELL et al., 2009).

Em combinação, esses resultados estabelecem que as cápsulas são um genuíno fator de virulência em UPEC (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2016).

1.3.5 Resistência Sérica

E. coli é uma das principais causas de infecções da corrente sanguínea, representando cerca de 17 a 37% de todas as bactérias isoladas nestes casos (RUSSO; JOHNSON, 2003). Sua presença pode induzir uma vigorosa resposta inflamatória do hospedeiro, podendo levar à sepse, e os fatores de virulência expressos por ExPEC podem permitir sua sobrevivência e colonização de locais fora do sistema gastrointestinal (MIAJLOVIC; SMITH, 2014). Em geral, isolados de *E. coli* do sangue são mais resistentes ao soro do que as cepas que causam ITU ou cepas isoladas de amostras fecais e segundo Miajlovic e Smith, (2014), múltiplos fatores de virulência estão envolvidos nesse processo.

A deposição de fatores do complemento na superfície bacteriana é capaz de ativar a cascata do sistema complemento e resultar na formação do complexo de ataque à membrana (CAM), formando poros transmembranares em bactérias suscetíveis, induzindo sua morte (SARMA; WARD, 2011).

Diversos fatores capazes de impedir a ação do complemento são codificados por plasmídeos conjugativos, e isso tem implicações para a transmissibilidade desses genes. Um desses fatores é o TraT, uma lipoproteína de membrana externa codificada por alguns Plasmídeos ColV e plasmídeos do grupo F. Sua expressão foi associada a um aumento da resistência sérica, embora o mecanismo subjacente a

esta propriedade não foi determinada de forma conclusiva (JOHNSON, 1991). Estudos sugerem que o TraT inibe alguns estágios posteriores da atividade CAM e a formação ou estrutura do complexo C5b6. TraT também pode alterar a deposição de C3 na superfície bacteriana e afetar a permeabilidade da membrana externa (MIAJLOVIC; SMITH, 2014).

O gene *iss* (*increased serum survival*) é encontrado nos plasmídeos ColV / BM e codifica a proteína de sobrevivência sérica aumentada (Iss). Os mecanismos pelas quais sua expressão aumenta a sobrevivência sérica não são bem determinados (JOHNSON, 1991), mas está associada a três funções: renovação da proteína de membrana, degradação do interferon-gama e clivar a defensina humana LL-37 (SAROWSKA et al., 2019). Evidências indicam que Iss também interfere na ação de complexos terminais CAM (MIAJLOVIC; SMITH, 2014).

O gene *ompT*, que codifica a protease da membrana externa (*ompT*), está presente no genoma de 85% -97% de isolados clínicos de UPEC e é usado em estudos epidemiológicos para identificar cepas UPEC virulentas, mas sua função em isolados clínicos permanece desconhecida (DESLOGES et al., 2019). Apesar disso, estudos têm demonstrado que *OmpT* pode inativar os peptídeos antimicrobianos do hospedeiro (OKUNO et al., 2004) e aumentar a colonização de *E. coli* no uroepitélio (HUI et al., 2010).

1.3.6 Invasinas

A proteína IbeA, semelhante à albumina e conhecida como proteína de invasão do endotélio cerebral, possui 50 kDa e é responsável por facilitar a penetração e adesão de *E. coli* em células endoteliais responsáveis por constituir uma barreira hematoencefálica, vista principalmente em cepas causadoras de infecções em recém nascidos e isolada pela primeira vez em um caso de NMEC. Além disso, é vista também em casos de urosepse, devido à sua capacidade de invasão à barreira hematoencefálica e é sugestivo que IbeA desempenhe um importante papel na etapa inicial da meningite e da sepse neonatal (MENDU et al., 2008).

IbeA está localizado em uma ilha de 20–3 kb inserida entre *yjiD* e *yjiE* e acredita-se que contenha quatro operons, alguns dos quais, potencialmente envolvidos no metabolismo energético.

Foi identificado um receptor de *ibeA* em humanos, de 45 kDa e e em bovinos de 55 kDa (ZOU; HE; HUANG, 2006). Além disso, foi relatado a presença em isolados de APEC altamente patogênica, e sua ausência esteve associada a uma diminuição da mortalidade em galinhas (GERMON et al., 2005), embora sua função exata ainda seja desconhecida (ZOU; HE; HUANG, 2006)

1.4 ILHAS DE PATOGENICIDADE

Os genomas de várias bactérias patogênicas, incluindo UPEC, possuem regiões de DNA adquiridas por transferência horizontal de genes, chamadas de ilhas genômicas. Essas ilhas possuem elementos móveis, como transposons e fagos e são um dos meios mais rápidos de disseminação de fatores de virulência entre as bactérias. Na maioria das vezes, essas ilhas contêm genes de virulência e são conhecidas como ilhas de patogenicidade (PAI). (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2016).

Muitos fatores de virulência são contidos nas PAI, como invasinas, adesinas, toxinas, sideróforos e componentes que possibilitem a ação destes fatores, enfatizando assim sua importância na formação dos vários patótipos. A diversidade de doenças associadas às infecções por *E. coli* também é refletida pelas variedades estruturais e funcionais nas PAIs. (DOBRINDT et al., 1998).

As primeiras descobertas sobre a presença de PAI em patógenos bacterianos de deram a partir de estudos usando uma cepa UPEC 536, onde foram analisados os genomas, por hibridização genômica comparativa e verificou-se que cerca de 52% foi conservado entre e apenas 131 genes foram encontrados em todas as 11 cepas de UPEC, incluindo 536, CFT073, F11 e UTI89, que estavam ausentes em cepas fecais/ comensais, associadas então a genes específicos do uropatógeno, indicando um alto nível de divergência entre as cepas de *E. coli* (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2016).

Pelo menos cinco PAI (PAI I536, PAI II536, PAI III536, PAI IV536 e PAI V536) foram identificados no cromossomo do isolado uropatogênico *E. coli* 536 (HOCHHUT; DOBRINDT; HACKER, 2005). PAI III536 possui uma integrase adicional homóloga à integrase do bacteriófago SfX de *Shigella flexneri*. PAI I536 e PAI II536 são ilhas instáveis, visto que ambas codificam a α -hemolisina de *E. coli*,

característica na qual a variação pode ser facilmente detectada (MANSON; GILMORE, 2006). PAI IV536 é considerada uma ilha de alta patogenicidade e está associada à síntese e transporte de yersiniabactina, um dos principais sistemas bacterianos de absorção de ferro. Além disso, é altamente conservada entre as espécies, com homologias de 98 a 100%, entre os genes de *E. coli* (DOBRINDT et al., 1998). Já a PAI V536 contém um determinante genético que codifica a cápsula polissacarídica K15, que pode proteger o organismo mascarando a superfície celular e evitando a internalização por células fagocíticas, desempenhando assim um importante papel na patogênese das UTIs (HOCHHUT; DOBRINDT; HACKER, 2004; MANSON; GILMORE, 2006).

Foi relatada a presença de PAI I_{J96} em cepas de *E. coli* J96 de pielonefrite, contendo genes codificadores de α -hemolisina, fímbria P e CNF-1. PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073} também foram relatadas primeiramente em cepas de *E. coli* CFT073 isoladas de urina e são frequentemente encontradas em UPEC, sendo que PAI I_{CFT073} possui genes que codificam α -hemolisina, fímbria P e aerobactina e PAI II_{CFT073} possui genes que codificam fímbria P e sideróforos e também já foram associadas a resistência aos betalactâmicos (BIN THANI, 2018; HOCHHUT; DOBRINDT; HACKER, 2004).

1.5 CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA

No início dos anos 1980, Whittam et al. juntamente com estudos posteriores, descobriram e confirmaram a existência de subestruturas genéticas em *E. coli*, que indicavam que as cepas pertencentes aos seus diferentes filo-grupos não estavam distribuídas aleatoriamente de acordo com o local de isolamento (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012; CLERMONT et al., 2013) e sim de acordo com suas características fenotípicas e genotípicas, seu nicho ecológico, traços de história de vida e capacidade de causar doença (TENAILLON et al., 2010). Classificou-se então *E. coli* em oito diferentes filo-grupos: A, B1, B2, C, D, E, F e *Escherichia* clado I, através da detecção dos genes *chuA* e *yjaA* e um fragmento de DNA TspE4.C2 (CLERMONT et al., 2013).

A maioria dos isolados comensais pertencem aos grupos A e B1, enquanto cepas extraintestinais mais virulentas geralmente são pertencentes ao grupo D e

principalmente ao grupo B2, que possui menor prevalência de resistência antimicrobiana (CLERMONT et al., 2008). Esses grupos B2 e D compreendem diversas linhagens que, devido a suas associações com diversas infecções extraintestinais, passaram a ser considerados como clones virulentos (JOHNSON; STELL, 2000).

Os isolados do grupo B2 também são menos frequentemente encontrados em ambiente e em relação aos mamíferos, são mais vistas em hospedeiros com alterações intestinais para fermentação microbiana do que isolados de outros filogrupos (GORDON; COWLING, 2003).

Os isolados diferem também em suas características fenotípicas, em relação à capacidade de utilizar diferentes açúcares, seus perfis de resistência aos antimicrobianos e suas taxas de crescimento em diferentes temperaturas, além do tamanho de seus genomas, que é menor nas cepas dos grupos A e B1 do que nos grupos B2 e D (GORDON et al., 2008).

1.6 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

A resistência dos microrganismos frente aos antimicrobianos pode ocorrer de forma intrínseca ou ser adquirida através de diversos mecanismos, como alteração enzimática do antimicrobiano, alteração e restrição de acesso ao sítio alvo, bombas de efluxo, diminuição da permeabilidade, entre outros. Na maioria das vezes, esses mecanismos podem ser atribuídos a um dos seguintes processos: mutações pontuais em genes cromossômicos, aquisição de genes de resistência exógena via elementos genéticos móveis ou mutações em tais genes adquiridos (FLEECE et al., 2018).

O uso de cefalosporinas de amplo espectro em animais é um grande facilitador para a seleção e disseminação de mecanismos de resistência, como as enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (DUTIL et al., 2010). Pesquisas indicam a disseminação de cepas de *E. coli* ESBL positivas entre a microbiota intestinal de humanos saudáveis **PROCURAR UMA REFERENCIA MAIS ATUAL (VINUÉ et al., 2009)** e animais produtores de alimentos e em produtos

alimentícios (BRINAS et al., 2005; BLANC et al., 2006; GIRLICH et al., 2007; JOUINI et al., 2007; SMET et al., 2008). Esses microrganismos resistentes podem, portanto, ser transferidos para humanos através da cadeia alimentícia, o que representa um sério problema de saúde pública.

Além das cefalosporinas, as quinolonas também são antimicrobianos amplamente utilizados na produção de alimentos da indústria animal, como aditivos alimentares para promover crescimento e prevenção de doenças e também para fins terapêuticos. A crescente resistência a estes fármacos são de suma importância, visto que a Organização Mundial da Saúde (OMS) os classifica como antimicrobianos criticamente importantes por seus efeitos de amplo espectro e importância clínica tanto na medicina humana, quanto na animal. (HU; MATSUI; RILEY, 2020).

1.7 VEGETARIANISMO E VEGANISMO

Segunda a Sociedade Vegetariana Brasileira (SVB), vegetarianismo é o regime alimentar que exclui os produtos de origem animal, incluindo algumas possíveis variações, como o ovolactovegetarianismo, que ainda utiliza como derivados de animais, ovos, leite e laticínios na sua alimentação; lactovegetarianismo, que utiliza leite e laticínios; ovovegetarianismo, que utiliza ovos e vegetarianismo estrito, que não utiliza nenhum produto de origem animal na sua alimentação. Já o veganismo, segundo definição da The Vegan Society, é um modo de viver que busca excluir, na medida do possível e praticável, todas as formas de exploração e crueldade contra os animais, não só na alimentação, mas também no vestuário ou em outras esferas do consumo.

1.8 ALIMENTAÇÃO E ANTIMICROBIANOS

A composição da microbiota intestinal humana está relacionada a diferentes hábitos alimentares, assim como a saúde depende do metabolismo dessa microbiota, apesar de não sabermos ao certo ainda como os diferentes estilos de vida e diversos tipos de dietas que os humanos modernos experimentam podem influenciar nessa composição (DE FILIPPO et al., 2010). Isso porque são poucos os

estudos que avaliam a qualidade de dietas restritivas comparadas a uma dieta onívora (CLARYS et al., 2014), mas sabe-se que diferentes hábitos que sigam um padrão alimentar a longo prazo, como a dieta onívora e o vegetarianismo e o veganismo, têm significativa influência na composição da microbiota intestinal (TOMOVA et al., 2019).

Estudos moleculares identificaram que alimentos de origem animal, esgoto e outras fontes animais e ambientais e o próprio intestino podem ser potenciais reservatórios para ExPEC, capazes de causar infecções e grandes implicações na saúde pública (MANGES; JOHNSON, 2012). Isso porque muitas das classes de antimicrobianos utilizados nos tratamentos em humanos, estão sendo usados em muitos países na prática veterinária, em terapias e profilaxia de doenças infecciosas, além de estarem sendo utilizados também na cadeia alimentícia, principalmente como promotores de crescimento (AGPs) na produção animal e nos alimentos derivados de sua origem, o que torna mais favorável a seleção e disseminação de cepas resistentes, causadoras dessas infecções em animais e também em humanos (AARESTRUP; WEGENER; COLLIGNON, 2008).

Evidências já existentes relatam que carne de frango e de porco apresentam altos níveis de contaminação por *E. coli*, com cepas extensivamente resistentes, produtoras de ESBL e fatores de virulência altamente semelhantes aos encontrados em ExPEC de humanos, sendo potenciais causadoras de doenças infecciosas. Essas cepas de ExPEC podem colonizar e permanecer no trato intestinal até que as circunstâncias sejam favoráveis a uma infecção extraintestinal no próprio hospedeiro (MANGES; JOHNSON, 2012).

Além disso, durante o tratamento realizado com antimicrobianos, todas as bactérias presentes no hospedeiro são expostas à pressão seletiva do antibiótico. Conseqüentemente, o TGI está altamente exposto também, principalmente durante a terapia oral, podendo favorecer uma seleção natural de cepas resistentes que carregam um importante pool genético capaz de transferir seus genes de resistência a outras cepas presentes na microbiota do intestino humano (SCHJØRRING; KROGFELT, 2011).

Por isso, *E. coli* é um patógeno importante em relação ao conceito *One Health*, definido como um esforço integrador de múltiplas disciplinas que atua a nível

global para alcançar a saúde ideal através do manejo da saúde humana, animal, ambiental e no combate à resistência aos antimicrobianos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017), uma vez que a microbiota intestinal humana pode interagir dinamicamente com o ambiente externo de maneira bidirecional, visto que as bactérias podem se mover entre os ecossistemas, de animais para humanos, através de esterco e fezes, para água e solo e retornar para humanos e animais por meio de alimentos e rações (SCHJØRRING; KROGFELT, 2011).

Além do contato direto com pessoas e outros animais, as principais fontes de bactérias resistentes incluem o ambiente, como água contaminada e alimentos como carne e vegetais. Além disso, bactérias comensais intestinais resistentes a drogas também são relatadas como importantes reservatórios de genes de resistência aos antimicrobianos (HU; MATSUI; RILEY, 2020)

Por isso, é importante conhecer as possíveis diferenças existentes entre a microbiota intestinal de indivíduos saudáveis adeptos de diferentes tipos de dietas, na tentativa de relacionar os hábitos e estilo de alimentação e de vida com um melhor prognóstico em casos de infecções causadas principalmente por esses agentes comensais, como *E. coli*, que coloniza a microbiota intestinal de humanos e vários animais de sangue quente e é também o principal patógeno em casos de ITU (HASHEMIZADEH; KALANTAR-NEYESTANAKI; MANSOURI, 2017).

Este trabalho teve como objetivo pesquisar, quanto a resistência e virulência, *E. coli* isoladas das fezes de pessoas onívoras e compará-las com amostras isoladas de pessoas vegetarianas e/ou veganas. Bem como, caracterizar os perfis epidemiológicos dos pacientes e dos antimicrobianos utilizados como primeira escolha para o tratamento de ITU comunitária.

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a resistência aos antimicrobianos e os fatores de virulência em amostras fecais de *E. coli* da microbiota intestinal de onívoros, vegetarianos e veganos e analisar os dados epidemiológicos e sociodemográficos de pacientes da comunidade com infecção do trato urinário na cidade de Londrina, de junho de 2016 a maio de 2019.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Conhecer através da aplicação de um questionário, os hábitos alimentares de pessoas voluntárias para participar deste estudo;
- 2.2.2 Isolar *E. coli* da microbiota intestinal de pessoas onívoras, vegetarianos e veganos;
- 2.2.3 Avaliar o perfil de resistência aos antimicrobianos de *E. coli* isoladas da microbiota intestinal de indivíduos onívoros e vegetarianos e veganos;
- 2.2.4 Pesquisar por testes fenotípicos a presença de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) nos isolados estudados;
- 2.2.5 Pesquisar por testes genotípicos a presença de enzimas ESBL-CTXM em amostras positivas para o teste fenotípico de ESBL;
- 2.2.6 Pesquisar a presença de fatores de virulência e ilhas de patogenicidade nas amostras isoladas;
- 2.2.7 Realizar por testes genotípicos a classificação filogenética das amostras;
- 2.2.8 Avaliar os dados epidemiológicos e sociodemográficos de pacientes da comunidade com ITU;
- 2.2.9 Avaliar o perfil de sensibilidade de *E. coli* isolada de ITU de pacientes da comunidade;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

O delineamento do estudo é do tipo caso-controle observacional retrospectivo.

Foram avaliadas 118 amostras, sendo 60 de onívoros e 41 vegetarianos e 17 veganos.

Foi critério de inclusão no estudo, seguir o tipo de dieta há pelo menos um semestre. Os critérios de exclusão foram ter histórico de internação ou ter feito uso de antibiótico no último semestre, trabalhar em ambiente hospitalar, além de, no grupo de vegetarianos/ veganos, ter ingerido qualquer tipo de carne nesse mesmo período.

Além disso, foram analisadas 22.810 amostras de urina de pacientes da comunidade, atendidos nas unidades básicas de saúde (UBS) e de emergência, no período de junho de 2016 a maio de 2019, na cidade de Londrina, Paraná, Brasil.

Foram critérios de exclusão no caso das análises das amostras de ITU, resultados com dados incompletos sobre o antibiograma ou a identificação do microrganismo e pacientes com testes repetidos dentro de um período de até 6 meses ou em internação domiciliar e /ou residentes em casa de repouso.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina CAAE 56869816.0.0000.5231.

3.2 COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO INICIAL DAS AMOSTRAS

3.2.1 *E. coli* de fezes de Onívoros, Vegetarianos e Veganos

Os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice A) e responderam um questionário sociodemográfico (apêndice B) com suas informações pessoais e sobre seus estilos de vida.

Uma amostra de fezes foi cedida por cada paciente e mantida em temperatura ambiente até o processamento da amostra, por no máximo 6 horas.

Aproximadamente 1g de fezes foi inoculada em três tubos distintos, sendo que um tubo continha somente o caldo *E. coli* (EC), meio de cultivo seletivo para

coliformes termotolerantes, um segundo contendo caldo EC mais 4 ug/mL de norfloxacino e um contendo caldo EC mais 4ug/ mL de ceftriaxona, visando assim, selecionar cepas com maior potencial de resistência antimicrobiana.

Os meios de cultura foram incubados a 44°C por 24 horas, e posteriormente inoculados em ágar cromogênico (Becton Dickinson GmbH) e ágar McConkey e mantidos a 37°C/24h. As colônias de coloração rósea em ágar cromogênico (sugestivas de *E. coli*) foram submetidas a identificação no sistema automatizado Vitek® 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) e sendo positivas para *E. coli*, armazenadas em ágar nutriente (temperatura ambiente) e em TSB (*Tryptic Soy Broth*) com glicerina 15% (-20°C), até a realização dos testes posteriores.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado pela técnica de disco difusão em ágar Mueller-Hinton e analisados de acordo com os critérios do *Clinical and laboratory Standards institute* (CLSI), 2020. Foram testados os seguintes antimicrobianos: cefoxitina, ciprofloxacino, cefotaxima, cefazolina, piperacilina+tazobactam, ertapenem, imipenem, meropenem, ampicacina, ampicilina, norfloxacino, gentamicina, sulfametoxazol+trimetoprim, ácido nalidíxico, nitrofurantoína, tetraciclina, cefepime, ceftazidima, ceftriaxona, amoxicilina+ácido clavulânico, aztreonam.

Para os isolados que apresentaram halos inferiores aos valores de referência para sensibilidade, para as cefaloporinas de 3ª e 4ª geração, foram realizados também o teste de disco aproximação para detecção de ESBL, utilizando discos de amoxicilina/ácido clavulânico, ceftazidima, aztreonam, ceftriaxona e cefepime.

As amostras foram armazenadas em ágar nutriente (temperatura ambiente) e TSB (*Tryptic Soy Broth*) com 15% de glicerol (-20 ° C) até a realização dos testes.

3.2.2 Isolamento de *E. coli* Urinária

O estudo foi realizado com a colaboração do laboratório CentroLab, responsável por realizar todas as uroculturas do município de Londrina, abrangendo todas as UBSs e UPAs. Trata-se de um estudo transversal, retrospectivo, descritivo, realizado no período de junho de 2016 a maio de 2019.

As amostras foram semeadas com alças calibradas de 10µl em placas de ágar chromID® CPS® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França). A identificação, o teste de

sensibilidade aos antimicrobianos e de ESBL foram realizados usando o sistema automatizado Vitek® 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França).

As amostras foram armazenadas em ágar nutriente (temperatura ambiente) e Tryptic Soy Broth-TSB com 15% de glicerol (-20 ° C) até a realização dos testes.

A ITU foi definida como uma cultura de urina positiva quando as contagens de colônias foram $\geq 10^5$ UFC / mL (ANVISA 2013) .

Os dados demográficos e epidemiológicos foram coletados no WebSaúde, sistema de interface da prefeitura de Londrina, que contém dados sociodemográficos e epidemiológicos de todas as unidades básicas de saúde do município.

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA genômico foi realizada pelo método de fervura.

Foram suspensas de três a cinco colônias da bactéria crescidas no ágar Mueller Hinton, em 0,5mL de água ultra pura e fervido por 10 minutos, seguido de choque térmico por 5 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos e armazenada a -20°C.

3.4 DETECÇÃO DE B-LACTAMASES

As amostras positivas para o teste de ESBL foram caracterizadas genotipicamente pela técnica de PCR simplex, através do TopTaq® Master Mix Kit (QIAGEN®), sob as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos seguido por 30 ciclos de 94°C por 40 segundos para total desnaturação, 60°C por 40 segundos para hibridização e 72°C por 1 minuto para extensão. Por fim, um alongamento final de 72°C por 6 minutos para os genes *bla*_{CTX-M1}, *bla*_{CTX-M2}, *bla*_{CTX-M8/25}, e *bla*_{CTX-M9} (DALLENNE et al., 2010). A PCR para a pesquisa do gene *bla*_{CTX-M15} foi realizada de acordo com Leflon-Guibout et al. (2004). A reação foi submetida a 30 ciclos de 94°C por 7 minutos, 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 6 minutos.

Os iniciadores utilizados estão descritos na **Tabela 1**.

3.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

A identificação genotípica dos fatores de virulência foi realizada por método de PCR. Foram avaliados os 22 principais fatores de virulência em ExPEC, sendo eles: hemolisina (*hlyA* e *hlyF*), fator citotóxico necrotizante (*cnf1* e *cnf2*), colicina V (*cvaC*), aerobactina (*iutA*), yersiniobactina (*fyuA*), salmoquelina (*iroN*), fimbria tipo 1 (*fimH*), fimbria P (*papC* e *papG*), fimbria sfa (*sfaA* e *sfaS*), fimbria Afa (*afa*), resistência sérica (*iss* e *traT*), invasão do endotélio microvascular do cérebro (*ibeA*), cápsula polissacáridica (*kpsMT* K1, *KpsMT* K5, *KpsMT* II, *KpsMT* III) e proteína de membrana externa (*ompT*) e os iniciadores utilizados para a amplificação de DNA estão na **Tabela 2**.

As reações foram realizadas de acordo com Johnson; Stell, 2000 e Koga et al., 2015)

3.6 ILHAS DE PATOGENICIDADE

Oito ilhas de patogenicidade descritas em UPEC foram pesquisadas (**Tabela 3**), como descrito por Sabaté et al., 2006

A reação foi realizada com um volume total de 12,5µL contendo 1,5µL do DNA da amostra, 0,5 µL (20 pmol/uL) de cada iniciador, 0,25µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 6,25 de mix (tampão 2X, 2,5mM de MgCl₂ e 0,2 mM de cada dNTP) e água ultrapura para completar o volume.

O material foi submetido a um ciclo de 94°C por 5 minutos e 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C (SABATÉ et al., 2006).

Para as reações, *E. coli* J96 foi utilizada como controle positivo água ultrapura como controle negativo.

3.7 CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA

Os isolados de *E. coli* foram classificados em sete diferentes grupos filogenéticos pelo método de PCR, baseado na presença dos genes *chuA* e *yjaA*, *arpA*, *trpA* e um fragmento de DNA (TSPE4.C2). Os grupos são: A, B1, B2, C, D, E, F e clado I.

Para a reação foram utilizados 1,25µL (2x) de tampão – 0,5mM de dNTP, 0,5µL de cada iniciador; 0,25µL de taq polimerase (5U) e 2,5 µL de DNA, completando um volume final de 12,5µL com água ultrapura para cada amostra.

As reações foram submetidas a um ciclo de 94°C por 4 minutos e 30 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 57°C (Grupo E) ou 59°C (quadruplex e grupo C), 25 segundos a 72°C e uma extensão final de 5 minutos a 72°C (CLERMONT et al., 2013).

A classificação foi realizada inicialmente a partir da presença ou ausência dos genes *arpA/chuA/yjaA/TspE4.C2*, por PCR quadruplex.

Posteriormente, testes adicionais foram necessários para diferenciar as amostras em grupo C, E ou Clado I.

Os iniciadores utilizados estão descritos na **Tabela 4**.

3.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos das reações de PCR *simplex* e *multiplex* foram analisados em gel de agarose a 1,0% em solução de Tris/Borato/EDTA (TBE) 1x.

Foram adicionados 4µL de tampão às amostras para aplicação no gel de agarose e para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen®).

As corridas de eletroforese foram realizadas a 80 volts, por 50 minutos.

Após a corrida, os géis foram adicionados a uma solução de brometo de etídio (0,08 µL/100 mL) por 15 minutos e visualizados em um revelador de luz ultravioleta.

Tabela 1. Genes codificadores de enzimas ESBL-CTXM

Enzimas	Gene	Sequências (5'–3')	Pb	Referências
CTX-M-1	<i>bla</i> _{CTX-M1}	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	688	Dallene et al., 2010
CTX-M-2	<i>bla</i> _{CTX-M2}	CGTTAACGGCACGATGAC CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	404	Dallene et al., 2010
CTX-M-8/25	<i>bla</i> _{CTX-M8}	AACRCRCAGACGCTCTAC TCGAGCCGGAASGTGYAT	326	Dallene et al., 2010

CTX-M-9	<i>bla</i> _{CTX-M9}	TCAAGCCTGCCGATCTGGT TGATTCTCGCCGCTGAAG	561	Dallene et al., 2010
CTX-M-15	<i>bla</i> _{CTX-M15}	ATA AAA CCG GCA GCG GTG GAA TTT TGA CGA TCG GGG	483	Leflon-Guibout et al., 2004

Tabela 2. Genes codificadores de fatores de virulência.

Genes	Sequências (5'–3')	Fatores de virulência codificados	Pb	Referências
<i>kpsMT II</i>	GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAC CA	Group 2 of capsular antigens	272	Johnson and Stell, 2000
<i>KpsMT III</i>	TCC TCTT GCT ACT ATT CCC CCT AGG CGT ATC CAT CCC TCC TAA C	Group 3 of capsular antigens	392	Johnson and Stell, 2000
<i>KpsMT k1</i>	TAG CAA ACG TTC TAT TGG TGC CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAC CA	K1 capsule	153	Johnson and Stell, 2000
<i>kpsMT k5</i>	CAG TAT CAG CAA TCG TTC TGT A CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAC CA	K5 capsule	159	Johnson and Stell, 2000b
<i>cvaC</i>	CAC ACA CAA ACG GGA GCT GTT CTT CCC GCA GCA TAG TTC CAT	Colicin V	680	Johnson and Stell, 2000
<i>iutA</i>	GGC TGG ACA TCA TGG GAA CTG G CGT CGG GAA CGG GTA GAA TCG	Aerobactin siderophore receptor	300	Johnson and Stell, 2000
<i>fimH</i>	TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG GCA GTC ACC TGC CC TCC GGT A	Fimbriae type 1	508	Johnson and Stell, 2000
<i>fyuA</i>	TGA TTA ACC CCG CGA CGG AA CGC AGT AGG CAC GAT CTT GTA	Yersiniobactin siderophore receptor	880	Johnson and Stell, 2000
<i>papC</i>	GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G ATA TCC TTT CTG CAG GCA GGG TGT GGC	P Fimbriae	328	Johnson and Stell, 2000
<i>papG</i>	CTG TAA TTA CGG AAG TGA TTT CTG CTG TAA TTA CGG AAG TGA TTT CTG	P Fimbriae	1.070	Johnson and Stell, 2000
<i>sfaA</i>	CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A	Sfa fimbriae	410	Johnson and Stell, 2000
<i>sfaS</i>	GTG GAT ACG ACG ATT ACT GTG CCG CCA GCA TTC CCT GTA TTC	Sfa fimbriae	240	Johnson and Stell, 2000
<i>afa</i>	GGC AGA GGG CCG GCA ACA GGC CCC GTA ACG CGA CAG CAT CTC	Afa fimbriae	750	Johnson and Stell, 2000

<i>ibeA</i>	AGG CAG GTG TGC GCC GCG TAC TGG TGC TCC GGC AAA CCA TGC	Invasion of brain endothelium	170	Johnson and Stell, 2000
<i>Hly</i>	AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC	Hemolysin	1.177	Johnson and Stell, 2000
<i>cnf1</i>	AGG AAG TTA TAT TTC CGT AGG GTA TTT GCC TGA ACC GTA A	Cytotoxic necrotizing factor 1	498	Johnson and Stell, 2000
<i>cnf2</i>	AAT CTA ATT AAA GAG AAC CAT GCT TTG TAT ATC TA	Cytotoxic necrotizing factor 2	543	Johnson and Stell, 2000
<i>traT</i>	GGT GTG GTG CGA TGA GCA CAG GGT GTG GTG CGA TGA GAC CAG	Serum resistance	290	Johnson and Stell, 2000
<i>iroN</i>	AAT CCG GCA AAG AGA CGA ACC GCC T GTT CGG GCA ACC CCT GCT TTG ACT TT	Salmocheilin siderophore receptor	553	Johnson and Stell, 2000
<i>ompT</i>	TCA TCC CGG AAG CCT CCC TCA CTA CTA T TAG CGT TTG CTG CAC TGG CTT CTG ATA C	Episomal outer membrane protease	496	Johnson and Stell, 2000
<i>hlyF</i>	GGC CAC AGT CGT TTA GGG TGC TTA CC GGC GGT TTA GGC ATT CCG ATA CTC AG	Putative avian hemolysin	450	Johnson and Stell, 2000
<i>Iss</i>	CAG CAA CCC GAA CCA CTT GAT G AGC ATT GCC AGA GCG GCA GAA	Episomal increased serum survival	323	Johnson and Stell, 2000

Tabela 3. Genes codificadores de Ilhas de patogenicidade.

Ilhas de Patogenicidade	Primers	Sequências (5'-3')	Pb	Referências
PAI I₅₃₆	I.9	TAA TGC CGG AGA TTC ATT GTC	1.800	Koga et al., 2014
	I.10	AGG ATT TGT CTC AGG GCT TT		
PAI II₅₃₆	orf1up	CAT GTC CAA AGC TCG AGC C	1.000	Sabaté et al., 2006
	orf1down	CTA CGT CAG GCT GGC TTT G		
PAI III₅₃₆	sfaAI.1	CGG GCA TGC ATC AAT TAT CTT TG	161	Sabaté et al., 2006
	sfaAI.2	TGT GTA GAT GCA GTC ACT CCG		
PAI IV₅₃₆	IRP2 FP	AAG GAT TCG CTG TTA CCG GAC	300	Sabaté et al., 2006
	IRP2 RP	TCG GGC AGC GTT TCT TCT		
PAI IcFT073	RPAi	GGA CAT CCT GTT ACA GCG CGC A	930	Sabaté et al., 2006
	RPAf	TCG CCA ATC ACA GC GAA C		
PAI IIcFT073	cft073.2Ent1	ATG GAT GTT GTA TCG CGC	400	Sabaté et al., 2006
	cft073.2Ent2	ACG AGC ATG TGG ATC TGC		
PAI I_{J96}	papGlf	TCG TGC TCA GGT CCG GAA TTT	400	Sabaté et al., 2006
	papGlr	TGG CAT CCC ACA TTA TCG		
PAI II_{J96}	hlyd	GGA TCC ATG AAA ACA TGG TTA ATG GG	2.300	Sabaté et al., 2006

cnf GAT ATT TTT GTT GCC ATT GGT TAC C

Tabela 4. Genes utilizados para a classificação filogenética.

PCR	Genes	Sequências (5'-3')	Pb	Referências
Multiplex	<i>chuA</i>	GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT	279	Clermont et al., 2013
		TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA		
	<i>yjaA</i>	TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG	211	
		ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC		
	TSPE4.C2	GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA	152	
		CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG		
Grupo E	<i>arpA</i>	GAT TCC ATC TTG TCA AAA TAT GCC	219	Clermont et al., 2013
		GAA AAG AAA AAG AAT TCC CAA GAG		
Grupo C	<i>trpA</i>	AGT TTT ATG CCC AGT GCG AG	489	Clermont et al., 2013
		TCT GCG CCG GTC ACG CCC		

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS – IBM Corp., Nova York, EUA), versão 20.0

Os dados categóricos foram demonstrados através de frequência e porcentagem e avaliados pelo teste exato de Fisher ou teste de qui-quadrado, conforme apropriado e o nível de significância alfa estipulado foi de 0,05.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram incluídos em dois artigos científicos

Artigo I: *Escherichia coli* from the intestinal microbiota of vegans, vegetarians and omnivorous: virulence factors, islands of pathogenicity and phylogenetic classification.

Artigo II: Characteristics of urinary tract infections caused by *Escherichia coli* isolated from community patients in Londrina, Paraná, Brazil, from June 2016 to May 2019

3.1 ARTIGO I

***Escherichia coli* from the intestinal microbiota of vegans, vegetarians and omnivorous: virulence factors, islands of pathogenicity and phylogenetic classification**

Abstract

Escherichia coli colonizes the gastrointestinal tract of humans and coexist in healthy people with mutual benefit. However, there are several pathogenic forms of *E. coli* clones that have acquired specific virulence attributes, which confers an increased ability to cause a broad spectrum of human and animal enteric diseases and extra-intestinal infections. The aim of this study is to analyze the antimicrobial resistance and the presence of virulence factors in faecal isolates of *E. coli* from the gut microbiota of omnivorous, vegetarian and vegan people. Were analyzed a control group of 60 samples of omnivorous and a study group with 41 vegetarians and 17 vegans. Both groups showed a high rate of resistance to ampicillin, Amoxicillin-clavulanic acid, Nalidixic acid and some of them were positive for ESBL test (12% of vegetarian/ vegan and 5% of omnivorous). The most predominant virulence genes among omnivorous were *fimH* (70%); *iutA* (32%); *fyuA* (32%) and *traT* (32%), while among vegetarians or vegans, the most predominant virulence genes were *traT* (62%), *kpsMT k1* (28%) and *iutA* (22%). Most of omnivorous were positive for PAI I₅₃₆ (55%), while most of vegetarians/ vegans were positive for PAI IV₅₃₆ (59%). The A phylogenetic group, a commensal non-pathogenic strain that survive in the intestinal system, were the most prevalent in both group. Some virulence factors were also found in only one of the groups, such as the island of pathogenicity PAI III₅₃₆, found in 12% (7) of the omnivorous samples, while only among vegetarians and vegans there were *kpsMT III* (15%), a polysaccharide capsule found mainly in *E. coli* isolates that cause intestinal infections. There was no advantage in having a vegetarian or vegan diet in relation to the omnivorous diet, since in both groups there was presence of virulence factors, in addition to resistance to antibiotics, especially those most commonly used to treat urinary tract infections.

Keywords: *Escherichia coli*; Virulence Factors, Pathogenic Islands; Phylogenetic Classification.

Introduction

Escherichia coli typically colonizes the gastrointestinal tract of humans within a few hours after birth and usually coexist in good health and with mutual benefit, rarely causing disease. However, it is well documented that there are several pathogenic forms of *E. coli* clones that have acquired specific virulence attributes, which confers an increased ability to cause a broad spectrum of human and animal enteric diseases and other extra-intestinal infections (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC) is typically transmitted via the faecal oral route and entering the human host from their animal reservoir can be straightforward, such as direct contact or consumption of foods made from animals, or more complicated involving not only the original animal reservoir, but other animals and environmental factors, being an important pathogen in relation to One Health (FEGAN; GOBIUS, 2013), which is defined as an integrative effort of multiple disciplines working locally, nationally, and globally to achieve optimal health through management at the interfaces of human health, animal health, environmental health and combatting antibiotic resistance (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017), since the human gut microbiota can dynamically interact with the external environment in a bidirectional manner as bacteria can move between ecosystems: from animals to humans, through manure and feces, to water and soil and return to humans and animals by food and feed (SCHJØRRING; KROGFELT, 2011).

In addition to *E. coli* in its composition, the human gut microbiota is related to different eating habits and health depends on the metabolism of this microbiota, although we are not sure yet how different lifestyles and diets that modern humans experiment can influence this composition (DE FILIPPO et al., 2010).

In order to investigate possible influences of different feedings on the composition of the gut microbiota, people from three main diets in Brazil were selected: omnivorous and vegetarians, including vegan, that is, free of any animal derived product.

The aim of this study is to analyze the antimicrobial resistance, the presence of virulence factors and phylogenetic classification in faecal isolates of *E. coli* from the gut microbiota of omnivorous, vegetarian and vegan people.

Materials and Methods

For this study, 60 samples of omnivorous were included to the control group and 41 vegetarians and 17 vegans, composing a total of 58 samples from the study group.

Inclusion criteria included following the diet for at least one semester and the exclusion criteria were have been hospitalized or have been medicated with antibiotics in the last semester, in addition to, in the group of vegetarians/vegans, having eaten any type of meat in that same period.

Each member of the groups signed an informed consent form (Annex I) and answered a sociodemographic questionnaire (Annex II) with personal information and lifestyle about the participants.

The study was approved by the Ethics and Research Committee of the State University of Londrina CAAE 56869816.0.0000.5231.

Bacterial Isolates

Approximately 1g of stool sample from each patient was inoculated into three separate tubes, tube one containing only *E. coli* broth (EC), a second containing EC broth and 4 ug/mL of norfloxacin and a third containing EC broth and 4ug/mL of ceftriaxone, in order to select strains with greater potential for antimicrobial resistance. They were incubated at 44°C in a water bath for 24 hours and then inoculated in chromogenic agar (Becton Dickinson GmbH) and McConkey agar and kept at 37°C for 24 hours.

Suggestive colonies of *E. coli* were identified by the VITEK® 2 system (bioMérieux, France) and kept in nutrient agar (room temperature) and in Tryptic Soy Broth with 15% glycerol (-20°C), until the tests were performed.

Antimicrobial Susceptibility

Antibiograms were performed using diffusion disc method on Mueller-Hinton agar and the interpretation was performed according to the CLSI 2019 (Clinical and Laboratory Standards institute, 2019) criteria.

In addition, the disc approximation method was also performed to detect ESBL on Mueller-Hinton agar, using amoxicillin/clavulanic acid , ceftazidime, aztreonam, ceftriaxone and cefepime.

Detection of β -lactamases

The detection of *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8/25} and *bla*_{CTX-M-9} genes was performed by simplex PCR, as described by Dallene et al. (2010). And *bla*_{CTX-M-15} according to Leflon-Guibolt et al., 2004). PCR reaction was enhanced using the TopTaq R Master Mix Kit (QIAGEN).

Genes encoding the ESBL-CTXM enzymes, oligonucleotide sequence and amplified fragment size are at table 1.

Table 1. Genes encoding ESBL-CTXM enzymes

Enzymes	Gene	Sequences (5'-3')	Bp	References
CTX-M-1	<i>bla</i> _{CTX-M1}	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	688	Dallene et al., 2010

CTX-M-2	<i>bla</i> _{CTX-M2}	CGTTAACGGCACGATGAC CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	404	Dallene et al., 2010
CTX-M-8/25	<i>bla</i> _{CTX-M8}	AACRCRCAGACGCTCTAC TCGAGCCGGAASGTGYAT	326	Dallene et al., 2010
CTX-M-9	<i>bla</i> _{CTX-M9}	TCAAGCCTGCCGATCTGGT TGATTCTCGCCGCTGAAG	561	Dallene et al., 2010
CTX-M-15	<i>bla</i> _{CTX-M15}	ATA AAA CCG GCA GCG GTG GAA TTT TGA CGA TCG GGG	483	Leflon-Guibout et al., 2004

Detection of Virulence factors

The most frequent virulence factor genes in ExPEC were selected to genotypic identification by PCR method, including haemolysins (*hlyA* and *hlyF*), cytotoxic necrotizing factors (*cnf 1* and *cnf 2*), colicin V (*cvaC*), aerobactin (*iutA*), yersiniabactin (*fyuA*), salmochelin (*iroN*), type 1 fimbrial adhesin (*fimH*), P-fimbriae (*papC* and *papG*), S-fimbrial adhesin (*sfaA* and *sfaS*), afimbrial adhesin (*afa*), serumresistance (*iss* and *traT*), brain microvascular endothelium invasion (*ibeA*), capsules (*kpsMT K1*, *kpsMT K5*, *kpsMT II*, and *kpsMT III*), and an outer membrane protein (*ompT*) and the genes encoding these virulence factors, oligonucleotide sequence and amplified fragment size are described at table 2 (JOHNSON; STELL, 2000; KOGA et al., 2015).

Table 2. Genes encoding virulence factors

Genes	Sequences (5'–3')	Virulence factors encoded	Bp	References
<i>kpsMT II</i>	GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAC CA	Group 2 of capsular antigens	272	Johnson and Stell, 2000
<i>KpsMT III</i>	TCC TCTT GCT ACT ATT CCC CCT AGG CGT ATC CAT CCC TCC TAA C	Group 3 of capsular antigens	392	Johnson and Stell, 2000
<i>KpsMT k1</i>	TAG CAA ACG TTC TAT TGG TGC CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAC CA	K1 capsule	153	Johnson and Stell, 2000
<i>kpsMT k5</i>	CAG TAT CAG CAA TCG TTC TGT A CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAC CA	K5 capsule	159	Johnson and Stell, 2000b
<i>cvaC</i>	CAC ACA CAA ACG GGA GCT GTT CTT CCC GCA GCA TAG TTC CAT	Colicin V	680	Johnson and Stell, 2000

<i>iutA</i>	GGC TGG ACA TCA TGG GAA CTG G CGT CGG GAA CGG GTA GAA TCG	Aerobactin siderophore receptor	300	Johnson and Stell, 2000
<i>fimH</i>	TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG GCA GTC ACC TGC CC TCC GGT A	Fimbriae type 1	508	Johnson and Stell, 2000
<i>fyuA</i>	TGA TTA ACC CCG CGA CGG AA CGC AGT AGG CAC GAT CTT GTA	Yersiniobactin siderophore receptor	880	Johnson and Stell, 2000
<i>papC</i>	GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G ATA TCC TTT CTG CAG GCA GGG TGT GGC	P Fimbriae	328	Johnson and Stell, 2000
<i>papG</i>	CTG TAA TTA CGG AAG TGA TTT CTG CTG TAA TTA CGG AAG TGA TTT CTG	P Fimbriae	1.070	Johnson and Stell, 2000
<i>sfaA</i>	CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A	Sfa fimbriae	410	Johnson and Stell, 2000
<i>sfaS</i>	GTG GAT ACG ACG ATT ACT GTG CCG CCA GCA TTC CCT GTA TTC	Sfa fimbriae	240	Johnson and Stell, 2000
<i>afa</i>	GGC AGA GGG CCG GCA ACA GGC CCC GTA ACG CGA CAG CAT CTC	Afa fimbriae	750	Johnson and Stell, 2000
<i>ibeA</i>	AGG CAG GTG TGC GCC GCG TAC TGG TGC TCC GGC AAA CCA TGC	Invasion of brain endothelium	170	Johnson and Stell, 2000
<i>Hly</i>	AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC	Hemolysin	1.177	Johnson and Stell, 2000
<i>cnf1</i>	AGG AAG TTA TAT TTC CGT AGG GTA TTT GCC TGA ACC GTA A	Cytotoxic necrotizing factor 1	498	Johnson and Stell, 2000
<i>cnf2</i>	AAT CTA ATT AAA GAG AAC CAT GCT TTG TAT ATC TA	Cytotoxic necrotizing factor 2	543	Johnson and Stell, 2000
<i>traT</i>	GGT GTG GTG CGA TGA GCA CAG GGT GTG GTG CGA TGA GAC CAG	Serum resistance	290	Johnson and Stell, 2000
<i>iroN</i>	AAT CCG GCA AAG AGA CGA ACC GCC T GTT CGG GCA ACC CCT GCT TTG ACT TT	Salmochelinsiderophore receptor	553	Johnson and Stell, 2000
<i>ompT</i>	TCA TCC CGG AAG CCT CCC TCA CTA CTA T TAG CGT TTG CTG CAC TGG CTT CTG ATA C	Episomal outer membrane protease	496	Johnson and Stell, 2000
<i>hlyF</i>	GGC CAC AGT CGT TTA GGG TGC TTA CC	Putative avian hemolysin	450	Johnson and Stell, 2000

	GGC GGT TTA GGC ATT CCG ATA CTC AG			
<i>Iss</i>	CAG CAA CCC GAA CCA CTT GAT G AGC ATT GCC AGA GCG GCA GAA	Episomal increased serum survival	323	Johnson and Stell, 2000

Detection of Pathogenicity Island (PAI) Markers

Sequences associated with seven different PAIs, previously characterized in uropathogenic *E. coli*, was determined (PAI I536, II536, III536, IV536, ICFT073, IICFT073, IJ96, and IIJ96) according to Sabaté et al., 2006; Koga et al., 2015 and are described at table 3.

Table 3. Genes encoding PAI markers.

PAI	Primers	Sequences (5'-3')	Bp	References
PAI I ₅₃₆	I.9	TAA TGC CGG AGA TTC ATT GTC	1.800	Koga et al., 2014
	I.10	AGG ATT TGT CTC AGG GCT TT		
PAI II ₅₃₆	orf1up	CAT GTC CAA AGC TCG AGC C	1.000	Sabaté et al., 2006
	orf1down	CTA CGT CAG GCT GGC TTT G		
PAI III ₅₃₆	sfaAI.1	CGG GCA TGC ATC AAT TAT CTT TG	161	Sabaté et al., 2006
	sfaAI.2	TGT GTA GAT GCA GTC ACT CCG		
PAI IV ₅₃₆	IRP2 FP	AAG GAT TCG CTG TTA CCG GAC	300	Sabaté et al., 2006
	IRP2 RP	TCG GGC AGC GTT TCT TCT		
PAI ICFT073	RPAi	GGA CAT CCT GTT ACA GCG CGC A	930	Sabaté et al., 2006
	RPAf	TCG CCA ATC ACA GC GAA C		
PAI IICFT073	cft073.2Ent1	ATG GAT GTT GTA TCG CGC	400	Sabaté et al., 2006
	cft073.2Ent2	ACG AGC ATG TGG ATC TGC		
PAI IJ ₉₆	papGlf	TCG TGC TCA GGT CCG GAA TTT	400	Sabaté et al., 2006
	papGlr	TGG CAT CCC ACA TTA TCG		
PAI IIJ ₉₆	hlyd	GGA TCC ATG AAA ACA TGG TTA ATG GG	2.300	Sabaté et al., 2006
	cnf	GAT ATT TTT GTT GCC ATT GGT TAC C		

Phylogenetic Classification

Seven phylogenetic groups (A, B1, B2, C, D, E, and F) were considered to classify the *E. coli* isolates, based on the presence of the genes *chuA*, *yjaA*, *arpA*, and *trpA*, and a DNA fragment (TSPE4.C2), detected by a PCR method according to Clermont et al.

Genes researched for phylogenetic classification, their respective primers and nucleotide sequence are described at table 4.

Table 4. Genes researched for phylogenetic classification.

PCR	Genes	Sequências (5'–3')	Pb	Referências
Multiplex	<i>chuA</i>	GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT	279	Clermont et al., 2013
		TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA		
	<i>yjaA</i>	TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG	211	
	TSPE4.C2	ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC	152	
		GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA		
		CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG		
Grupo E	<i>arpA</i>	GAT TCC ATC TTG TCA AAA TAT GCC	219	Clermont et al., 2013
		GAA AAG AAA AAG AAT TCC CAA GAG		
Grupo C	<i>trpA</i>	AGT TTT ATG CCC AGT GCG AG	489	Clermont et al., 2013
		TCT GCG CCG GTC ACG CCC		

Statistical Analysis

Categorical data are classified by frequencies and percentages and performed by Fisher's exact test or chi-square test, as appropriate, and the stipulated alpha significance level was 0.05.

Data analysis were performed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS - IBM Corp., New York, USA), version 20.0 for windows.

Results

Regarding sociodemographic data, in both groups, most of the participants have completed higher education, but a greater number of vegetarians/ vegans are attending higher education (39%) compared to omnivorous (16%) and they had a larger number of single people (76%) than omnivorous (58%).

Vegetarians/ vegans have adhered to this type of food throughout their lives, while omnivorous have always eaten meat and most of vegetarians/ vegans have pets at home (72%) and have not handled meat of any kind for consumption (21%), while omnivorous do not have pets (45%) and have handled it (87%).

In addition, a greater number of vegetarians and vegans do food supplementation (31%).

All sociodemographic data are shown in table 5.

Table 5. Sociodemographic and social data

	Omnivorous n=60 (%)	Vegetarians/ Vegans n=58 (%)	Total n=118 (%)	p value
Age (media)	32,4	32,5		
Gender				0,173
Female	33 (55)	39 (67)	72 (61)	
Male	27 (45)	19 (33)	46 (39)	
Occupation				0,416
Student	21 (35)	29 (50)	50 (42)	
Independent professional	33 (55)	23 (40)	56 (48)	
Freelancer		3 (5)	3 (3)	
Retired	3 (5)	2 (3)	5 (4)	
Housewife	3 (5)	1 (2)	4 (3)	
Schooling				0,017*
Complete high school	7 (12)	3 (5)	10 (9)	
Incomplete high school	6 (10)	1 (2)	7 (6)	
Attending high school / elementary school	4 (7)	1 (2)	5 (4)	
Complete higher education	29 (48)	29 (50)	58 (49)	
Incomplete higher education	4 (7)	1 (2)	5 (4)	
Studying higher education	10 (16)	23 (39)	33 (28)	
Race				0,103
Yellow	7 (12)	5 (9)	12 (10)	
White	36 (60)	46 (79)	82 (70)	
Parada	12 (20)	6 (10)	18 (15)	
Black	5 (8)	1 (2)	6 (5)	
Marital Status				0,043*
Single	35 (58)	44 (76)	79 (67)	

Married	25 (42)	14 (24)	39 (33)	
Smoker	4 (7)	10 (17)	14 (12)	0,092
Alcohol consumer	45 (75)	47 (81)	92 (78)	0,429
Have pets at home	27 (45)	42 (72)	69 (58)	0,003*
Had contact with bovine animal / swine / poultry	16 (27)	15 (26)	31 (26)	0,921
Handled beef / pork / poultry	52 (87)	12 (21)	64 (54)	<0,01*
How long have been following the diet				<0,01*
1 year or less		10 (17)	10 (9)	
1 year and 1 month to 10 years		33 (57)	33 (28)	
10 years and 1 month to 20 years		8 (14)	8 (7)	
Over 20 years	60 (100)	3 (5)	63 (53)	
All life				
Vegetarian		41 (71)		
Vegan		17 (29)		
Use of probiotics	20 (33)	15 (26)	35 (30)	0,374
Food supplementation	7 (12)	18 (31)	25 (21)	0,010*
Has chronic disease	9 (15)	9 (15)	18 (15)	0,938
Has intestinal disease	3 (5)	2 (3)	5 (4)	1,000
Had diarrhea or constipation in the last 30 days	17 (28)	22 (38)	39 (33)	0,101
Continuous medication use	26 (43)	24 (41)	50 (42)	0,830
Use of medication in the last 30 days	28 (47)	35 (60)	63 (53)	0,136
Uses non-piped water	3 (5)		3 (2)	0,122

There was no statistically significant difference about the antimicrobial resistance profile between groups, but among beta-lactams, vegetarians/vegans in general had a greater number of resistant samples than omnivorous. Both of them exhibited a high rate of resistance to ampicillin (omnivorous 80% and vegetarian/vegan 69%), Amoxicillin-clavulanic acid (omnivorous 32% and vegetarian/vegan

22%) and Nalidixic acid (omnivorous 28% and vegetarian/vegan 26%) and some of them were positive for ESBL test (12% of vegetarian/vegan and 5% of omnivorous).

The antimicrobial resistance profile is shown in figure 1.

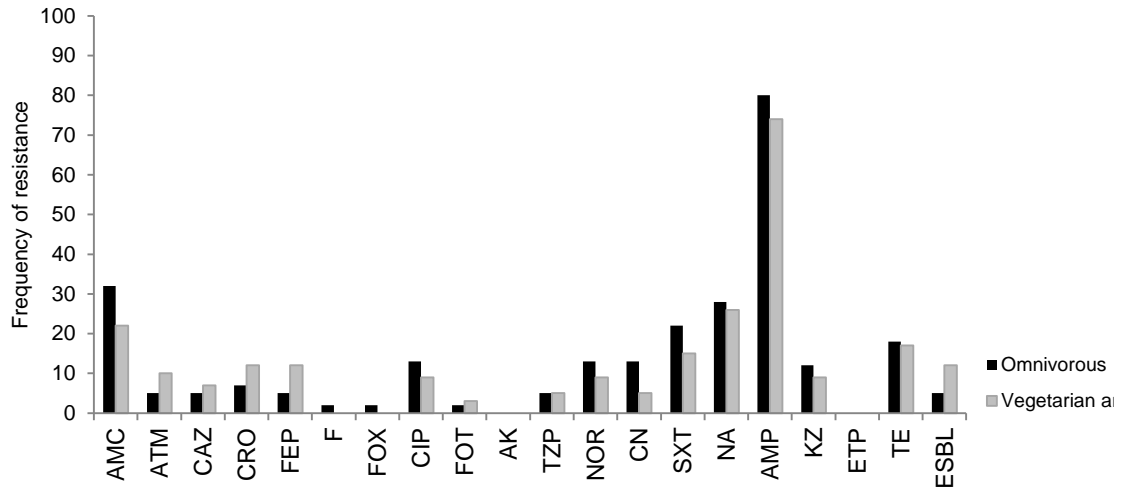


Figure 1. Frequency of resistance profile by *E. coli* strains isolated from omnivorous and vegetarians/vegan. Amoxicillin-clavulanic acid (AMC), Aztreonam (ATM), Cefazidime (CAZ), Ceftriaxone (CRO), Cefepime (FEP), Nitrofurantoin (F), Cefoxitin (FOX), Ciprofloxacin (CIP), Cefotaxime (FOT), Amikacin (AK), Piperacillin-tazobactam (TZP), Norfloxacin (NOR), Gentamicin (CN), Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), Nalidixic acid (NA), Ampicillin (AMP), Cefazolin (KZ), Ertapenem (ETP), Tetracycline (TE) and Extended Spectrum β -

Among the resistance mechanisms for ESBL, the presence of the CTX-M enzyme is one of the most common and important β -lactamases described and 70% of the analyzed samples, were positive for CTX-M-9, being the most prevalent in both groups (67% omnivorous and 71% vegetarian/vegan).

All results about the presence of CTX-M enzyme groups are shown in table 6.

Table 6. Prevalence of CTX-M enzyme groups in ESBL positive samples

Gene	Omnivorous	Vegetarian/Vegan
	n (%)	n (%)
CTX-M-1		4 (57)
CTX-M-2	1 (33)	3 (43)
CTX-M-8/25		
CTX-M-9	2 (67)	5 (71)
CTX-M-15		2 (29)
Total of samples	3	10

The most predominant virulence genes among omnivorous were *fimH*, a type I fimbriae adhesin (70%); *iutA*, an aerobactin (32%); *fyuA*, a yersiniobactin (32%) and *traT* (32%), while among vegetarians/ vegans, the most predominant virulence genes were *traT* (62%), *kpsMT k1*, a polysaccharide capsule (28%) and *iutA* (22%).

Besides that, there was a statistically significant difference about the number of positive samples for the polysaccharide capsule *kpsMT III*, with 9 vegetarians/ vegans being positive while no omnivore had shown the presence of this gene; *fimH* with 42 omnivorous positive for the presence of the gene and 7 vegetarians/ vegans; *cnf1*, a necrotizing cytotoxic factor with 4 vegetarians/ vegans and no omnivore and *traT* with 36 vegetarians/ vegans and 19 omnivorous positive for the presence of this gene.

Most of omnivorous (55%) were positive for PAI I₅₃₆ (α -hemolysin, CS12 fimbriae, and F17-like fimbriae adhesin) (SABATÉ et al., 2006; SAMEI; HAGHI; ZEIGHAMI, 2016) while most of vegetarians/ vegans (59%) were positive for PAI IV₅₃₆ (yersiniobactin siderophore system). Besides that, 7 (12%) samples of omnivorous were positive for PAI III₅₃₆ (S-fimbriae, salmochelin, HmuR-like heme receptor, Sat toxin, Tsh-like hemoglobin protease, antigen 43), while no vegetarian/ vegan was.

The A phylogenetic group, to which belong most of commensal non-pathogenic strain that survives in the gastrointestinal system, was the most prevalent in both group and there was no statistically significant difference between them.

All of these data are shown in table 7.

Table 7. Phylogenetic classification and prevalence of virulence factors and islands of pathogenicity

Virulence factors encoded	Genes	Omnivorous n=60 (%)	Vegetarians/ Vegans n=58 (%)	<i>p</i> -value
Group 2 of capsular antigens	<i>kpsMT II</i>	15 (25)	10 (17)	0,349
Group 3 of capsular antigens	<i>kpsMT III</i>	0	9 (15)	0,001*
K1 capsule	<i>kpsMT k1</i>	9 (15)	16 (28)	0,078
K5 capsule	<i>kpsMT k5</i>	14 (23)	8 (14)	0,214
Colicin V	<i>cvaC</i>	3 (5)	7 (12)	0,152
Aerobactin siderophore receptor	<i>iutA</i>	19 (32)	13 (22)	0,308
Fimbriae type 1	<i>fimH</i>	42 (70)	7 (12)	<0,001*

Yersiniobactin siderophore receptor	<i>fyuA</i>	19 (32)	11 (19)	0,206
P Fimbriae	<i>papC</i>	7 (12)	7 (12)	0,894
P Fimbriae	<i>papG</i>	2 (3)	2 (3)	0,946
Sfa fimbriae	<i>sfaA</i>	6 (10)	4 (7)	0,582
Sfa fimbriae	<i>sfaS</i>	4 (7)	2 (3)	0,451
Afa fimbriae	<i>afa</i>	2 (3)	2 (3)	0,946
Invasion of brain endothelium	<i>ibeA</i>	5 (8)	3 (5)	0,526
Hemolysin	<i>hly</i>	4 (7)	8 (14)	0,180
Cytotoxic necrotizing factor 1	<i>cnf1</i>	0	4 (7)	0,035*
Cytotoxic necrotizing factor 2	<i>cnf2</i>	3 (5)	4 (7)	0,631
Serum resistance	<i>traT</i>	19 (32)	36 (62)	0,001*
Salmochelinsiderophore receptor	<i>iroN</i>	8 (13)	9 (15)	0,682
Episomal outer membrane protease	<i>ompT</i>	4 (7)	9 (15)	0,110
Putative avian hemolysin	<i>hlyF</i>	2 (3)	6 (10)	0,118
Episomal increased serum survival	<i>Iss</i>	12 (20)	3 (5)	0,019*
PAI				
	PAI I ₅₃₆	33 (55)	7 (12)	<0,001*
	PAI II ₅₃₆	0	0	
	PAI III ₅₃₆	7 (12)	0	0,008*
	PAI IV ₅₃₆	23 (38)	34 (59)	0,018*
	PAI I _{CFT073}	6 (10)	8 (14)	0,483
	PAI II _{CFT073}	11 (18)	9 (15)	0,744
	PAI I _{J96}	0	3 (5)	0,070
	PAI II _{J96}	3 (5)	0	0,090
Phylogenetic classification				

A	15 (25)	13 (22)	0,818
B1	8 (13)	10 (17)	0,506
B2	4 (7)	11 (19)	0,079
C	2 (3)	2 (3)	0,703
D	12 (20)	8 (14)	0,414
E	9 (15)	10 (17)	0,506
F	10 (17)	4 (7)	0,073

Discussion and Conclusion

This study evaluated the difference about virulence and antibiotic resistance in *E. coli* from the composition of the gut microbiota of individuals following vegan or vegetarian diets and those who follow omnivorous diets. Both groups, vegetarians/vegans and omnivorous had positives samples for the ESBL presence and exhibited a high rate of resistance to first choice antimicrobials used in the treatment of UTIs.

In both groups, the majority of ESBL positive samples were positive for CTX-M-9 (2 samples among omnivorous and 5 among vegetarians/vegans). Presently, CTX-M- β -lactamases include more than 220 different enzymes clustered into five subfamilies based on their amino acid identities that include the CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, and CTX-M-25 subfamilies and enzymes that originated from subfamilies CTXM-1 and CTX-M-9 are widely distributed and commonly reported in extraintestinal infections (NAAS et al., 2019).

We come into contact with antibiotic treatments many times in our lives and during these process, all bacteria in the human or animal body are exposed to selective pressure of the antibiotics. Consequently, the gastrointestinal tract is highly exposed, especially during oral therapy and this results in a natural selection of resistant strains carrying an important genetic pool that might be capable of transferring their antibiotic resistance genes to other strains present in the human intestine. Moreover, food contaminants, such as organic fertilizers, that originate from animals and are consumed by humans, can also act as a gene pool (donors) of antibiotic resistance genes (SCHJØRRING; KROGFELT, 2011).

In agriculture, organic fertilizers, such as manure from chicken farming, are conventionally used to increase crop yield, because it is believed to be more effective than inorganic fertilizers. However, because of the indiscriminated use of the antibiotics and the high spread of antibiotic resistance genes (ARGs), manure can have microorganisms containing these ARGs, that can rapidly spread and be an important food contaminant, that poses higher risks to human health (SUN et al., 2019). Animal manure is an important reservoir of antibiotic residues and ARGs, besides human pathogenic bacteria (YANG, 2016). Perhaps for this reason, a

greater number of ESBL positive samples was found among vegetarians and vegans (10) than among omnivorous (3).

Besides that, after the first cases of antibiotic resistant bacterial diseases in humans, recommendations were made for banning the use of antibiotics as growth promoters if the same drugs are also prescribed for use in human medicine (YANG et al., 2019), but recently, were estimated that approximately 3,345,022 kg of antimicrobials were sold and used in the U.S. poultry industry in 2016; with 1,265,420 kg being “medically important” in human medical therapy (Food and Drug Administration [FDA], 2017). Because of this, there is growing interest in sustainable food production and research is currently being conducted to identify antibiotic alternatives that could support healthy growth and provide defense against pathogenic microbes (SNEERINGER et al., 2015).

Most of *E. coli* isolates in both groups belong to phylogenetic group A, a group to which commensal *E. coli* belong, without pathogenic characteristics and which are present mainly in the mucosa of the gastrointestinal system. The second phylogenetic group most found among vegetarians and vegans was B2, and among omnivorous was D, both of which are often related to extra-intestinal infections, according to Sarowska et. al (2019). These results are in agreement with previous studies, which show that despite being pathogenic, the phylogenetic group B2 has a high prevalence ($\geq 25\%$) in fecal *E. coli* (NOWROUZIAN et al., 2003) human intestinal microbiota.

Interestingly, the groups showed significant differences related to the presence of virulence factors. Among omnivorous, 70% (42) of the samples had *fimH* adhesin, responsible for supporting the binding of bacteria to specific host cells in structural or functional molecules associated with the cell membrane (KLINE et al., 2009), while 62% (36) of vegetarians and vegans presented *traT* outer membrane lipoprotein, present in conjugative plasmids, what favor its transmission and is associated with and increased serum resistance, seen mainly in ExPEC present in the bloodstream (JOHNSON, 1991; (MIAJLOVIC; SMITH, 2014) and according to (Lee et al., (2018), among commensal strains, *traT* is a good predictor for urinary tract and bloodstream infections. The fimbriae play a significant role in the process of adhesion of the microorganism to the cells, increasing the virulence of pathogenic *E. coli* by having this close contact of the bacteria with the host cell wall. Most genes that determine the presence of fimbriae on the surface of bacterial cells are chromosomally encoded or plasmid, which facilitates their horizontal transmission between different microorganisms (SAROWSKA et al., 2019).

Besides that, PAI I₅₃₆ was the most found island of pathogenicity among omnivorous, with 55% (33) of the samples, while a minority, 12% (7) of vegetarians and vegans presented it and presented in most of them, PAI IV₅₃₆ with 59% (36) samples against 38% (23) samples among omnivorous. This island, responsible for coding the *fyuA* gene for the yersiniabactin iron absorption system, according to a study by Starcic and Zgur-Bertok (2015), is present in up to 57% of commensal strains of *E. coli* and also is the most frequent between enterobacterias.

Some virulence factors were also found in only one of the groups, such as the island of pathogenicity PAI III₅₃₆, found in 12% (7) of the omnivorous samples, while only among vegetarians and vegans there were *kpsMT* III, a polysaccharide capsule found mainly in *E. coli* isolates that cause intestinal infections, including ETEC and EHEC (WHITFIELD, 2009), present in 15% (9) of the samples and *cnf1*, a necrotizing cytotoxic factor capable of facilitating bacterial internalization in host cells and contributing to the potential for invasion of pathogenic *E. coli* by manipulating epithelial and endothelial barriers (KNUST; SCHMIDT, 2010), often associated with extraintestinal conditions, especially urinary tract infections, present in around 40% of UPEC isolates, and less frequently in bacteremia and neonatal meningitis (WANG; KIM, 2013), in 7% (4) of these samples.

A study by CHEN et al., 2020 shows that vegetarian diets (compared to a non-vegetarian diet) is associated with a lower risk of UTI, especially in women, non-smokers and for the uncomplicated UTI subtype. In addition, other previous research has suggested that meat-related food-based ExPECs may be the main pathogens in uncomplicated UTIs. However, despite the differences found between omnivorous and vegans/ vegetarians, these are not enough to conclude that one diet is better than the other, since the composition of these diets in terms of nutrients does not seem to be sufficient for them to shape the intestinal microbiota.

The present study also shows that even commensal strains of *E. coli* isolated from the feces of healthy individuals, have great potential to cause extraintestinal infections. This is due not only to the high prevalence of virulence genes among these strains, but also to the possible presence of mobile genetic elements capable of directly influencing the genomes of pathogenic bacteria and the horizontal transfer of resistance genes, which can spread rapidly among non-pathogenic strains, transforming them into potential pathogens that can cause UTIs and several other extraintestinal infections.

References

- CHEN, Y. C. et al. The risk of urinary tract infection in vegetarians and non-vegetarians: a prospective study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.
- DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14691–14696, 2010.
- FEGAN, N.; GOBIUS, K. S. Pathogenic Escherichia coli and One Health Implications. n. August 2012, p. 49–62, 2013.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.
- KLINE, K. A. et al. Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. **Cell Host and Microbe**, v. 5, n. 6, p. 580–592, 2009.

- LEFLON-GUIBOUT, V. et al. Emergence and spread, of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3736–3742, 2004.
- NAAS, T. et al. Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 0, n. 0, p. 917–919, 2017.
- NOWROUZIAN, F. et al. *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: Colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. **Pediatric Research**, v. 54, n. 1, p. 8–14, 2003.
- POIREL, L.; GNIADKOWSKI, M.; NORDMANN, P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. p. 1031–1034, 2002.
- SABATÉ, M. et al. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 9, p. 880–886, 2006.
- SAMEI, A.; HAGHI, F.; ZEIGHAMI, H. Distribution of pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Folia Microbiologica**, v. 61, n. 3, p. 261–268, 2016.
- SCHJØRRING, S.; KROGFELT, K. A. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. **International Journal of Microbiology**, v. 2011, 2011.
- SNEERINGER, S. et al. Economics of Antibiotic Use in U . S . Livestock Production. n. 200, 2015.
- WANG, M. H.; KIM, K. S. Cytotoxic necrotizing factor 1 contributes to *Escherichia coli* meningitis. **Toxins**, v. 5, n. 11, p. 2270–2280, 2013.
- WHITFIELD, C. Structure and Assembly of *Escherichia coli* Capsules. **EcoSal Plus**, v. 3, n. 2, 2009.
- YANG, Q. et al. Influence of chicken manure fertilization on antibiotic-resistant bacteria in soil and the endophytic bacteria of pakchoi. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 7, p. 1–12, 2016.
- YANG, Y. et al. Review of Antibiotic Resistance , Ecology , Dissemination , and Mitigation in U . S . Broiler Poultry Systems. v. 10, n. November, p. 1–10, 2019.

3.2 ARTIGO II

Characteristics of urinary tract infections caused by *Escherichia coli* isolated from community patients in Londrina, Paraná, Brazil, from June 2016 to May 2019

Abstract

Uropathogenic *E. coli* (UPEC) group, classified as Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) causes around 90% of community-acquired urinary tract infections (UTIs) and these strains have increased its level of antimicrobial resistance to frontline antibiotics because of the indiscriminate use of antimicrobials that exert a variety of selective pressure on pathogens and because *Enterobacteriaceae* can have plasmids capable of be transferred between strains, even between species and these are able to carry genes that allows the resistance to most of antibiotics. The most common resistance mechanism among *Enterobacteriaceae* is ESBL. the aim of this study is to make a survey that allows to trace the epidemiological profile over the studied period in relation to the community UTI at Londrina city, Paraná, Brazil. A total of 22.810 samples from community patients from June 2016 to May 2019 from basic health units and emergency units were analyzed and although UTIs occur in both genders and in all age groups its incidence is higher in women (91.9%) and increases with age, as we noticed the mean age among patients with ESBL-positive samples was 64 years old. These could possible be factors for a higher rate of infections caused by resistant microorganisms and the worsening of the development of the infection, mainly due to the increased exposure to the use of antibiotics, since ESBL producing *Enterobacteriaceae* are frequently resistant to most of oral antibiotics used in the UTIs treatment, such trimethoprim, quinolones, cephalosporins and penicillins, and there was a greater number of isolates resistant to both first and second choice drugs used in the treatments of UTIs among ESBL positive patients. Because of this, it is necessary to know the profile of the main microorganisms and the local population, as different locations have particular characteristics that can directly influence the clinical and epidemiological conditions. For this, the availability of comprehensive digital-data infrastructures can offer new opportunities to investigate the development of antimicrobial resistance spread. Antimicrobial resistance surveillance is necessary to determine the problem and to guide empirical selection of antimicrobial agents for UTIs treatment.

Keywords: Uropathogenic *E. coli* (UPEC), urinary tract infections, extended-spectrum β -lactamases

Introduction

Urinary tract infections (UTI) are the second most common bacterial infections, and its main etiological agent is *Escherichia coli* (*E. coli*), that accounts for up to 80% of outpatient setting uncomplicated UTIs (KANG et al., 2018), which generates a cost of more than 6 billion dollars worldwide (RAJA, 2019).

Uropathogenic *E. coli* (UPEC) group, classified as Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) causes around 90% of community-acquired UTIs and these strains have increased its level of antimicrobial resistance to frontline antibiotics such as trimethoprim-sulfamethoxazole and ciprofloxacin (ALQASIM; ABU JAFFAL; ALYOUSEF, 2018). This happens because the indiscriminate use of antimicrobials exert a variety of selective pressure on pathogens (RAJA,2019). Besides that, *Enterobacteriaceae* can have plasmids capable of be transferred between strains, even between species and these are able to carry genes that allows the resistance to most of antibiotics (LEE et al., 2018).

The most common resistance mechanism among *Enterobacteriaceae* is extended-spectrum β -lactamases (ESBL), a group of enzymes that hydrolyzes the β -lactam presente in the antibiotic, turning them ineffective and providing resistance against a several antibiotics from β -lactams-group (KUSTER et al., 2010). The increasing of such isolates have serious consequences for patient outcome, associated with high rates of morbidity and mortality, longer hospital stay and chances of developing other health problems, besides the higher health care costs compared with infections caused by *E. coli* that are not ESBL producers (ROTTIER; AMMERLAAN; BONTEN, 2012).

The knowledge about the local prevalence of ESBL producing *Enterobacteriaceae*, such as *E. coli*, the most common among them, responsible mainly for causing UTIs and their antibiotic susceptibility profile may help to select effective antimicrobial treatments (GUPTA et al., 2011) .

Because of the importance to view the epidemiological and sociodemographic data of community patients with urinary tract infection, to create and manage actions capable of controlling and reducing the spread of resistance mechanisms commonly found in multidrug-resistant enterobacteria (MDR), the aim of this study is to make a survey that allows to trace the epidemiological profile over the studied period in relation to the community UTI at Londrina city, Paraná, Brazil.

Materials and Methods

During June 2016 to May 2019, 195.080 urine cultures were performed by public health services, in a city in southern Brazil. Urocultures were performed at Central Laboratory of Londrina city (CentroLab), plating 10 μ l of urine samples into chromogenic agar, (chromID® CPS® agar, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). *E. coli* strains were identified using Gram negative panel and their susceptibility was tested according to a breakpoint method using AST238 panel by Vitek® 2 automated

system by Biomérieux (Marcyl'Etoile, France). Antimicrobial susceptibility profile was analyzed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019

Were excluded from this study, patients with incomplete data about antibiogram or microorganism identification on the system and patients with repeated tests within six months, with the same susceptibility profile.

This study was approved by the Ethics and Research Committee of the State University of Londrina CAAE 56869816.0.0000.5231 and authorized by the Health Department of Londrina city, Paraná.

Demographic Data Analysis

Demographic data including age, gender, pregnancy and basic health units were collected from WebSaúde system, a Londrina city hall interfacing system, which contains sociodemographic and epidemiological data from all basic health units in Londrina city.

Statistical Analysis

Statistical analysis and graphical representation were performed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS - IBM Corp., New York, USA), version 20 for Windows. Categorical data were shown by frequency and percentage and the analysis was performed by Chi-square test or Fischer's exact test as needed. Alpha significance level was 0.05.

Results and Discussion

A total of 34.293 were positive for gram-positive or gram-negative microorganisms; of these 22.810 (66,2%) were *E. coli* strains and a total of 2.033 (6,2%) ESBL producing bacteria, being 1.480 (61,2%) ESBL production *E. coli*. Among the 22,810 samples analyzed, 91.9% (20.965) belong to women while 8.1% (1,845) to men. Of these, 6.5% (1,489) tested positive for the presence of ESBL, 85% (1,258) for females and 15% (222) for males, a statistically significant difference ($p < 0.01$).

Although it is a disease that affects both men and women, UTIs are traditionally associated to women, among whom 50% will be affected across their lives and around 25% of women presenting with a first episode of bacterial cystitis go on to suffer recurrent UTI within 6 months, having until 6 or more infections in the year following the initial episode. This higher prevalence of UTI in females is attributed to anatomic factors, such as shorter urethral length and distance from the anus to urethral meatus in women, and permissiveness of the vaginal and perineal environments to microbial colonization (MCLELLAN; HUNSTAD, 2016). Besides that, how the most common therapeutic approach to UTI is the use of antibiotics and women with recurrent UTI often require multiple antibiotic regimens within short

periods of time, this use of antibiotics increases women's risk of developing antibiotic resistance (FU et al., 2017).

Recent data have demonstrated marked increases in bacterial resistance to first line antibiotics used to treat UTI in ambulatory settings (TALAN et al., 2008). Resistance has been associated with increased microbiologic and clinical failure (ANESI et al., 2016). Nonadherence to guidelines for UTI treatment can result in decreased effectiveness of antibiotic (due to development of resistance) and increased health care costs (CHU; LOWDER, 2018). For treatment of acute, uncomplicated UTI, first-line antibiotics include nitrofurantoin, trimethoprim-sulfamethoxazole and fosfomycin trometamol. These have low collateral damage (selection for drug-resistant organisms), high efficacy, and good resistance profiles. Because of higher resistance in certain populations, trimethoprim-sulfamethoxazole is only used as a first line drug if local resistance rates are not >20% (GUPTA et al., 2011; CHU; LOWDER, 2018). In this study, cephalotin and trimethoprim-sulfamethoxazole, even in the non-ESBL group, showed more than 20% of resistant samples and is not advisable for empirical treatment of UTIs.

While *E. coli* producing ESBL infections in health care settings have been highlighted as an important issue for many years, the emergence of *E. coli* producing ESBL infections in the community has only recently been recognized. Since its initial description, the incidence of community-onset *E. coli* producing ESBL infections has increased significantly (ANESI et al., 2016). One study performed in Switzerland reported an increase in *E. coli* producing ESBL prevalence among outpatients from 0.9% in 2004 to 5.3% in 2011 (KRONENBERG et al., 2013)

In this study 20,965 female patients, 1,853 (8.8%) were pregnant and of these, 80 (4.3%) tested positive for the presence of ESBL, while among the 19,112 (91.2%) non-pregnant women, the number of positive ESBL was 1,178 (6.2%) samples, a statistically relevant result, with a p-value <0.01.

In pregnancy, bacteriuria can even lead to complications such as pyelonephritis, urosepsis, and increased risk of preterm birth (CHU; LOWDER, 2018). One possible explanation for this is that although it is less common, some UTIs can get worse when associated with a structural or functional abnormality (urinary obstruction, neurologic disease, immunosuppression, renal dysfunction, or catheterization), as well as those that occur in women during pregnancy (FU et al., 2017).

The mean age among patients with ESBL-positive samples was 64,00 (40,00-76,00), higher than patients with ESBL-negative samples, that was 50,00 (29,00-68,00). Besides that, 37,5% (8,553) of the total patients were over 61 years old, and both groups in the range of 61-75 and >75 years old have greater positivity for ESBL, with 55,4% (820) of the total of patients with positive samples. It was also possible to notice that the number of positive samples for ESBL in this study increased according to the age of the patients.

A possible connection between older women and the increase in cases of UTIs is that in premenopausal women, vaginal flora is predominated by lactobacilli, responsible for the relatively acidic pH of the vagina, while this acidic environment is lost in postmenopausal women, generating a loss of estrogen and enabling in the

increased colonization and infection by *E. coli* and *Enterococcus* species (DETWEILER; MAYERS; FLETCHER, 2015).

In older men, a risk factor for UTIs is the benign prostatic hypertrophy (DETWEILER; MAYERS; FLETCHER, 2015). It can cause urethral obstruction and turbulent urine flow, which facilitates ascension of organisms into the bladder, being a source for recurring cystitis or febrile urinary infection for some men. Among healthy men younger than 60 years old, asymptomatic bacteriuria is unusual, but between men older than 80 years, 5% to 10% have bacteriuria, turning complicated in patients with functional or structural abnormalities of the genitourinary tract (NICOLLE, 2016).

Elderly people with genitourinary abnormalities that impair voiding, that can even lead to urinary incontinence, have an increased frequency of UTIs and bacterial strains isolated from older subjects may have an increased frequency of resistance relative to younger populations because of repeated prior antimicrobial courses and health care exposures, including urologic interventions in subjects with complicated infection (NICOLLE, 2016).

All the data above are shown in table 1.

The patients were divided into six different regions of Londrina (Appendix 1) and there was no statistically significant difference related to the presence of ESBL between them as shown in table 1.

Table 2 shows that there was a greater number of isolates resistant to both first and second choice drugs used in the treatments of UTIs among ESBL positive patients, capable of hydrolyzing the rings present in β -lactam drugs, thus conferring resistance to antimicrobials such as penicillins, cephalosporins and aztreonam.

ESBL producing Enterobacteriaceae are frequently resistant to most of oral antibiotics used in the UTIs treatment, such trimethoprim, quinolones, cephalosporins and penicillins, so we are living an urgent need for discovery of new antimicrobials and because of this, the rediscovery of forgotten antibiotics such as fosfomicin, a bactericidal antimicrobial agent which has a good activity against Gram positive and negative organisms and nitrofurantoin, that has being used for the last 50 years to treat UTIs, are being helpful until the emergence of new antimicrobial agents (RAJA, 2019).

The increased resistance of microorganisms that cause UTIs is associated with increased mortality, morbidity, health costs, and there is often a need for the introduction of broad-spectrum antimicrobials (KOKSAL et al., 2019).

Table 1. Sociodemographic data of patients with urinary *E. coli* isolates according to the presence of ESBL at Londrina city, Paraná, Brazil, from June 2016 to May 2019.

	ESBL		p
	Susceptible (n=21330)	Resistant (n=1480)	
Age (average in years)	50,00 (29,00-68,00)	64,00 (40,00-	<0.001

				76,00)		
Age (age range)	0-15	1677	7,9%	70	4,7%	<0.001
	16-30	4003	18,8%	178	12,0%	
	31-45	3652	17,1%	190	12,8%	
	46-60	4265	20,0%	222	15,0%	
	61-75	4774	22,4%	442	29,9%	
	>75	2959	13,9%	378	25,5%	
Gender	Female	19707	92,4%	1258	85,0%	<0.001
	Male	1623	7,6%	222	15,0%	
Pregnancy	Non pregnant	17934	91,0%	1178	93,6%	<0.001
	Pregnant	1773	9,0%	80	6,4%	
Region	UPA	145	0,7%	10	0,7%	0.028
	Central	2595	12,4%	223	15,4%	
	Norte	6038	28,8%	428	29,5%	
	Leste	3488	16,6%	232	16,0%	
	Oeste	4211	20,1%	274	18,9%	
	Sul	3446	16,4%	223	15,4%	
	Rural	1058	5,0%	61	4,2%	

Categorical data were shown in absolute number (n) and percentage (%) and continuous data in mean and standard deviation.

Table 2. Antimicrobial resistance profile of patients with urinary *E. coli* isolates in the city of Londrina, from June 2016 to May 2019.

		ESBL				
		Susceptible		Resistant		p
		(n=21330)		(n=1480)		
First choice antibiotic						
Nalidixic Acid	Susceptible	15005	70,4%	370	25,0%	<0.001
	Resistant	6315	29,6%	1109	75,0%	
Ampicillin	Susceptible	11395	53,4%	0	0,0%	<0.001

	Resistant	9930	46,6%	1477	100,0%	
Cephalotin	Susceptible	10699	50,2%	0	0,0%	<0.001
	Resistant	10624	49,8%	1479	100,0%	
Ciprofloxacin	Susceptible	17546	82,3%	518	35,0%	<0.001
	Resistant	3764	17,7%	961	65,0%	
Nitrofurantoin	Susceptible	20373	95,6%	1277	86,3%	<0.001
	Resistant	944	4,4%	202	13,7%	
Norfloxacin	Susceptible	17568	82,4%	519	35,1%	<0.001
	Resistant	3758	17,6%	960	64,9%	
Sulfamethoxazole Trimetropim	Susceptible	15037	70,7%	654	44,4%	<0.001
	Resistant	6245	29,3%	818	55,6%	
Second choice antibiotic						
Amikacin	Susceptible	21273	99,8%	1452	98,1%	<0.001
	Resistant	53	0,2%	28	1,9%	
Amoxicillin Clavulanic Acid	Susceptible	18601	87,2%	831	56,1%	<0.001
	Resistant	2726	12,8%	649	43,9%	
Cefepime	Susceptible	21249	99,6%	15	1,0%	<0.001
	Resistant	79	0,4%	1465	99,0%	
Ceftriaxone	Susceptible	21159	99,2%	0	0,0%	<0.001
	Resistant	166	0,8%	1480	100,0%	
Cefuroxime	Susceptible	19904	93,4%	0	0,0%	<0.001
	Resistant	1417	6,6%	1479	100,0%	
Ertapenem	Susceptible	21285	99,8%	1444	97,6%	<0.001
	Resistant	36	0,2%	36	2,4%	
Gentamycin	Susceptible	20105	94,3%	1098	74,2%	<0.001
	Resistant	1224	5,7%	381	25,8%	
Piperacycline Tazobactam	Susceptible	20565	97,5%	1193	83,1%	<0.001
	Resistant	520	2,5%	242	16,9%	
Meropenem	Susceptible	21274	99,8%	1448	98,0%	<0.001

Resistant	35	0,2%	30	2,0%
-----------	----	------	----	------

Conclusions

UTIs occur in both genders and in all age groups, however, as we noticed in the study, its incidence is higher in women and increases with age, which are also possible factors for a higher rate of infections caused by resistant microorganisms and the worsening of the development of the infection, mainly due to the increased exposure to the use of antibiotics.

Thus, resistance to antibiotics previously seen exclusively in the hospital environment, is now also found in community patients, which makes it increasingly difficult to manage and treat these infections, since pharmacological options are scarce.

In order to deal with this situation, it is necessary to know the profile of the main microorganisms and the local population, as different locations have particular characteristics that can directly influence the clinical and epidemiological conditions. For this, the availability of comprehensive digital-data infrastructures can offer new opportunities to investigate the development of antimicrobial resistance spread.

Antimicrobial resistance surveillance is necessary to determine the problem and to guide empirical selection of antimicrobial agents for UTIs.

References

ALQASIM, A.; ABU JAFFAL, A.; ALYOUSEF, A. A. Prevalence of multidrug resistance and extended-spectrum β -Lactamase carriage of clinical uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Riyadh, Saudi Arabia. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, 2018.

CHU, C. M.; LOWDER, J. L. Diagnosis and treatment of urinary tract infections across age groups. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 219, n. 1, p. 40–51, 2018.

DETWEILER, K.; MAYERS, D.; FLETCHER, S. G. Bacteruria and Urinary Tract Infections in the Elderly. **Urologic Clinics of North America**, v. 42, n. 4, p. 561–568, 2015.

FU, Z. et al. Cranberry Reduces the Risk of Urinary Tract Infection Recurrence in Otherwise Healthy Women : A Systematic Review and. n. 1, p. 3–9, 2017.

GUPTA, K. et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious

Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 5, p. 103–120, 2011.

KANG, C. I. et al. Clinical practice guidelines for the antibiotic treatment of community-acquired urinary tract infections. **Infection and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 67–100, 2018.

KOKSAL, E. et al. Investigation of risk factors for community-acquired urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase Escherichia coli and Klebsiella species. **Investigative and Clinical Urology**, v. 60, n. 1, p. 46- 53., 2019.

KUSTER, S. P. et al. Risks factors for infections with extended-spectrum beta-lactamase- producing escherichia coli and klebsiella pneumoniae at a tertiary care university hospital in Switzerland. **Infection**, v. 38, n. 1, p. 33–40, 2010.

LEE, D. S. et al. Community-Acquired Urinary Tract Infection by Escherichia coli in the Era of Antibiotic Resistance. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

MCLELLAN, L. K.; HUNSTAD, D. A. Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 11, p. 946–957, 2016.

NICOLLE, L. E. Urinary Tract Infections in the Older Adult. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 32, n. 3, p. 523–538, 2016.

RAJA, N. S. Oral treatment options for patients with urinary tract infections caused by extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae. **Journal of Infection and Public Health**, v. 12, n. 6, p. 843–846, 2019.

ROTTIER, W. C.; AMMERLAAN, H. S. M.; BONTEN, M. J. M. Effects of confounders and intermediates on the association of bacteraemia caused by extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae and patient outcome : a meta-analysis. n. March, p. 1311–1320, 2012.

YOUSEF, S. A. A. et al. Clinical and Laboratory Profile of Urinary Tract Infections Associated with Extended Spectrum β -Lactamase Producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 46, p. 393–400, 2016.

Appendix 1

Basic Health Units according to the region of Londrina city, Paraná, Brazil.

Central	UBS - Centro UBS - Vila Brasil UBS - Guanabara/Arco Iris UBS - Vila Casoni UBS - Centro Social Urbano UBS - Vila Nova UBS - Fraternidade	Oeste	UBS - Panissa/Maracanã UBS - Alvorada UBS - Santiago UBS - Bandeirantes UBS - Leonor UBS - Jardim do Sol UBS - Jd. Tóquio
Norte	UBS - Aquiles Stenghel UBS - Chefe Newton UBS - Parigot de Souza UBS - Maria Cecília UBS - João Paz UBS - Milton Gavetti UBS - Carnascialli UBS - Vivi Xavier UBS - Imagawa/Cabo Frio UBS - Padovani/Vista Bela UBS - Campos Verdes	Sul	UBS - Cafezal UBS - Ouro Branco UBS - Pind UBS - Eldorado UBS - San Izidro UBS - Itapoã UBS União UBS - Piza / Roseira UBS Jamile Dequech
Leste	UBS - Armindo Guazzi UBS - Marabá UBS - Ernani Moura Lima UBS - Lindóia UBS - Mister Thomas UBS - Moema / Novo Amparo UBS - Ideal	Rural	UBS - Guairacá UBS - Guaravera UBS - Isao Udihara UBS - Lerrovile UBS - Maravilha UBS - Paiquerê UBS - Regina

	UBS - Vila Ricardo		UBS - São Luiz UBS - Selva UBS - Taquaruna UBS - Três Bocas UBS - Warta
--	--------------------	--	---

5 CONCLUSÕES

Todos os participantes do grupo de onívoros, sempre seguiram esse tipo de alimentação, enquanto os vegetarianos/ veganos seguem essa dieta há menos de 10 anos, sendo que 31% deles fazem uso de suplementação, em contraste com apenas 12% dos onívoros.

Ambos os grupos, de onívoros e vegetarianos/veganos apresentaram resistência aos antimicrobianos, principalmente à ampicilina (80% dos onívoros e 74% dos vegetarianos/ veganos), amoxicilina-ácido clavulânico (32% dos onívoros e 22% dos vegetarianos/ veganos) e ácido nalidixico (28% dos onívoros e 24% dos vegetarianos/ veganos) e ambos também apresentaram amostras positivas para a presença de ESBL, com um total de 3 amostras entre os onívoros e 10 entre os vegetarianos/ veganos. Destas, a enzima CTX-M-9 foi a mais prevalente em ambos os grupos.

Os genes de virulência mais predominantes entre os onívoros foram *fimH* (70%), *iutA* (32%), *fyuA* (32%) e *traT* (32%), enquanto entre vegetarianos/ veganos, os mais predominantes foram *traT* (62%), *kpsMT k1* (28%) e *iutA* (22%).

Nove amostras de vegetarianos/ veganos foram positivas para a presença de *kpsMT III*, enquanto nenhum onívoro apresentou a presença desse gene. Além deste, *cnf1* também esteve presente em 4 amostras de vegetarianos/ veganos e em nenhuma de onívoros e *traT* em 36 dos vegetarianos/ veganos contra apenas 19 dos onívoros. Já o gene *fimH*, esteve presente em 42 amostras dos onívoros e em apenas dos 7 vegetarianos/ veganos.

Em relação às ilhas de patogenicidade, a maioria dos onívoros (55%) foi positiva para PAI I536, enquanto a maioria dos vegetarianos/ veganos (59%) foram positivos para PAI IV536. Além disso, 12% das amostras de onívoros foram positivas para PAI III536 enquanto nenhuma dos vegetariano/ vegano mostrou positividade.

O grupo filogenético A, ao qual pertence a maioria das cepas comensais não patogênicas, foi o mais prevalentes em ambos os grupos (25% dos onívoros e 22% dos vegetarianos/ veganos) e não houve diferença estatisticamente significativa entre eles.

Em relação aos pacientes com ITU, a média de idade entre pacientes com amostra positiva para ESBL foi de 64 anos, mais elevada que a média entre os que não foram positivos (50 anos). Além disso, 37,5% (8.553) do total de pacientes

tenham mais de 61 anos, e ambos os grupos na faixa de 61-75 e >75 anos apresentaram maior positividade para ESBL, com 55,4% (820) do total de pacientes com amostras positivas.

A maioria dos pacientes eram do gênero feminino, sendo também o mais presente entre as amostras ESBL positivas, com 85%, enquanto entre os homens a porcentagem de ESBL foi de apenas 15%.

A maioria das amostras positivas para ESBL foram resistentes a antibióticos de primeira escolha no tratamento de ITU, com exceção da nitrofurantína.

Por apresentarem índices de resistência >20%, os antimicrobianos de primeira escolha para o tratamento de ITU: ácido nalidixico, ampicilina, cefalotina e sulfametoxazol/ trimetropin não devem ser prescritos empiricamente.

É importante, portanto, trabalhar o conhecimento acerca dos mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos e suas possíveis causas e que hajam agências reguladoras que estabeleçam diretrizes e medidas rigorosas a fim de uma utilização adequada desses medicamentos como forma de conter e prevenir o número de infecções causadas por esses microrganismos.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; WEGENER, H. C.; COLLIGNON, P. Resistance in bacteria of the food chain: Epidemiology and control strategies. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 6, n. 5, p. 733–750, 2008.
- ABREU, A. G.; BARBOSA, A. S. How *Escherichia coli* circumvent complement-mediated killing. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. APR, p. 1–6, 2017.
- ALQASIM, A.; ABU JAFFAL, A.; ALYOUSEF, A. A. Prevalence of multidrug resistance and extended-spectrum β -Lactamase carriage of clinical uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Riyadh, Saudi Arabia. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, 2018.
- ANESI, J. A. et al. Clinical and Molecular Characterization of Community-Onset Urinary Tract Infections Due to Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant Enterobacteriaceae. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 37, n. 12, p. 1433–1439, 2016.
- ANVISA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA-Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde.p.75.v.2013
- BALSALOBRE, C. et al. Transcriptional analysis of the *sfa* determinant revealing multiple mRNA processing events in the biogenesis of S fimbriae in pathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 2, p. 620–629, 2003.
- BIN THANI, A. S. Identification of novel DNA sequence associated with pathogenicity island III536locus in Uropathogenic *Escherichia coli* isolate and distribution of virulence determinants in β -lactam resistant isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, n. July, p. 393–397, 2018.
- BLANC, V. et al. ESBL- and plasmidic class C β -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 3–4, p. 299–304, 2006.
- BLUNDELL, C. D. et al. Investigating the molecular basis for the virulence of *Escherichia coli* K5 by nuclear magnetic resonance analysis of the capsule polysaccharide. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 71–82, 2009.
- BRIÑAS, L. et al. Monitoring and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 1262–1264, 2005.
- CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 214–226, 2012.
- CHEN, Y. C. et al. The risk of urinary tract infection in vegetarians and non-vegetarians: a prospective study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.
- CHU, C. M.; LOWDER, J. L. Diagnosis and treatment of urinary tract infections across age groups. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 219, n. 1, p. 40–51, 2018.
- CLARYS, P. et al. Comparison of nutritional quality of the vegan, vegetarian, semi-vegetarian, pesco-vegetarian and omnivorous diet. **Nutrients**, v. 6, n. 3, p. 1318–1332, 2014.
- CLERMONT, O. et al. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1024–1028, 2008.

- CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.
- DALE, A. P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease , carriage and clones. **Journal of Infection**, n. September, p. 1–12, 2015.
- DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490–495, 2010.
- DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14691–14696, 2010.
- DESLOGES, I. et al. Identification and characterization of OmpT-like proteases in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 11, p. 1–36, 2019.
- DETWEILER, K.; MAYERS, D.; FLETCHER, S. G. Bacteruria and Urinary Tract Infections in the Elderly. **Urologic Clinics of North America**, v. 42, n. 4, p. 561–568, 2015.
- DOBRINDT, U. et al. Doxorubicin. **Clinical journal of oncology nursing**, v. 2, n. 3, p. 115–116, 1998.
- DUGUID, J. P. et al. BACTERI UIkf COLI. v. LXX, n. 1055, 1954.
- DUTIL, L. et al. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 48–54, 2010.
- FEGAN, N.; GOBIUS, K. S. Pathogenic *Escherichia coli* and One Health Implications. n. August 2012, p. 49–62, 2013.
- FERACO, D. et al. Host environmental signals and effects on biofilm formation. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 253–263, 2016.
- FLEECE, M. E. et al. Molecular diagnosis of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 18, n. 3, p. 207–217, 2018.
- FOXMAN, B.; BROWN, P. Epidemiology of urinary tract infections: Transmission and risk factors, incidence, and costs. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 17, n. 2, p. 227–241, 2003.
- FU, Z. et al. Cranberry reduces the risk of urinary tract infection recurrence in otherwise healthy women: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Nutrition**, v. 147, n. 12, p. 2282–2288, 2017.
- GARÉNAUX, A.; CAZA, M.; DOZOIS, C. M. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 89–98, 2011.
- GERMON, P. et al. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 151, n. 4, p. 1179–1186, 2005.
- GIRLICH, D. et al. Extended-spectrum β -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4681–4685, 2007.
- GORDON, D. M. et al. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: Multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2484–2496, 2008.

- GORDON, D. M.; COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: Host and geographic effects. **Microbiology**, v. 149, n. 12, p. 3575–3586, 2003.
- GUPTA, K. et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 5, p. 103–120, 2011.
- HASHEMIZADEH, Z.; KALANTAR-NEYESTANAKI, D.; MANSOURI, S. Association between virulence profile, biofilm formation and phylogenetic groups of *Escherichia coli* causing urinary tract infection and the commensal gut microbiota: A comparative analysis. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 540–545, 2017.
- HOCHHUT, B.; DOBRINDT, U.; HACKER, J. Pathogenicity Islands and Their Role in Bacterial Virulence and Survival. **Concepts in Bacterial Virulence**, v. 12, p. 234–254, 2004.
- HOCHHUT, B.; DOBRINDT, U.; HACKER, J. Pathogenicity islands and their role in bacterial virulence and survival. **Contributions to microbiology**, v. 12, p. 234–254, 2005.
- HU, Y.; MATSUI, Y.; RILEY, L. W. Risk factors for fecal carriage of drug-resistant *Escherichia coli*: A systematic review and meta-analysis. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2020.
- HUI, C. Y. et al. *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides. **Microbiology and Immunology**, v. 54, n. 8, p. 452–459, 2010.
- JANG, J. et al. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications — a review. 2017.
- JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 80–128, 1991.
- JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261–272, 2000.
- JOUINI, A. et al. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum β -lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 1137–1141, 2007.
- KANG, C. I. et al. Clinical practice guidelines for the antibiotic treatment of community-acquired urinary tract infections. **Infection and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 67–100, 2018.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.
- KLINE, K. A. et al. Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. **Cell Host and Microbe**, v. 5, n. 6, p. 580–592, 2009.
- KNUST, Z.; SCHMIDT, G. Cytotoxic necrotizing factors (CNFs)-a growing toxin family. **Toxins**, v. 2, n. 1, p. 116–127, 2010.
- KOGA, V. L. et al. Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors among *Escherichia coli* Isolated from Conventional and Free-Range Poultry. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- KÖHLER, C. D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 642–647, 2011.
- KOKSAL, E. et al. Investigation of risk factors for community-acquired urinary tract infections

caused by extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. **Investigative and Clinical Urology**, v. 60, n. 1, p. 46- 53., 2019.

KORHONEN, T. K.; VAISANEN-RHEN, V.; RHEN, M. *Escherichia coli* fimbriae recognizing sialyl galactosides. **Journal of Bacteriology**, v. 159, n. 2, p. 762–766, 1984.

KRONENBERG, A. et al. Temporal trends of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in in- and outpatients in Switzerland, 2004 to 2011. **Eurosurveillance**, 2013.

KUSTER, S. P. et al. Risks factors for infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at a tertiary care university hospital in Switzerland. **Infection**, v. 38, n. 1, p. 33–40, 2010.

LE BOUGUÉNEC, C. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6–7, p. 471–478, 2005.

LEE, D. S. et al. Community-Acquired Urinary Tract Infection by *Escherichia coli* in the Era of Antibiotic Resistance. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

LEFLON-GUIBOUT, V. et al. Emergence and spread, of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3736–3742, 2004.

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

MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 5, p. 712–719, 2012.

MANSON, J. M.; GILMORE, M. S. Pathogenicity island integrase cross-talk: A potential new tool for virulence modulation. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 555–559, 2006.

MCLELLAN, L. K.; HUNSTAD, D. A. Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 11, p. 946–957, 2016.

MENDU, D. R. et al. Protein folding intermediates of invasin protein IbeA from *Escherichia coli*. **FEBS Journal**, v. 275, n. 3, p. 458–469, 2008.

MIAJLOVIC, H.; SMITH, S. G. Bacterial self-defence: How *Escherichia coli* evades serum killing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 354, n. 1, p. 1–9, 2014.

MICALI, S. et al. Cranberry and Recurrent Cystitis: More than Marketing? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 8, p. 1063–1075, 2014.

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

MURASE, K. et al. Hlyf produced by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a virulence factor that regulates outer membrane. n. 1, p. 1–25, 2015.

NAAS, T. et al. Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 0, n. 0, p. 917–919, 2017.

NÈGRE, V. L. et al. The Siderophore Receptor IronN, but Not the High-Pathogenicity Island or the Hemin Receptor ChuA, Contributes to the Bacteremic Step of *Escherichia coli* Neonatal Meningitis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 2, p. 1216–1220, 2004.

NICOLLE, L. E. Urinary Tract Infections in the Older Adult. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 32, n. 3, p. 523–538, 2016.

NOWROUZIAN, F. et al. Escherichia coli in infants' intestinal microflora: Colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. **Pediatric Research**, v. 54, n. 1, p. 8–14, 2003.

OKUNO, K. et al. Utilization of Escherichia coli Outer-Membrane Endoprotease OmpT Variants as Processing Enzymes for Production of Peptides from Designer Fusion Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 76–86, 2004.

POIREL, L.; GNIADKOWSKI, M.; NORDMANN, P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. p. 1031–1034, 2002.

RAJA, N. S. Oral treatment options for patients with urinary tract infections caused by extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae. **Journal of Infection and Public Health**, v. 12, n. 6, p. 843–846, 2019.

RISTOW, L. C.; WELCH, R. A. Hemolysin of uropathogenic Escherichia coli: A cloak or a dagger? **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 3, p. 538–545, 2016.

ROTTIER, W. C.; AMMERLAAN, H. S. M.; BONTEN, M. J. M. Effects of confounders and intermediates on the association of bacteraemia caused by extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae and patient outcome: A meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 6, p. 1311–1320, 2012.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to Escherichia coli: Focus on an increasingly important endemic problem. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 5, p. 449–456, 2003.

SABATÉ, M. et al. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic Escherichia coli isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 9, p. 880–886, 2006.

SAMEI, A.; HAGHI, F.; ZEIGHAMI, H. Distribution of pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic Escherichia coli isolates. **Folia Microbiologica**, v. 61, n. 3, p. 261–268, 2016.

SARMA, J. V.; WARD, P. A. The complement system. **Cell and Tissue Research**, v. 343, n. 1, p. 227–235, 2011.

SAROWSKA, J. et al. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from different sources: Recent reports. **Gut Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2019.

SCHJØRRING, S.; KROGFELT, K. A. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. **International Journal of Microbiology**, v. 2011, 2011.

SMET, A. et al. Diversity of extended-spectrum β -lactamases and class C β -lactamases among cloacal Escherichia coli isolates in Belgian broiler farms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1238–1243, 2008.

SNEERINGER, S. et al. Economics of Antibiotic Use in U . S . Livestock Production. n. 200, 2015.

Sociedade Vegetariana Brasileira. Disponível em:

<https://svb.org.br/filiacao/?gclid=Cj0KCQjw4cOEBhDMARIsAA3XDRgSvEWRUeZY0QNVv3FM6ReZQgoYvpArKXJbdsUbFGknnsL6lZsNi4gaArQnEALw_wcB>. Acesso em: 5 abr. 2021.

SUBASHCHANDRABOSE, S.; MOBLEY, H. L. T. Virulence and fitness determinants of uropathogenic Escherichia coli. **Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and**

Clinical Management, v. 3, n. 4, p. 235–261, 2016.

SUN, Y. et al. Inorganic and organic fertilizers application enhanced antibiotic resistance in greenhouse soils growing vegetables. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 179, n. January, p. 24–30, 2019.

TALAN, D. A. et al. Prevalence and risk factor analysis of trimethoprim-sulfamethoxazole- and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* infection among emergency department patients with pyelonephritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 9, p. 1150–1158, 2008.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207–217, 2010.

TERLIZZI, M. E.; GRIBAUDO, G.; MAFFEI, M. E. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: Virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, 2017.

The Vegan Society. Disponível em: <<https://www.vegansociety.com/>>. Acesso em: 5 abr. 2021.

TOMOVA, A. et al. The effects of vegetarian and vegan diets on gut microbiota. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, n. April, 2019.

VINUÉ et al.; Prevalence and diversity of extended spectrum β -lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain p. 16–19, 2008. VO, J. L. et al. Autotransporter Adhesins in *Escherichia coli* Pathogenesis. **Proteomics**, v. 17, n. 23–24, p. 1–10, 2017.

WANG, M. H.; KIM, K. S. Cytotoxic necrotizing factor 1 contributes to *Escherichia coli* meningitis. **Toxins**, v. 5, n. 11, p. 2270–2280, 2013.

WHITFIELD, C. Structure and Assembly of *Escherichia coli* Capsules. **EcoSal Plus**, v. 3, n. 2, 2009.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 85, n. 1, p. 11–19, 2008.

YANG, Q. et al. Influence of chicken manure fertilization on antibiotic-resistant bacteria in soil and the endophytic bacteria of pakchoi. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 7, p. 1–12, 2016.

YANG, Y. et al. Review of Antibiotic Resistance , Ecology , Dissemination , and Mitigation in U . S . Broiler Poultry Systems. v. 10, n. November, p. 1–10, 2019.

ZOU, Y.; HE, L.; HUANG, S. H. Identification of a surface protein on human brain microvascular endothelial cells as vimentin interacting with *Escherichia coli* invasion protein IbeA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 351, n. 3, p. 625–630, 2006.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

Perfil de sensibilidade das E. coli isoladas pessoas vegetarianos**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado a participar de um estudo *chamado* "**Perfil de sensibilidade e virulência de E. coli isoladas de pessoas vegetarianas, veganas e onívoras**" realizado pelas pesquisadoras Zuleica Naomi Tano¹, Eliana Carolina Vespero¹ e Ariane Tiemy Tizura² (docentes¹ e mestranda² da Universidade Estadual de Londrina, Hospital Universitário de Londrina). Este estudo será realizado para sabermos se as bactérias encontradas em pessoas que não comem carne possuem sensibilidade diferente aos antibióticos que utilizamos para o tratamento das infecções urinárias.

Não haverá exposição do seu nome em nenhum momento. Caso aceite participar do estudo, solicitamos que assine o termo de consentimento e responda por gentileza o questionário.

Caso não queira participar do estudo, não haverá prejuízo nenhum em relação ao seu exame.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, aceito participar do estudo "**Perfil de sensibilidade de E. coli isoladas de pessoas vegetarianas, veganas e onívoras**"

Assinatura paciente: _____

Londrina, _____, _____, 2017.

APÊNDICE B - Formulário vegetarianos/veganos X onívoros

Formulário vegetarianos/veganos xonívoros

*obrigatórios

1. E-mail*

2. Nome

3. Número do questionário*

4. Idade (em anos completos)*

5. Sexo*

Marcar apenas uma oval.

- Feminino
 Masculino

6. Tomou antibiótico nos últimos 6 meses?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

7. Foi internado nos últimos 6 meses?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

8. Profissão

9. Escolaridade:

Marcar apenas uma oval.

- Ensino médio incompleto
 Ensino médio completo
 Ensino superior incompleto
 Ensino superior completo

10. Cor ou raça:

Marcar apenas uma oval.

- Branca
 Parda
 Indígena
 Preta

Amarela

11. Estado civil

Marcar apenas uma oval.

Solteiro

Casado

12. Altura (em cm)

13. Peso (em kg)

14. Tipo de dieta

Marcar apenas uma oval.

Onívoro

Vegetariano

Vegano

15. Ingeriu algum tipo de carne nos últimos 6 meses?

Marque todas que se aplicam.

Bovina

Suína

Aves

Peixes

Nenhum dos itens acima

16. Ingeriu algum dos alimentos abaixo nos últimos 6 meses ?

Marque todas que se aplicam.

Ovo

Queijo

Iogurte

Nenhum dos itens acima

17. Há quanto tempo segue essa dieta?

18. Em casa, com que frequência você compra e consome alimentos orgânicos?

Marcar apenas uma oval.

Só consome alimentos orgânicos

Dá preferência aos alimentos orgânicos

Não se importa em consumir alimentos orgânicos

19. Ainda sobre alimentos orgânicos, quando se alimenta fora de casa, você:

Marcar apenas uma oval.

- Só consome alimentos orgânicos
 Dá preferência aos alimentos orgânicos
 Não se importa em consumir alimentos orgânicos

20. De 0 a 10, qual o seu consumo de alimentos orgânicos? (sendo que 0 não consome e 10 consome somente orgânicos)?

21. É fumante?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

22. Com que frequência consome bebida alcoólica?

Marcar apenas uma oval.

- Nunca
 Mensalmente ou menos
 De 2 a 4 vezes por mês
 De 2 a 4 vezes por semana
 4 ou mais vezes por semana

23.

Faz uso de medicamento contínuo? Qual (is)?

24. Fez uso de outro medicamento nos últimos 30 dias? Qual (is)?

25. Faz uso de probióticos?

Marque todas que se aplicam.

- Yakult
 Kombucha
 Não faz uso
 Outro:
-

26. Teve diarreia ou constipação intestinal nos últimos 30 dias?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

27. Possui alguma doença intestinal? Qual?

28. Possui alguma doença crônica? Qual?

29. Possui animais em casa? qual (is)?

Marque todas que se aplicam.

- Cachorro
 Gato
 Aves (pássaros, galinha, galo, pato etc)
 Outros:
-

30. Teve contato direto com boi, porco ou ave nos últimos 12 meses?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

31. Manipulou carne crua de qualquer origem (bovina, suína, aves, peixes)?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

32. Faz uso de suplementação alimentar?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

33. Consome outros tipos de proteína que não de origem animal? Qual (is)?

34. Ingere outro tipo de água que não de origem mineral/potável?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

35. Utiliza água não encanada?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não