



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *E. coli* ISOLADAS DE
UROCULTURAS DE MULHERES ATENDIDAS EM UNIDADES
BÁSICAS DE SAÚDE E PRONTO ATENDIMENTO NO MUNICÍPIO DE
LONDRINA

Zuleica Naomi Tano

Londrina

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *E. coli* ISOLADAS DE
UROCULTURAS DE MULHERES ATENDIDAS EM UNIDADES
BÁSICAS DE SAÚDE E PRONTO ATENDIMENTO NO MUNICÍPIO DE
LONDRINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade
Estadual de Londrina para a obtenção de título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli

Coorientadora: Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero

Londrina

2021

Z94 Tano, Zuleica Naomi.
AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE E. coli ISOLADAS DE UROCULTURAS DE MULHERES ATENDIDAS EM UNIDADES BÁSICAS DE SAÚDE E PRONTO ATENDIMENTO NO MUNICÍPIO DE LONDRINA / Zuleica Naomi Tano. - Londrina, 2021.
69 f. : il.

Orientador: Wander Rogério Pavanelli.
Coorientador: Eliana Carolina Vespero.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Infecção do trato urinário - Tese. 2. Tratamento de infecção de trato urinário da comunidade - Tese. 3. Resistência a quinolonas - Tese. 4. Caracterização molecular das E. coli - Tese. I. Pavanelli, Wander Rogério . II. Vespero, Eliana Carolina. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 61

ZULEICA NAOMI TANO

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE *E. coli* ISOLADAS DE UROCULTURAS DE MULHERES
ATENDIDAS EM UNIDADES BÁSICAS DE SAÚDE E PRONTO ATENDIMENTO NO
MUNICÍPIO DE LONDRINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção de título de Doutor

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Wander Pavanelli

Profa. Dra. Renata Katsuko Katayama
Kobayashi

Prof. Dra. Cláudia Maria Dantas de Maio
Carrilho

Profa. Dra. Márcia Regina Eches Perugini

Profa. Dra. Ivete Conchon Costa

Londrina, 29 de janeiro de 2021

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli, meu orientador e amigo. Obrigada pela compreensão, paciência e, principalmente, pelo apoio nestes últimos meses.

Meu agradecimento à Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero, minha coorientadora e amiga. Sem você eu não teria chegado até aqui.

Aos colegas do Setor de Microbiologia, Profa. Mestre Marsilene Pelison, Profa. Dra. Márcia Eches Perugini, meu muito obrigado pelo conhecimento compartilhado nesses anos.

À Dra. Ana Maria Bonametti, que me mostrou o caminho da pesquisa clínica, me encaminhou no mestrado, me acolheu de volta à disciplina de Moléstias Infecciosas e continua sendo minha mentora, minha eterna gratidão.

Aos colegas do Laboratório Centrolab, que permitiram que esse projeto pudesse ser executado.

À Secretaria de Saúde do Município, obrigada pela permissão para a coleta de dados no Laboratório Centrolab.

Aos Colegas da Disciplina de Infectologia, meu muito obrigado.

A Vanessa Koga, Poliana Candido, Luiz Felipe Perugini, João Soncini e demais colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário de Londrina, sem palavras para agradecer.

Aos colegas da XLII Turma de Medicina, por sempre estarem por perto, festejando cada conquista de cada um dos membros desta que já se tornou uma família.

À minha comadre Patricia Akaishi, um exemplo de profissional, de pesquisadora e, principalmente, de mãe. Agradeço por estar perto, mesmo a quilômetros de distância.

A Luciana Damaceno Costa, minha funcionária há 10 anos, por cuidar da minha casa, do meu filho e marido e dos filhos animais. Sem você a tese não seria possível.

Aos pacientes, todos que passaram por mim e que ainda passarão, agradeço imensamente a oportunidade de conhecer histórias de vida e aprender todos os dias.

À Fundação Bill e Melinda Gates, por nos dar a oportunidade de conhecer pesquisadores da mais alta categoria e por ter financiado parte dos exames realizados nesta pesquisa.

A Tiemi Matsuo, minha gratidão pela ajuda na análise estatística.

A Deus, que nunca me desampara.

DEDICATÓRIA

À minha família

*À minha mãe, Harue,
Que nunca me deixou desistir....*

*Ao meu pai, Takeo (in memoriam),
Pelo amor e exemplo de alegria*

*Ao meu companheiro, Moacir,
Pela paciência*

*Ao meu filho, Guilherme,
Todo amor que existe em mim*

“I cannot think of any subspeciality of medicine that could possibly be more exciting, more challenging, more impactiful than the discipline of infectious diseases”

Anthony Fauci, MD

RESUMO

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

Introdução: A infecção do trato urinário (ITU) é uma das infecções mais comuns de procura ao serviço médico, acometendo milhões de pessoas no mundo todo, sendo a *Escherichia coli* o principal agente responsável. A resistência aos antimicrobianos tem aumentado expressivamente nos últimos anos, e o perfil de sensibilidade varia de região para região. Os principais antimicrobianos utilizados no tratamento de primeira escolha da ITU são: sulfametoxazol-trimetropim (SMX-TMP), nitrofurantoína, a fosfomicina e as quinolonas, além das cefalosporinas de primeira geração e a amoxicilina-clavulanato como escolha para gestantes. Estudos mostram que a sensibilidade ao SMX-TMP ultrapassa 30% em vários locais do mundo, sendo substituído por alternativas nos *guidelines*. A presença de bactérias produtoras de betalactamase é muito estudada em ambiente hospitalar, porém sabe-se que essas bactérias alcançaram também as infecções comunitárias, como as ITUs. *E. coli* *Sequency Type* (ST)131 e ST648 são responsáveis por ITUs recorrentes e de difícil tratamento com antibióticos de primeira escolha pela alta resistência aos antimicrobianos. A resistência às quinolonas, muito utilizadas em outras infecções, como as respiratórias e abdominais, tem alcançado níveis de alarme em muitos locais, principalmente pelo uso inadequado nas ITUs não complicadas. **Objetivo:** Caracterizar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *E. coli* de uroculturas de mulheres atendidas em Unidades Básicas de Saúde e de Pronto Atendimento no município de Londrina. Caracterizar os mecanismos moleculares de resistência de isolados resistentes à ciprofloxacina, norfloxacina e ácido nalidíxico e aos β -lactâmicos, além de conhecer os sorogrupos, ST e a classificação filogenética das amostras resistentes às quinolonas. **Metodologia:** Foram estudadas as uroculturas realizadas pelo Laboratório Central da Prefeitura (Centrolab) de mulheres atendidas nas Unidades Básicas de Saúde e Pronto Atendimento do município de Londrina, de junho de 2016 a maio de 2017. As culturas positivas foram selecionadas para avaliação no Laboratório do Hospital Universitário. A identificação dos isolados e os testes de sensibilidade a antimicrobianos foram processados pelo Sistema Automatizado VITEK® 2 (bioMérieux). As amostras foram sequenciadas utilizando-se o kit Nextera® XT Sample Preparation (Illumina), no equipamento MiSeq® System (Illumina), pela plataforma NextSeq (Illumina). A classificação filogenética foi executada por PCR. **Resultados:** No período foram realizadas 56.555 uroculturas, das quais 8.832 foram positivas para *E. coli*, sendo 5.377 de mulheres. Dessas amostras, 4,7% eram enterobactérias produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) e 15,5% resistentes às quinolonas. O SMX-TMP se mostrou resistente em mais de 30% das amostras em todas as faixas etárias dos pacientes. Entre os isolados resistentes às quinolonas, também a resistência à cefalotina, ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprim foi maior que 60%. Somente a nitrofurantoína apresentou resultados superiores a 90% de sensibilidade. Nas 33 amostras selecionadas de *E. coli* para a realização do sequenciamento, obteve-se os seguintes resultados: o ST131 "serotype" O25:H4 (n=8) e o ST648 "serotype" O1:H6 (n=6) foram os mais frequentes, o gene *bla*_{CTX M15} foi o mais encontrado. As mutações nas regiões *Gyr A* e *ParC* (QRDR) e o gene *aca(6')-ib-cr* na resistência à quinolona mediada por plasmídeo (PMQR) foram os mecanismos mais frequentes, produzindo resistência às quinolonas. O grupo filogenético B2 foi o mais encontrado com 54,5% (n=18), seguido pelo grupo B19% (n=3); o grupo não identificado foi responsável por 12,1% (n=4) e os grupos A, C, E e F foram responsáveis por 6,1%. Entre as 33 amostras estudadas, todas tinham pelo menos um fator de virulência, sendo os mais

1 frequentes o *iss* (n=24), seguido pelo *pfA* (n=17), *gag* (n=16), *iha* (n=12), *eilA* (n=11) e *air*
2 (n=10). **Conclusão:** O SMX-TMP apresentou resistência superior a 30% e a nitrofurantoína
3 manteve altas taxas de sensibilidade, maiores do que 90%. A maioria dos isolados
4 apresentava mutações nas regiões *gyrA* e *parC* (QRDR) e os genes *aca(6')-ib-cr* e *bla_{CTXM15}*,
5 pertenciam ao grupo filogenético B2, aos ST131 e ST648 de grande importância
6 epidemiológica, presentes em ITU na comunidade de Londrina. A combinação de genes de
7 resistência a quinolonas associada a genes ESBL diminui o arsenal de antimicrobianos a
8 serem usados em infecções urinárias não complicadas, principalmente na comunidade.
9 Demonstra, assim, a necessidade de estabelecer sistemas de monitoramento locais e
10 nacionais da resistência antimicrobiana no Brasil para fornecer dados às diretrizes de
11 tratamento de ITU na comunidade.

12

13 **Palavras-chave:** Infecção do trato urinário, bacteriúria, resistência, *Escherichia coli*
14 uropatogênica

ABSTRACT

Background: Urinary tract infection (UTI) is one of the most common causes of visit to medical care. It affects millions of people worldwide. Although the prevalence among elderly men and women is similar, young, sexually active women have a high risk of developing UTI. It is considered uncomplicated cystitis when it affects young women, without functional or structural changes in the urinary tract. *E. coli* is the causative agent of UTI. Antimicrobial resistance has increased significantly in recent years, and the sensitivity profile varies from region to region. The first-choice antimicrobials treatment used for UTI are sulfamethoxazole-trimethoprim (SMX / TMP), nitrofurantoin, fosfomycin and quinolones, in addition to first-generation cephalosporins, and amoxicillin-clavulanate as a choice for pregnant women. Studies show that the sensitivity to SMX-TMP exceeds 30% in several places in the world, being replaced by alternatives in the guidelines. The presence of extended producing beta lactamase bacteria is widely studied in a hospital environment, however, it is known that these bacteria also reached community infections, such as UTI. *E. coli* ST131 and ST648 are responsible for recurrent UTI that are difficult to treat with antibiotics of first choice due to their high resistance to antimicrobials. Quinolones resistance has reached alarm levels in many places, mainly due to the inappropriate use in uncomplicated UTI. **Objective:** To characterize the profile of antimicrobials sensitivity to *E. coli* in urocultures of women treated at Basic Health Units and Emergency Care Units in the city of Londrina. To characterize the molecular resistance mechanisms of isolates resistant to ciprofloxacin, norfloxacin and nalidixic acid and β -lactams, in addition to knowing the serogroups, ST and the phylogenetic classification of samples resistant to quinolone. **Methodology:** Urocultures performed by the Central Laboratory (laboratory responsible for performing all urocultures in the municipality) of women attended in the Basic Health and Emergency Care Units of the city of Londrina, were selected over a period of 12 months (June 1, 2016 to may 2017). Positive cultures were selected for evaluation at the University Hospital Laboratory. The identification of isolates and antimicrobial sensitivity tests were performed by the VITEK® 2 Automated System (bioMérieux, France), The samples were characterized by molecular methodologies; the Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) for *qnr* genes, molecular typing by ERIC-PCR; Phylogenetic profile and complete sequencing of the genome. **Results:** 56,555 urine cultures were performed in the period, of which 8,832 were positive, of which 5,377 were women. Of these samples, 4.7% were enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and 15.5% resistant to quinolones. SMX-TMP was resistant in more than 30% of the samples in all age groups. Among quinolone-resistant isolates, resistance to cephalothin, ampicillin and sulfamethoxazole-trimethoprim was greater than 60%. Nitrofurantoin was the only antimicrobial that showed 90% of sensitivity. In the thirty-three samples *E. coli* selected to perform the sequencing, ST131 serotype O25: H4 (n = 8) and ST648 serotype 01: H6 (n = 6) were found more frequently and among the ESBL producing genes, *bla*_{CTX M15} was the most frequent. The most frequent mechanism of resistance to quinolones were mutations in the Gyr A and Par C (QRDR) regions and the *aca(6')*-*ib-cr* gene in plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR). Phylogenetic group B2 was the most found with 54.5% (n = 18), followed by group B19% (n = 3), the unidentified group was responsible for 12.1% (n = 4) and groups A, C, E and F were responsible for 6.1%. Among the thirty-three samples studied, all had at least one virulence factor, the most frequent was *iss* (n = 24), followed by *pfA* (n = 17), *gag* (n = 16), *iha* (n = 12), *eilA* (n = 11) and *air* (n = 10).

1 **Conclusion:** SMX-TMP resistance was greater than 30% in the study samples. Nitrofurantoin
2 maintains high sensitivity rates greater than 90%. Resistance to quinolones increases
3 proportionally with age, as well ESBL. Most of the isolates had mutations in the *gyrA* and *parC*
4 (QRDR) regions and the genes *aca(6')*-*ib-cr* and *bla*_{CTX-M15}, belonged to the phylogenetic group
5 B2, to ST 131 and ST648. his study demonstrated the presence of *E.coli* ST131 CTX-M-15
6 strains, of great epidemiological importance, present in ITU in the community of Londrina. The
7 combination of quinolone resistance genes associated with ESBL genes decreases the
8 arsenal of antimicrobials to be used in uncomplicated urinary infections, especially in the
9 community. Thus demonstrating the need to establish local and national monitoring systems
10 for antimicrobial resistance in Brazil to provide data for the treatment guidelines for UTI in the
11 community.

12
13
14 **Key Words:** Urinary Tract Infection, bacteriuria, drug resistance, Uropathogenic *Escherichia*
15 *coli*

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

LISTA DE FIGURAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

Figura 1. Fisiopatologia da infecção do trato urinário19

Figura 2. Adesinas e estruturas móveis.....22

LISTA DE ABREVIATURAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

ITU- Infecção do Trato Urinário

E. coli- *Escherichia coli*

ESBL- Extended Spectrum Beta Lactamase

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ITU-RAS- Infecção do trato urinário relacionada à saúde

Anvisa- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

TLR4- Toll like receptor 4

LPS- Lipopolissacarídeo

NF- $\kappa\beta$ - Fator nuclear $\kappa\beta$

UPEC- Uropathogenic *Escherichia coli*

EXPEC- Extraintestinal patothogenic *Escherichia coli*

CNF1- Fator necrotizante citotóxico

MRSA - Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

RDC- Resolução da diretoria colegiada

DNA- Ácido desoxirribonucleico

SMX-TMP- Sulfametoxazol-trimetropina

MIC- Concentração Inibitória Mínima

PMQR- Plasmid mediated quinolone resistance

UFC- Unidade formadora de colônia

CLSI- Clinical Laboratory Standards Institute

PCR- Polimerase chain reaction

MLST- Multilocus sequence typing

CEFAP- Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa

USP- Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1		
2	1. Introdução e revisão de literatura	15
3	1.1. Epidemiologia da Infecção do trato urinário.....	15
4	1.2. Infecção do trato urinário.....	16
5	1.3. Fatores de risco.....	16
6	1.4. Fisiopatologia.....	17
7	2. O agente etiológico- <i>Escherichia coli</i>	17
8	2.1. Fatores de virulência.....	19
9	• Adesinas.....	19
10	• Adesinas não fimbriais.....	20
11	• Receptores de quelantes de ferro.....	20
12	• Toxinas	20
13	• Lipopolissacarídeos (LPS) e cápsula.....	21
14	3. Tratamento.....	22
15	4. Resistência bacteriana.....	24
16	5. Objetivos.....	26
17	5.1. Objetivo geral.....	26
18	5.2. Objetivos específicos.....	26
19	6. Metodologia.....	27
20	7. Análise Estatística.....	30
21	8. Resultados.....	32
22	9. Conclusão.....	62
23	10. Considerações finais.....	63
24	11. Referências.....	64
25	12. Anexos.....	70
26	Artigo 1: Susceptibility to first choice antimicrobial treatment for urinary tract infections to	
27	<i>Escherichia coli</i> isolates from women urine samples in community South Brazil.....	32
28	Artigo 2: Genomic analysis of <i>Escherichia coli</i> isolated from urine samples in community in	
29	South Brazil.....	46
30	Artigo 3: Genome Sequences of three <i>Escherichia coli</i> isolated from community-acquired	
31	urinary tract infections in Brazil.....	58
32		
33		
34		
35		

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

A descrição da infecção do trato urinário (ITU) data de 1550 a.C., no *Papyrus de Ebers*, um dos primeiros tratados escritos no antigo Egito (Simões de Paula), e credita-se a Galeno o primeiro tratado sobre a urina, criando os termos disúria (micção difícil e dolorosa) e estrangúria (micção lenta e dolorosa, gota a gota) (Tubino, 2017). Atualmente, é uma das infecções bacterianas mais comuns, afetando 150 milhões de pessoas por ano (Stamm, 2001). Em 2007, nos Estados Unidos, houve 10.5 milhões de visitas ao consultório por sintomas de ITU (0,9% de todas as visitas ambulatoriais) e de 2-3 milhões de procura à emergência. O custo direto e indireto da ITU nos Estados Unidos foi estimado em 2,3 milhões de dólares em 2010 (Foxman, 2014).

Embora ITUs sejam um dos agravos mais comuns no mundo causados por bactérias, no Brasil há escassez de dados epidemiológicos, estando disponíveis apenas alguns estudos locais como o realizado em Florianópolis sobre a demanda nas Unidades Básicas de Saúde. O estudo apontou que as ITUs são o 14º motivo de consulta, ficando atrás apenas das infecções do trato respiratório superior e gastroenterite (Gusso, 2009). Segundo outro estudo, realizado também no Sul do Brasil, as ITUs foram responsáveis por 13,3% das prescrições de antibióticos, número menor apenas que as infecções de vias aéreas superiores e amigdalites (Tavares, 2008).

Com relação às espécies de bactérias envolvidas nas ITUs, um estudo realizado no Rio Grande do Norte mostrou que a *E. coli* foi a bactéria mais frequentemente isolada (60,4%), seguida por *Klebsiella sp.* com 14,2% entre 1.082 amostras de urina estudadas (Cunha, 2016). Do mesmo modo, um estudo realizado em Curitiba, em 10.200 culturas de urina positivas, *E. coli* foi a bactéria mais comumente isolada (54,7%), enquanto a segunda bactéria mais isolada foi o *S. agalactiae* (18,8%), uma bactéria comensal do trato genital feminino, seguida por *Proteus mirabilis*, *Enterococcus sp*, *Staphylococcus sp* e *Klebsiella sp* (Reu, 2018). Esses estudos demonstram que no Brasil, como nos demais países, apenas uma quantidade limitada de dados foi publicada sobre a frequência de agentes causadores de ITUs, sendo que a bactéria entérica *Escherichia coli* foi e continua sendo a mais constante, com frequência variando entre 53% a 72% em pacientes da comunidade (Wilson and Gaido, 2004).

Há poucos estudos recentes sobre dados epidemiológicos da infecção urinária na comunidade da América Latina. Dados do *SENTRY Antimicrobial Surveillance Program* na América Latina reúnem informações sobre a presença de ESBL na Argentina, Brasil, Chile e México: mostram 18.1%, 12.8%, 23.8% e 48.4% entre *E. coli*, respectivamente (Gales, 2012).

1 1.2 INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

2 O trato urinário é composto pelos rins, ureteres, bexiga e uretra. Qualquer infecção
3 nessas estruturas será considerada infecção do trato urinário. Elas são divididas de acordo
4 com o local de acometimento (rins, bexiga, ureteres e uretra) e pela gravidade (complicadas
5 e não complicadas). As infecções não complicadas afetam indivíduos saudáveis e sem
6 anormalidades estruturais ou neurológicas do trato urinário, que podem ser baixas (cistites)
7 ou altas (pielonefrites), além de bacteriúria, que significa literalmente “bactéria na urina”,
8 porém sem sintomas urinários (Mandell, 2015; Hooton TM, 2012). As infecções complicadas
9 são aquelas que possuem alguma anormalidade funcional ou anatômica urológica (presente
10 em crianças), como obstrução do trato urinário (como aumento da próstata em homens),
11 retenção causada por distúrbio neurológico, imunossupressão, insuficiência renal, transplante
12 renal, gravidez e presença de corpos estranhos como cateter urinário ou cálculo
13 (Lichtenberger, 2008). As ITUs são classificadas ainda como comunitárias, aquelas que não
14 estão relacionadas à internação ou à presença de cateter urinário, e as relacionadas à
15 assistência à saúde (ITU-RAS), que são definidas como qualquer infecção do trato urinário
16 associada a procedimento urológico, podendo estar associada ou não ao uso de sondagem
17 vesical de demora (Anvisa, 2017).

18

19 1.3 FATORES DE RISCO

20 Os principais fatores de risco identificados para ITU são idade, história prévia de ITU,
21 atividade sexual e *diabetes mellitus*. A ITU é mais comum entre as mulheres, apesar de a
22 prevalência entre homens e mulheres idosas ser similar. Mulheres jovens, sexualmente ativas,
23 possuem alto risco de desenvolver ITU. Entre os fatores de risco para essas mulheres estão
24 a relação sexual e o uso de contraceptivos do tipo espermicida. Além disso, a curta distância
25 entre uretra/região anal/cavidade vaginal, onde a colonização por uropatógenos é frequente,
26 favorece a ascensão das bactérias (Foxman, 2014).

27 A história prévia de ITU é um fator de risco maior, contudo não está claro se a
28 recorrência está relacionada ao comportamento do hospedeiro, susceptibilidade, fatores
29 bacterianos ou a uma interação dos três.

30 A atividade sexual permite que a bactéria se mova para a uretra, tanto em homens
31 como em mulheres, aumentando o risco de ITU. Pesquisa realizada com mulheres jovens
32 demonstrou que a primeira ITU em universitárias está 21 vezes mais relacionada a sexo
33 vaginal nas últimas duas semanas do que os controles (Foxman, 1995). O uso de
34 preservativo, diafragma e espermicida também está associado a um aumento de ITU. Com
35 relação ao preservativo, este está relacionado ao aumento do trauma, que pode ser

1 melhorado com a aplicação de lubrificantes (Foxman, 1997), enquanto o uso do diafragma
2 pode obstruir o fluxo de urina e geralmente é utilizado com o espermicida (Foxman, 2000).
3 Infecções vaginais, como vaginose, podem facilitar o crescimento da *E. coli*, aumentando o
4 risco de ITU (Harmanli, 2000). Gestantes possuem alto risco de desenvolver ITU, devido às
5 alterações anatômicas que ocorrem durante a gestação (Ramos, 2012).

6 O risco de ITU aumenta com a idade. A incidência entre mulheres com 85 anos ou
7 mais é de 29.6%, sendo que os fatores de risco incluíram fraturas vertebrais, incontinência
8 urinária, doenças reumatológicas e demência (Eriksson I, 2010).

9 A presença de diabetes é um fator de risco importante para o desenvolvimento de ITU,
10 principalmente nos pacientes descompensados. A presença de hiperglicemia faz com que o
11 diabético seja considerado imunossuprimido, favorecendo a disfunção de neutrófilos,
12 comprometimento do sistema antioxidante e do sistema imune humoral (Akash, 2020).

13

14 1.4 FISIOPATOLOGIA

15 Adesão e Colonização

16 A adesão bacteriana é o evento chave para o início da patogênese da ITU. Tipicamente
17 se inicia com a contaminação da região periuretral por um uropatógeno presente no intestino,
18 seguido pela colonização da uretra e migração para a bexiga, evento que necessita de flagelos
19 e *pili*. A interação entre patógeno-hospedeiro determinará se a bactéria colonizará ou será
20 eliminada da bexiga.

21 As adesinas presentes nas bactérias reconhecem os receptores no epitélio da bexiga
22 (uroepitélio) e facilitam a colonização. Os uropatógenos, como *E. coli*, invadem o epitélio da
23 bexiga e sobrevivem através da produção de toxinas e proteases para liberar nutrientes das
24 células hospedeiras e sintetizar sideroforos para obter ferro, uma vez que a urina é pobre em
25 ferro, se multiplicando e evadindo do sistema imune. Os uropatógenos ascendem ao rim,
26 colonizando o epitélio e produzindo toxinas. Conseqüentemente, podem atravessar a barreira
27 epitelial e acessar a corrente sanguínea, levando à bacteremia (Flores-Mireles, 2015). A fig 1
28 mostra a fisiopatologia da ITU.

29 Após a ascensão pela uretra, os mecanismos de defesa inata são iniciados na bexiga,
30 desencadeando a resposta inflamatória mediada pelo TLR4 (*Toll like receptor 4*) e LPS
31 (lipopolissacáride) das células epiteliais da bexiga e leucócitos, culminando na ativação via
32 NF- κ B (fator nuclear – κ B), que promove a expressão de citocinas e atração dos neutrófilos
33 (Olson, 2000). Esse meio inflamatório gera um influxo maciço de neutrófilos no tecido e na
34 bexiga, correlacionando-se com o diagnóstico de ITU.

35 1. O AGENTE ETIOLÓGICO

1 Os principais agentes etiológicos das ITUs comunitárias são as Enterobactérias, que
2 são *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp*, além de *Staphylococcus saprophyticus*.
3 Porém, a principal e mais frequentemente isolada é *E. coli*, que será estudada de maneira
4 mais aprofundada neste tópico.

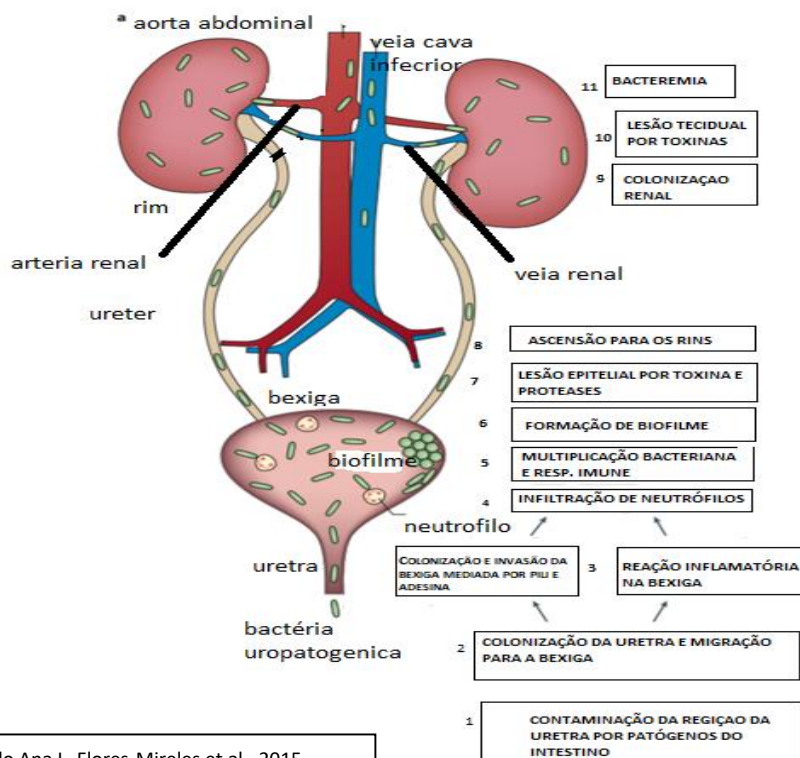
6 2.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

7 *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, em formato de haste, membro da família
8 *Enterobacteriaceae*. É uma das bactérias mais estudadas, tem crescimento rápido (tempo de
9 geração: 20 minutos) em condições ideais. O genoma da *E. coli* foi reportado primeiramente
10 em 1997, desde então mais de 4.800 genomas foram sequenciados. Há sete grupos
11 filogenéticos identificados até o momento (A, B1, B2, C, D, E e F), baseados em propriedades
12 genotípicas e fenotípicas. As “uropathogenic *Escherichia coli*” (UPEC) pertencem na maioria
13 aos grupos filogenéticos B2 e D (Clermont, 2013).

14 As *E. coli* são categorizadas geneticamente e clinicamente em cepas comensais e
15 patogênicas, sendo esta última em intestinais ou extraintestinais. As *E. coli* comensais,
16 pertencentes à flora bacteriana intestinal, podem ser responsáveis por infecções
17 extraintestinais na presença de corpos estranhos (cateter urinário), anormalidades
18 anatômicas e/ou imunossupressão; as cepas patogênicas intestinais são responsáveis pelas
19 diarreias e as extraintestinais, as ExPEC (Extraintestinal pathogenic *E. coli*), causam
20 infecções nos mais variados sítios anatômicos (Russo, 2003; Johnson, 2000).

1

FIGURA 1- Fisiopatologia da infecção do trato urinário



2

3 2.1 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *E. coli*

4 *E. coli* uropatogênicas possuem um grupo de fatores de virulência que são essenciais
 5 para a patogenicidade e sobrevivência no trato urinário. Esses fatores incluem uma variedade
 6 de adesinas, quelantes de ferro, sideróforos, toxinas, cápsulas, flagelos, proteínas de
 7 membrana externa e lipopolissacarídeos, cujos genes são transferidos através de plasmídios,
 8 transposons, bacteriófagos e ilhas patogênicas para outras bactérias (Cruz, 2020).

9

10 2.1.1 Adesinas-Fimbriais

11 Cepas de UPEC possuem um potente arsenal de fatores de virulência que inclui até
 12 12 fímbrias com diferentes adesinas. Dois grupos de fímbrias foram identificados nas cepas
 13 UPEC: manose-sensível e manose-resistente. As adesinas do tipo manose-sensível (*pili* tipo
 14 1 ou tipo1 like) parecem ser as mais importantes nessas cepas e são codificadas por um gene
 15 no cromossomo bacteriano. O maior componente da fímbria é a proteína FimA e os menores
 16 são FimC, FimD, FimF, FimH e FimG. A adesina FimH é o principal fator de ligação da UPEC
 17 às células epiteliais da bexiga, causando apoptose das células epiteliais, sugerindo o papel

1 da fímbria tipo 1 na formação das comunidades bacterianas intracelulares, na invasão das
2 células e na formação de estruturas tipo biofilme (Dhakal, 2008).

3 As adesinas manose-resistentes são altamente diversas nas cepas UPEC, divididas
4 em diferentes tipos com base nas características do receptor e outras propriedades. A adesina
5 Fímbria P é a mais conhecida e tem papel importante na colonização dos rins pela UPEC e
6 possui três subunidades PapF, PapE e PapK (Lüthje, 2014). Com relação a *Pili S*, manose-
7 resistente, esta é composta por uma subunidade principal SfaA, além de três subunidades
8 secundárias SfaG, SfaH e SfaS, esta última responsável pela adesão da bactéria ao epitélio
9 renal, relacionada a infecções mais graves, como a pielonefrite (Mulvey, 2002).

10 Outro grupo de fímbria manose-resistente é a família DR. Essas fímbrias se ligam às
11 células vermelhas e células epiteliais facilitando a colonização e prolongando a sobrevivência
12 bacteriana no trato urinário. Pacientes que carregam a adesina DR possuem maior risco de
13 apresentar ITU recorrente (Karan, 2019).

14 2.1.2 Adesinas-Não-Fimbriais

15 Há uma variedade de adesinas que são classificadas como não fimbriais, entre elas a
16 TosA, que possui papel importante na colonização de *E. coli* na bexiga em modelos animais.
17 Outras adesinas-não-fimbriais são membros da família autotransporte FdeC, UpaH, UpaC,
18 UpaG e Ag43. Este último tem papel importante na patogenicidade da UPEC, responsável
19 pela ligação, colonização e formação de comunidades bacterianas intracelulares e biofilmes
20 levando à estabilidade bacteriana dentro da bexiga (Karan, 2019).

21 2.1.3 Receptores de quelantes de ferro

22 Há uma necessidade vital de aquisição de ferro pela *E. coli* demonstrada pelo
23 “upregulation” dos genes que codificam os sistemas de aquisição de ferro durante as ITUs.
24 Assim, a *E. coli* utiliza múltiplas estratégias para absorver ferro do trato urinário do hospedeiro.
25 Um desses sistemas são os sideróforos que se ligam avidamente ao ferro férrico e se
26 internalizam. Quatro sistemas sideróforos foram descritos em isolados de *E. coli* até o
27 momento: a salmoquelina, aerobactina, enterobactina e yersinibactina. Além disso, há
28 também os receptores de ferro *Hma* e *ChuA*, produzidos pelas cepas UPEC, importantes
29 proteínas que captam a heme dos eritrócitos e transferem para o periplasma. Esses
30 receptores também têm um importante papel na colonização, formação de biofilmes e
31 reservatório de comunidades bacterianas intracelulares (Karan, 2019).

32 2.1.4 Toxinas

1 As toxinas, outro importante fator de virulência das bactérias, são produzidas pelos
2 patógenos e auxiliam na penetração dos tecidos, no acesso aos nutrientes da célula
3 hospedeira, na destruição das células imunes efectoras e evasão da atividade antibacteriana,
4 levando a uma reação inflamatória importante (Lüthje, 2014).

5 6 2.1.4.1 α hemolisina

7 Alfa-hemolisina é uma proteína secretora cálcio-dependente produzida pela metade
8 das cepas UPEC. É capaz de lesar as células da bexiga e dos rins, invadir e estimular a
9 produção de citocinas e induzir a resposta inflamatória (Lüthje, 2014).

10 11 2.1.4.2 Fator necrotizante citotóxico (CNF1)

12 Essa toxina é observada em aproximadamente 30% das cepas UPEC. Ela ativa a Rho
13 GTPases e, como consequência, induz mudanças celulares e rearranjos no citoesqueleto.
14 Essa toxina tem um papel na ligação e invasão da UPEC nas células hospedeiras. Ela exerce
15 também efeito inibitório sobre os neutrófilos, reduzindo a fagocitose e a atividade
16 antimicrobiana (Lüthje, 2014).

17 18 2.1.4.3. Autotransporte serina protease

19 Atuam como adesinas, porém podem agir como toxinas. As toxinas Sat e Vat
20 autotransporte são um tipo de serina protease que possui efeitos letais sobre as células da
21 bexiga e do rim *in vitro* e causa danos glomerulares e vacuolização renal em modelos animais
22 (Karan, 2019).

23 24 2.2 Lipopolissacarídeos (LPS) e cápsula

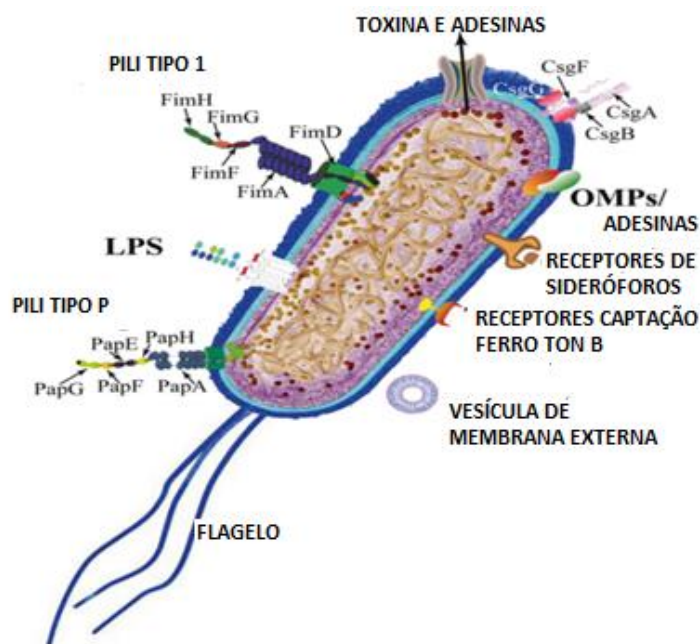
25 O LPS é o maior componente da célula bacteriana presente em bactérias Gram-
26 negativas e é extremamente imunogênico. É um componente estrutural da parede celular e
27 geralmente não é secretado. Contudo, durante o processo de divisão celular, pequenas
28 quantidades de LPS podem ser liberadas levando ao processo de morte celular. As moléculas
29 de LPS contribuem para a integridade das células bacterianas, além de serem essenciais para
30 a função de barreira protetora da membrana externa da parede celular, principalmente contra
31 agentes nocivos à própria bactéria (Zariri, 2015).

32 Estudos mostram que LPS e os polissacarídeos podem ser importantes fatores de
33 virulência por fazer evasão das cepas UPEC do sistema imune como a opsonização e o
34 sistema complemento, além da evasão e morte pelos antimicrobianos. Embora a estrutura da
35 LPS de diferentes bactérias apresente uma enorme variedade, principalmente quanto ao

1 tamanho e composição da cadeia polissacarídica, manifesta uma estrutura comum (ou
 2 genérica), que consiste no lipídio hidrofóbico A, localizado no folheto externo da membrana
 3 externa. O antígeno O é coberto por um folheto capsular (antígeno K). Há uma
 4 heterogeneidade entre os antígenos O e K das UPEC, por exemplo, os antígenos O1, O2, O4,
 5 O6, O18, O25 e O75 observados em cepas UPEC (Karan, 2019).

6 Alguns antígenos capsulares, como o K1 e o K5, possuem um mimetismo molecular
 7 com os tecidos do hospedeiro, neutralizando a resposta humoral contra os patógenos
 8 urinários (Lüthje, 2014; Karan, 2019). A figura 2 mostra as adesinas e estruturas móveis
 9 das *E. coli*.

10
 11 FIG 2: ADESINAS E ESTRUTURAS MÓVEIS
 12



13
 14 Fonte: Adaptado de Maria Terzilli. 2017
 15

16 3. TRATAMENTO

17 O tratamento das ITUs não complicadas é realizado de maneira empírica, pois a
 18 urocultura não é mandatória no primeiro episódio e os antibióticos prescritos seguem padrões
 19 de sensibilidade/resistência local ou regional, ou ainda, padrões sugeridos na literatura
 20 internacional, através de *guidelines*, como o “*International Clinical Practice Guideline for the*
 21 *treatment of acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in women: 2010 update by The*
 22 *Infectious Diseases Society of America and European Society for Microbiology and Infectious*
 23 *diseases*” (Gupta, 2011).

1 Uma vez que o teste microbiológico não é realizado como rotina nas ITUs não
2 complicadas, a sensibilidade aos antimicrobianos pode ser sub-representada, como mostra
3 estudo realizado na Alemanha, onde pacientes com sintomas de ITU foram classificadas
4 como complicadas e não complicadas, sendo que a resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim
5 para os quadros não complicados foi de 13%, enquanto para os quadros classificados como
6 complicados foi de 24,4% (Klimberg A, 2018).

7 Estudos relatam que a resistência da *E. coli* aos antimicrobianos tem aumentado
8 expressivamente, principalmente aos antibióticos de primeira escolha no tratamento de
9 infecções urinárias não complicadas, como ampicilina, sulfametoxazol e cotrimoxazol
10 (Kahlmeter et al., 2011).

11 Vários *guidelines* internacionais recomendam o uso de nitrofurantoína e fosfomicina
12 para infecções não complicadas, ficando as quinolonas para uma segunda escolha devido
13 aos efeitos colaterais severos (ruptura de tendão, aumento do intervalo QT e alterações do
14 sistema nervoso central). Não se recomenda o uso de cotrimoxazol quando a prevalência da
15 resistência a esse antimicrobiano for maior do que 20% (Gupta, 2011; Cueto, 2017; Kang,
16 2018). No meio estudado, o sulfametoxazol-trimetoprim é a primeira escolha para o
17 tratamento de cistite simples, seguido da ciprofloxacina (quinolona) e a nitrofurantoína (Guia
18 da Unimed, 2019).

19 No ano de 2020, a Sociedade Brasileira de Infectologia, a FEBRASGO (Federação
20 Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia), a Sociedade Brasileira de Urologia e a Sociedade
21 Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial se uniram e publicaram
22 recomendações para o manejo clínico da infecção urinária (cistites) em pacientes grávidas e
23 não-grávidas. Tais recomendações trazem uma revisão dos perfis de sensibilidade de estudos
24 realizados em São Paulo e Curitiba, mostrando que o SMX-TMP possui resistência próxima a
25 40% e que a nitrofurantoína mantém sensibilidade acima de 90%, sugerindo o tratamento de
26 primeira escolha para mulheres não-grávidas à fosfomicina em dose única e à nitrofurantoína
27 por cinco dias. Como segunda escolha, a cefuroxima e a amoxicilina-clavulanato por sete
28 dias, contraindicando o uso de quinolonas para o tratamento de cistite pelos efeitos adversos
29 e resistência (de Rossi, 2020).

30 Em infecções por enterobactérias ESBL, onde *E. coli* é uma das mais prevalentes, o
31 *Infectious Diseases Society of America Antimicrobial Resistant Treatment Guidance Gram-*
32 *Negative Bacterial Infections* sugere o uso de nitrofurantoína e SMX-TMP como uma
33 alternativa segura e eficaz. O uso de fluoroquinolonas é desencorajado caso haja
34 disponibilidade de um outro agente sensível, evitando a toxicidade das quinolonas. Os
35 aminoglicosídeos possuem boa penetração renal e são uma boa alternativa como dose única

1 em cistite simples. A fosfomicina oral é uma alternativa para o tratamento apenas da *E. coli*
2 ESBL, pois a presença do gene *fosA*, intrínseca a *K. pneumoniae* e outras Enterobactérias,
3 pode levar à falha terapêutica (Tamma, 2020).

4

5 4.RESISTÊNCIA BACTERIANA

6 Dentre as possíveis causas de falha no tratamento das infecções, a resistência
7 bacteriana aos antibióticos é, sem dúvida, uma das mais importantes. A resistência aos
8 antibióticos tem aumentado em níveis alarmantes em todas as partes do mundo. Novos
9 mecanismos de resistência surgem e se expandem globalmente, ameaçando o tratamento de
10 doenças infecciosas comuns (Who, 2020).

11 A resistência antimicrobiana não é um fenômeno recente e foi descrita pela primeira
12 vez quatro anos antes da descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928. O
13 antimicrobiano em questão era o chamado Salvarsan, utilizado no tratamento de sífilis de
14 1910 a 1940 (Stekel, 2018).

15 Os fatores de risco de ITU por uma bactéria Gram-negativa resistente incluem ter 60
16 anos ou mais, história de ITU anterior, presença de cateter urinário, doenças crônicas,
17 hospitalização e/ou uso recente de antibiótico e viagem recente. Pacientes com ITU por
18 bactérias resistentes possuem maior risco de hospitalização, de permanecer mais tempo no
19 hospital, manifestar falha no tratamento antibiótico e evoluir para sepse de foco urinário
20 (Bader, 2017).

21 Foram descritos dois tipos de resistências: as primárias, em que o micro-organismo é
22 resistente naturalmente a um antibiótico, porém susceptível a outro; e as resistências
23 adquiridas, em que a bactéria é capaz de resistir a um antibiótico que já foi eficaz contra ela,
24 ou seja, aquela originada a partir de mutações nos próprios genes ou pela aquisição de genes
25 de resistência de outras bactérias (conjugação: plasmídeo e transposons), via bacteriófago
26 (transdução) ou via ambiente (transformação). De acordo com a inativação do antibiótico, os
27 principais mecanismos de resistência conhecidos podem ser classificados como: enzimas que
28 degradam ou modificam antibióticos; redução da permeabilidade da membrana externa;
29 sistemas de efluxo hiperexpressos e alteração do sítio de ligação (Nicolaou KC, 2018).

30 A produção de betalactamase é o principal mecanismo de resistência aos beta-
31 lactâmicos pelas Enterobactérias. Vários gêneros de bacilos Gram-negativos, como
32 *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescense*
33 *providencia* spp., possuem a betalactamase cromossomal AmpC cefalosporinase fortemente
34 induzível por amoxicilina, ácido clavulânico, cefoxitina, cefalosporinas de primeira geração e
35 alguns carbapenêmicos, o que resulta em resistência intrínseca (Ruppé, 2015).

1 Essas enzimas bacterianas protegem os micro-organismos contra a ação de
2 antibióticos β -lactâmicos como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, hidrolisam os
3 anéis β -lactâmicos, tornando-os drogas inertes. De acordo com a classificação de Ambler,
4 baseada na identificação da sequência de aminoácidos, as betalactamases podem ser
5 divididas em quatro diferentes classes moleculares (A, B, C e D). As classes A, C e D usam
6 resíduos de serina na atividade catalítica para a inativação das drogas. Já a classe molecular
7 B é representada por metaloenzimas, que requerem zinco como cofator para sua ação
8 catalítica (Rasmussen, 2006).

9 A prevalência de *E. coli* ESBL (b-lactamases de espectro estendido) tem aumentado
10 significativamente. Estudo realizado em Brasília entre julho de 2013 e abril de 2014, em 324
11 amostras de *E. coli* isoladas de mulheres acima de 20 anos, encontrou 7,1% de ESBL, todas
12 produtoras da enzima CTX-M. Nesses isolados o *sequence type* encontrado foi ST131 e o ST
13 648, associado a cepas pandêmicas resistentes (Gonçalves, 2016). Em crianças abaixo de
14 15 anos, a prevalência de ESBL em infecção de trato urinário foi de 2,1% em estudo realizado
15 em São Paulo, em 847 amostras de urina realizadas em atendimento na Emergência (Lo,
16 2019). Estudo realizado por dez anos em um hospital oncológico no México encontrou 50%
17 dos isolados de infecções adquiridas no hospital e 20% das infecções adquiridas na
18 comunidade possuíam perfil ESBL (Córdova, 2014). Swamy et al. estratificaram a incidência
19 por faixa etária de 2005 a 2009 e encontraram uma tendência estatisticamente significativa
20 na incidência ao longo do tempo para infecções *E. coli* ESBL no grupo 18 a 64 anos (7-15
21 casos por 100.000 pessoas ano; $p=0.03$) e no grupo 65-79 anos (variando de 28-73 casos por
22 100.000 pessoas ano; $p=0.02$).

23 As quinolonas são o grupo de antibióticos mais prescrito para o tratamento das ITUs
24 (Benko R, 2019). Estudo realizado na Suíça mostra que as quinolonas foram prescritas em
25 78% dos casos diagnosticados como cistite e o SMX-TMP em apenas 22% (Stuck, 2012). As
26 fluoroquinolonas são antibióticos que podem ser utilizados tanto por via oral ou parenteral,
27 têm boa concentração em trato urinário, porém a resistência a essas drogas pode levar a
28 sérias consequências clínicas, pois se apresentam como uma das poucas alternativas para o
29 tratamento de infecções graves por *Salmonella spp* (Fasugba, 2015).

30 Os mecanismos descritos de resistência às quinolonas eram exclusivamente
31 cromossômicos (DNA girase e topoisomerase IV), porém, a partir de 1998, mecanismos de
32 resistência transferíveis têm sido descritos na literatura, como *qnrA*, um gene distribuído
33 mundialmente e presente em diferentes micro-organismos, principalmente
34 *Enterobacteriaceae*. A presença do gene está relacionada à aquisição de resistência a
35 quinolonas com maior facilidade quando comparada àqueles que não o possuem (Ruiz, 2012).

1 O gene *qnrA* foi seguido pela descoberta de outros genes plasmidiais como o *qnrS*, *qnrB*,
2 *qnrC*, *qnrD*, e mais recentemente o *qnrVC*. Além do QNR, um segundo mecanismo plasmidial
3 foi descoberto, a modificação da quinolona por um aminoglicosídeo acetiltransferase-AAC (6')
4 -Ib-cr. Além desses, existe um terceiro mecanismo chamado de resistência à quinolona
5 mediada por plasmídio (PmQR), que é uma bomba de efluxo plasmídio mediada *QepA 1* e
6 *OqxAB* (Hooper DC, 2015).

7 Clinicamente, o acúmulo de genes PMQR e mutações QRDR confere alta resistência
8 às quinolonas. Estudo realizado com 440 enterobactérias isoladas de ITU no Egito, de julho
9 de 2016 a março de 2017, mostrou que 32,5% eram resistentes a quinolonas e 20,5%
10 resistentes a fluoroquinolonas. O QNR B foi o mais frequentemente isolado (62,9%). A
11 presença de dois genes PMQR em 46,9% das amostras levou à alta resistência à
12 ciprofloxacina (MICs > 128 µg/mL) (Kotb DN, 2019).

13

14 JUSTIFICATIVA

15 A infecção do trato urinário (ITU) é uma das mais comuns indicações de uso de
16 antibióticos para mulheres jovens e saudáveis. O principal agente responsável por essas
17 infecções é a *E. coli*, em torno de 70% a 80% dos casos.

18 O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos comumente utilizados para o tratamento
19 das infecções causadas por esses patógenos na comunidade é desconhecido em nosso meio,
20 assim como a prevalência de bactérias produtoras de betalactamases de espectro estendido
21 e o mecanismo de resistência a quinolonas.

22 O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos
23 de *E. coli* isoladas em urinas de mulheres na comunidade de Londrina e caracterizar por
24 biologia molecular algumas cepas produtoras de betalactamases de espectro estendido e
25 resistência a quinolonas na comunidade.

26

27 5. Objetivos

28

29 5.1 Objetivo Geral

30 Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e caracterizar molecularmente *E.*
31 *coli* isoladas de uroculturas de mulheres atendidas em Unidades Básicas de Saúde e de
32 Pronto Atendimento no município de Londrina.

33

34 5.2. Objetivos específicos

35

1 5.2.1. Determinar o perfil de sensibilidade de *E. coli* aos antimicrobianos de primeira
2 escolha no tratamento de ITUs não complicadas.

3 5.2.2. Correlacionar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos com a faixa etária.

4 5.2.3. Caracterizar o mecanismo molecular de resistência às quinolonas de *E. coli* nas
5 amostras resistentes às três quinolonas testadas.

6 5.2.4. Associar o perfil filogenético de *E. coli* resistentes às quinolonas aos
7 antimicrobianos.

8 5.2.5. Determinar os mecanismos de resistência aos betalactâmicos e quinolonas de
9 amostras selecionadas para o sequenciamento.

10 4.2.6. Conhecer os sorogrupos e *sequence type* das amostras urinárias comunitárias.

11 12 6. Materiais e Métodos

13 14 6.1. Aspectos Éticos

15 O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de
16 Londrina por envolver seres humanos, tendo parecer favorável em 05/08/2016, sob o número
17 CAAE: 56869816.0.0000.523 (em anexo). As amostras das uroculturas foram coletadas no
18 Laboratório CentroLab, responsável pela realização de todos os exames de urina do
19 município. A autorização da Secretaria de Saúde de Londrina se encontra em anexo.

20 21 6.2. Delineamento

22 23 6.2.1 Local do Estudo

24 O estudo foi realizado com a colaboração do laboratório CentroLab, responsável por
25 realizar todas as uroculturas do município de Londrina, abrangendo todas as Unidades
26 Básicas de Saúde e Unidades de Pronto Atendimento.

27 Todas as uroculturas positivas foram encaminhadas ao laboratório de microbiologia do
28 Hospital Universitário de Londrina para a realização de antibiograma e pesquisa de
29 mecanismo de resistência.

30 31 6.2.2 Tipo do Estudo

32 Estudo transversal

33 34 6.2.3 População do Estudo

35 Critérios de Inclusão

- 1 • Uroculturas positivas de mulheres em qualquer idade.
- 2 • Urocultura positiva com contagem $>10^5$ Unidades Formadoras de Colônias/ml.

3 Critérios de Exclusão

- 4 • Presença de mais de dois micro-organismos na urocultura.
- 5 • Sexo masculino.

6 Dados Demográficos

7 Dados como idade, local do atendimento, ser gestante ou não também foram coletados
8 do prontuário eletrônico.

9 Foram selecionadas todas as uroculturas positivas, respeitando os critérios de inclusão,
10 realizadas pelo CentroLab num período de 12 meses (1º de junho de 2016 a 1º de junho de
11 2017).

12 As amostras de urocultura positivas foram encaminhadas ao Laboratório de
13 Microbiologia do Hospital Universitário de Londrina para a realização do estudo dos
14 mecanismos de resistência e perfil filogenético descritos abaixo.

15 As amostras resistentes às três quinolonas (ácido nalidíxico, norfloxacino e
16 ciprofloxacino) foram encaminhadas ao laboratório de Microbiologia da Universidade de São
17 Paulo para avaliação molecular dos genes de resistência.

18 6.2.4. Coleta das amostras no Centrolab

19 As amostras de urocultura positivas foram coletadas, identificadas e estocadas. Para
20 identificação e testes de sensibilidade aos antimicrobianos foi utilizado o sistema
21 automatizado VITEK® 2 (bioMérieux, France). Testes de susceptibilidade aos seguintes
22 antimicrobianos foram realizados: amicacina (AST-N054), ampicilina, amoxicilina/ácido
23 clavulânico, aztreonam (AST-N054), cefalexina, cefepime, cefotaxima, ceftazidima, ceftoxitina,
24 cefuroxime, ciprofloxacina, norfloxacina, ertapenem, gentamicina, meropenem, ácido
25 nalidíxico, nitrofurantoína, piperacilina/tazobactam e sulfametoxazol-trimetoprim. A
26 interpretação da susceptibilidade utilizada foi do *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)*
27 *breakpoints*.

28

29 6.2.5. Descrição das metodologias moleculares

30

31 6.2.5.1 PCR Multiplex para genes Qnr

32 Para investigar a presença de genes para genes qnrA-, qnrB- e qnrS, foi realizada a
33 PCR Multiplex, conforme descrito por Cattoir (2007). Cada reação de 25µL contém: 2µL DNA
34 molde, 1µL (0,8pcmol) de cada *primer*, 0,5µL (10Mm) da mistura de dNTP (Invitrogen), 0,2µL
35 (5U/µL) *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 2,5µL do tampão 10X (Invitrogen), e 1,25µL de

1 MgCl₂ (2,5Mm) (Invitrogen). As condições do ciclo foram: desnaturação do DNA a 94°C por
2 10 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto e 72°C por 1
3 minuto, e uma elongação final a 72°C por 10 minutos.

4 Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,0% (Sigma-Aldrich Ltd.,
5 Madrid, Spain), as corridas eletroforéticas ocorreram em tampão 1X Tris-Borato-EDTA por 40
6 minutos a 80V. Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídio por 15 minutos
7 e visualizados na luz ultravioleta.

8

9 6.2.5.2 Tipagem molecular por ERIC-PCR

10 A tipagem por ERIC-PCR foi realizada utilizando-se o *primer* ERIC-2 e metodologia
11 previamente descrita (Versalovic et al., 1991). Foram utilizados 2,5 µL do *primer* (10 pmol/µL),
12 2,5 µL de tampão (10X), 2,0 µL de MgCl₂ (50mM), 2,0 µL de dNTP (10 mM), 2,5 µL do *primer*
13 (10 pmol/µL), 1,0 µL de Taq (1U/µL), 2,0 µL de DNA (500 ng) e 13,0 µL de água (q.s.p. 25
14 µL). O DNA foi desnaturado a 94°C por 10 minutos e submetido a 30 ciclos com as etapas de
15 desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 8
16 minutos e extensão final a 72°C por 16 minutos.

17 Os produtos dessa reação foram analisados em gel de agarose a 1,5%, previamente
18 adicionado de brometo de etídio (0,08 µL/100 mL). A eletroforese foi realizada a 100 volts, por
19 120 minutos. Na aplicação no gel de agarose foram adicionados 2 µL de solução de azul de
20 bromofenol. O marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen) foi aplicado no gel para
21 determinar o tamanho dos fragmentos obtidos.

22

23 6.2.5.3. Amostras enviadas para a realização do sequenciamento

24 Descrição - Sequenciamento completo do genoma

25 Para a realização do sequenciamento, os DNAs das amostras foram extraídos por
26 meio do kit de extração de DNA genômico (Invitrogen®, Carlsbad, CA), de acordo com as
27 instruções do fabricante. Os DNAs extraídos foram encaminhados para o Centro de
28 Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP), da Universidade de São Paulo (USP). Após o
29 sequenciamento, foi utilizado o programa CLC Genomics Workbench (CLC bio®) para a
30 montagem dos genomas de cada amostra. As leituras dos genomas foram realizadas em
31 colaboração com o Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas da
32 USP, São Paulo. Os genomas montados foram analisados pelo Center for Genomic
33 Epidemiology (CGE) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>), para a análise quanto ao MLST,
34 sorotipo, resistência antimicrobiana e virulência, utilizando, respectivamente, as bases de
35 dados MLST 2.0, SerotypeFinder 2.0, ResFinder 3.2 e VirulenceFinder 2.0. Os FASTQs

1 gerados foram depositados no National Center for Biotechnology Information (NCBI), sob o
2 bioproject PRJNA578368.

3

4 6.2.5.4. Análise filogenética

5 A classificação em grupos filogenéticos foi realizada de acordo com o método de
6 Clermont et al. (2013). Usando esse método, os isolados foram classificados em quatro
7 grupos (A, B1, B2 ou D), baseados na presença de dois fragmentos dos genes *chuA* e *yjaA*,
8 e um fragmento de DNA (TSPE4.C2), (genes: *chuA*, *yjaA*, TSPE4.C2) verificado pelo método
9 de multiplex PCR.

10 O lisado fervido de cultura de 24h foi usado como fonte de DNA para o estudo. Para a
11 reação de PCR, foram utilizados 2,5 uL de tampão 10 vezes concentrado, 0,5 uL de dNTP
12 (2,5 mM), 0,5 pM/uL dos três pares de *primer*, 0,25 uL de taq polimerase (5U) e 2 uL de DNA,
13 completando a mistura para 25 uL com água ultrapura para cada amostra. O material foi
14 submetido a um ciclo de 95°C por 4 minutos e 30 ciclos de 5s a 94°C, 10s a 59°C, e uma
15 extensão final de 5 min a 72°C. Posteriormente, o produto de amplificação foi visualizado em
16 gel de agarose 2% contendo brometo de etídio, através do transluminador com luz de
17 ultravioleta.

18

19 6.2.5.5. Fatores de virulência

20 **Identificação genotípica dos principais fatores de virulência**

21 Os *primers* utilizados para a amplificação de fragmentos de genes responsáveis pelas
22 características de virulência foram: *kps II*, *FimH*, *felA*, *PapG*, *SfaS*, *lutA*, *Hly*, *CvaC*, *TraT*,
23 conforme Johnson (2000), Tsh (Dozois, 2000), *Iss* (Foley, 2000), *PapC*, *Afa I*, *Afa III*, *SfaDE*
24 (Le Bouguéneq, 1992, 1993, 1992, 1996).

25 A PCR foi realizada num volume total de 25 ul contendo 5 ul do DNA da amostra, 20
26 pmol de cada *primer*, 200 uM de deoxinucleotídeos, tampão de amplificação 10 X, 2,5U Taq
27 DNA polimerase e água ultrapura para completar o volume. O material foi submetido a 30
28 ciclos específicos a cada *primer*. Posteriormente, o produto de amplificação foi visualizado em
29 gel de agarose contendo brometo de etídio, através do transluminador com luz de ultravioleta.

30

31 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

32 As variáveis contínuas foram expressas em médias e desvio-padrão (distribuição
33 gaussiana), medianas e interquartis (distribuição gaussiana) e as variáveis categóricas foram
34 expressas como proporção.

1 Análise estatística descritiva foi utilizada para as variáveis relevantes. As variáveis
2 categóricas foram comparadas utilizando-se teste Qui-quadrado de Pearson com correção de
3 continuidade de Yates e teste exato de Fisher quando apropriado. Nível de significância de
4 5% ($p= 0,05$).

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

1 8. RESULTADOS

2 ARTIGO 1

3 Susceptibility to first choice antimicrobial treatment for urinary tract infections to *Escherichia*
4 *coli* isolates from women urine samples in community South Brazil

5
6 **Autores:** Tano, Z; Kobayashi RTT; Candido EP., Buck JD., Perugini LF., Vespero, EC;
7 Pavanelli WR

8 **Key Words:** Urinary Tract Infection, bacteriuria, drug resistance, Uropathogenic *Escherichia*
9 *coli*

10 **Abstract:** *E. coli* is the main pathogens of Urinary Tract Infection. It is important to be aware
11 the local epidemiological data for an appropriate initial treatment. Resistance to antimicrobial
12 agents has increased, especially to first-choice antibiotics in the treatment of cystitis.

13 **Objective:** To characterize the profile of sensitivity to antimicrobials to *E. coli* isolated from
14 urocultures of women treated at Basic Health Units and Emergency Care Units in the city of
15 Londrina during a period of 12 months (June 1, 2016 to June 1, 2017). **Results:** 56,555 urine
16 cultures were performed in the period, of which 8,832 were positive, of which 5,377 were
17 women. Of these samples, 4.7% was *E. coli* producing extended-spectrum beta-lactamases
18 (ESBL) and 15.5% resistant to quinolones. SMX-TMP was resistant in more than 30% of the
19 samples in all age groups. Among quinolone-resistant isolates, resistance to cephalothin,
20 ampicillin and sulfamethoxazole-trimethoprim was greater than 60%. Nitrofurantoin was the
21 only antimicrobial that showed 90% of sensitivity. **Conclusion:** The antimicrobials sensitivity
22 profile was similar to that reported in the literature, with SMX-TMP resistance greater than 30%
23 in the studied samples. Nitrofurantoin maintains high sensitivity rates greater than 90%.
24 Resistance to quinolones increases proportionally with age, as well ESBL.

25 **Background:** Urinary Tract Infection (UTI) is the most common outpatient infection, and the
26 second more frequent, after respiratory tract infection (Schappert SM, 2007). Women is more
27 affected because the shorter distance between urethra and bladder, makes bacterial
28 colonizers ascend before they are removed by micturition (Foxman, 2010). Symptomatic
29 infection is more frequent in women age 15-29 years with incidence 12,6% compared to men
30 3% in USA (Johnson, 1991).

31 Among healthy women age 18-39 years 80% UTI are caused by *E. coli*. Empirical
32 treatment should be target it, however, in recent years significant variations in antimicrobial
33 susceptibility have been observed in several countries, with progressive emergence of
34 resistance to fluoroquinolones and other antibiotics commonly used in the community-acquired

1 empirical treatment of UTI. Presence of extended-spectrum beta-lactamases in Latin America
2 increased from 1,7% to 7,1 – 12,5%(Cordoba, 2017; Lee, 2010; Cunha 2019).

3 Since 2011, the Infectious Diseases Society of America (IDSA) recommended that
4 trimethoprim-sulfamethoxazole (cotrimoxazole), nitrofurantoin, fosfomicin, or pivmecillinam
5 could be used if local resistance rates of uropathogens causing acute uncomplicated urinary
6 tract infection do not exceed 20% or if the infecting strain is known to be susceptible to these
7 drugs (Gupta, 2011). Currently, guidelines recommend fosfomicin trometamol and
8 nitrofurantoin as the first choice treatment and cotrimoxazol in third option (Lee, 2018). In
9 Korea, nitrofurantoin, fosfomicin and pivmecillinan is the choice for treatment of uncomplicated
10 UTI and cotrimoxazol could be used when the susceptibility test is available and confirms drug
11 sensivity (Kang, 2018).

12 The choice of antibiotics in patients with suspected uncomplicated UTI should be based
13 on up-to-date surveillance data of patients from primary care. Thus, prospective surveillance
14 of resistant patterns of uropathogens from all patients attending primary care is crucial for
15 guiding first and second line antibiotic selection (Cordoba, 2017).

16 The aim of this study was evaluate the antimicrobial susceptibility profile for first line
17 treatment for UTI from *E.coli* isolated in urine samples of women in community and presence
18 of extended spectrum beta lactamase.

19 Material and Methods

20 A cross sectional from June 2016 to June 2017, all urine samples collected in the Basic
21 Health Units and Emergency Departments in Londrina city, State Paraná, Brazil, were sent to
22 a Central Laboratory where the identification and susceptibility tests were performed. The
23 samples were collected by clean-catch midstream of the first urine of the day and ten microliter
24 of urine was inoculated in chromogenic media CPS ID 3 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France),
25 and incubated overnight at 36°C. The criteria to consider a cultures positive were growth of a
26 pure culture and colony counts $>10^5$ CFU/mL (Anvisa 2013). Bacteria were identified
27 according to the characteristics developed in CPS ID 3 media or using the Vitek[®] 2 automated
28 system (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Male culture and others bacterial non *E. coli* were
29 excluded. Data such as age and pregnancy were analyzed through the WebSaúde system of
30 the Londrina prefecture.

31 Susceptibility test

1 Susceptibility test was performed using AST238 panel on the VITEK® 2 (BioMérieux, Marcy-
2 l'Etoile, France) system. The following antibiotics was tested: amikacin (AST-N054 only),
3 ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, aztreonam (AST-N054 only), cefalexin, cefepime,
4 cefotaxime, ceftazidime, ceftioxin, cefuroxime, ciprofloxacin, norfloxacin, ertapenem,
5 gentamicin, meropenem, nalidixic acid, nitrofurantoin, piperacillin, piperacillin/tazobactam, and
6 trimethoprim. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints were used for the
7 interpretation of susceptibility. Isolates were classified as susceptible (S), intermediately
8 resistant (I) or resistant (R) according to the respective MIC breakpoints ($\mu\text{g/mL}$): ampicillin,
9 ≤ 8 , 16, ≥ 32 ; amoxicillin-clavulanic acid, $\leq 8/4$, 16/8, $\geq 32/16$; cefuroxime axetil, ≤ 4 , 8-16, ≥ 32 ;
10 norfloxacin, ≤ 4 , 8, ≥ 16 ; ciprofloxacin, ≤ 1 , 2, ≥ 4 ; cotrimoxazole $\leq 2/38$, $\geq 4/76$; nitrofurantoin, ≤ 32 ,
11 64, ≥ 128 ; fosfomycin was evaluated by diffusion disk (Oxoid Cambridge –UK). The presence
12 of ESBL were also subjected to the Chrom ID BLEE® agar plate test (bioMérieux- Marcy l'Etoile,
13 France).

14 Statistical analysis

15 The results were collected and analysed using SPSS 17. For analysis isolated was divided in
16 four groups of age: <15, 15- 45, 46- 59, > 60 years old. A two-sided chi-squared test and Exact
17 Fisher test was used to assess differences in resistance by age group and for resistance
18 profiles. Differences in the prevalence of resistance between age groups were determined by
19 calculation of odds ratios with 95% confidence intervals with p-value <0,05. The study was
20 approved by Ethics and Research Committee of the State University of Londrina CAAE
21 56869816.0.0000.5231 and authorized by the Health Department of Londrina, Paraná.

22 Results

23 A total of 56,555 microbiologic tests were performed, 8,382 were positive. Of this
24 5794 (72,2%) was *E. coli*. Women were responsible for 5,377 positive culture, 10% were
25 pregnant, as shown figure 1. Extended-spectrum beta-lactamase production was present in
26 4.7% (n=255) of samples.

27 The average age was 47 years old (ranging from 0 to 101 years). In this study 1777
28 (33%) were 60 years old with ESBL higher frequency (8.3%). Susceptibility to fosfomycin
29 was 98,3% for samples resistant to three quinolones, whose susceptibility was 73.3%, 85.7%
30 and 85.9% for nalidixic acid, ciprofloxacin and norfloxacin, respectively.

31 The lowest susceptibility was observed for cephalotin with 51.8% followed by ampicilin with
32 54%. While the greatest susceptibility was observed for Amicacyn, Ertapenem and
33 Meropenem with 99.7%.

34 **Susceptibility to first line antimicrobial treatment for ITU according to age**

1 Cephalotin (48,1%) and ampicillin (52%) have de lowest sensivity pattern, regardless of age.
2 Trimethoprim sulfamethoxazole has resistance greater than 30% in all age groups, as well as
3 cefuroxime has sensibility greater than 90%. Susceptibility to gentamicyn, amoxicilin
4 clavulanic, piperacillin-tazobactan, cephalotin, cefepime, ceftriaxone, cefuroxime, nalidixic
5 acid, norfloxacin, ciprofloxacin and TMP/SMX had a significant asociation with age. In age 15-
6 45, quinolone maintain 90% of sensivity, except for nalidixic acid that has 78%. **Table 1** shows
7 antimicrobial susceptibility of *E. coli* isolated from women acordding to age range.

8 Resistance to three quinolones was 15,5%. The sensitivity profile to others first-line
9 antimicrobials in treatment decreased dramatically, mainly cephalotin, ampicillin and
10 Trimethoprim sulfamethoxazole which has only 40% sensibility in this samples. The only first-
11 line antimicrobial that maintains sensitivity greater than 90% in these samples was
12 nitrofurantoin, regardlles age. The presence of ESBL strains does not have significant
13 association with age when the strain is resistant to three quinolones.

14 **Table 2** - Show the susceptibility of antimicrobial agents in samples resistant to three
15 quinolones (ciprofloxacin, norfloxacin and nalidixic acid).

16

17 Discussion

18 The Cross sectional study shows the antimicrobial sensitivity profile of urocultures
19 colected from women in Basic Health and Emergency Units carried out in a city in South Brazil,
20 that has 537.377 inhabitants, localized in 23 ° 18 '36 "S 51 ° 09 '46 "O. *E. coli* was the most
21 common pathogen isolated, as well as between women age 15-45 had the most positive
22 culture, the same profile as noted by other authors(Aypak C, 2009; Kung CH, 2015; Foxman
23 B, 2010; Rocha JL, 2012). In this study, men were excluded from analysis because they had
24 complicated urinary tract infections, which did not contemplate the objective, as also performed
25 by Dubbs et al. Reu at al 2019. In study realized whith outpatients attended by the publichealth
26 system, in Curitiba, also relatated that lowest *E. coli* frequencies were found between pregnant
27 women, men, and boys (Reu, 2018). These data suggest that although *E. coli* is the most
28 common uropathogen, its distribution may vary with sex and patient physiological status being
29 lower in men.

30 Resistance to SMX/TMP was greater than 30% in this study, regardless of age, when
31 32.5% of samples from patients over 60 years old showed resistance.. According Gupta and
32 col. 2011, SMX/TMP is recommended as the first line of treatment for uncomplicated UTI,
33 however, resistance should not be greater than 20%. Resistance varies geographically,
34 including within the country itself, like shows Cunha et al 2016 that demonstrated resistance

1 to cotrimoxazol 50,6% in northeastern Brazilian Capital, while in India in 2013 resistance was
2 52%, and in 2017 it increased up to 59.6% (Prasada, 2019). However in EUA study by Yamaji
3 et al 2018 showed that frequencies of TMP-SMZ resistance in UPEC isolates obtained from
4 outpatients with UTI symptoms in 1999–2000 and in 2016–2017 did not significantly change
5 (resistance slightly increased from 16.9% to 17.1%). Studies where TMP-SMZ resistance to is
6 greater than 35% guide the replacement and / or withdrawal of this antibiotic from the first line
7 treatment of uncomplicated UTI (Guneysel O, 2016). Currently, guidelines have recommended
8 use of fosfomicin–trometamol for the first-line treatment and pivmecillinam as second choice
9 (Caron, 2018).

10 In this study quinolone resistance is more than 10% in samples of women age 46 or
11 more and the resistance to three quinolones together are 15,5% and is associated with older
12 age, similar to literature. Quinolone is the most frequently antimicrobial selected for treatment
13 for uncomplicated UTI in many countries (Stuck, 2012; Benko, 2019). Risk factors for
14 resistance is been older than 60, obstructive uropathy, recurrent UTI history and use of
15 quinolone in the past three months (Seija, 2014; Benko, 2019; Kobayashi, 2016). Despite FDA
16 box warning about quinolone use in 2016, the rate of prescriptions do not change over years.
17 The innapropriated use was more frequent in treatment of uncomplicated urinary tract infection.
18 The overuse and side effects of quinolone may be incorporated in decision of antimicrobial
19 treatment of all infections, like upper respiratory infection, uncomplicated UTI and abdominal
20 infection (Cewart, 2019; Bratsman, 2020).

21 Nitrofurantoin resistance is very low, less than 5% in all age groups, even among
22 samples resistant to three quinolone 7,6% in age >60. The same pattern was observed in a
23 study from Rio Grande do Norte, when 6,6% of *E. coli* was resistant to nitrofurantoin (n=653)
24 (Cunha,2016). Likewise, a retrospective analysis performed by Sanchez et al (2016) showed
25 that in the United States nitrofurantoin retains a high level of antibiotic activity against urinary
26 *E.coli*. India and Mexico resistance to nitrofurantoin are among the highest reported 13,3%
27 and 12,7% repectively (Ramírez-Castillo, 2019; Prasada, 2019). These results show that
28 nitrofurantoin remain the treatment of choice for uncomplicated UTI, although it should not be
29 used for the treatment of pyelonephritis since its concentration in the renal parenchyma is too
30 low (Kot, 2019).

31 In this study fosfomicin was tested for samples that was resistance for three
32 quinolones show high susceptibility. Study from India with 7,295 isolates obtained from
33 patients with uncomplicated UTI shows that antimicrobial with greater susceptibility is
34 fosfomicin and nitrofurantoin (Batra P, 2020). Other countries in Europe and EUA reported
35 high rates susceptibility for fosfomicin too (Hirsch EB, 2015; Kresken M., 2015). This results

1 led to fosfomycin as the first choice for the treatment of UTI (Kang C, 2018). In Brazil fosfomycin
2 is an expensive antimicrobial and is not offered free in the health system, as SMX/TPM,
3 nitrofurantoin, norfloxacin and ciprofloxacin, in this context, exposure to this antimicrobial is
4 a fundamental factor in the selection of *E. coli* resistant.

5 Among beta lactamic used for uncomplicated UTI amoxicilina clavulanic acid had low
6 resistance regardless age, 12,1%, 11,1%, 11,8% and 14,6%, <15, 15-45, 46-59 and > 60,
7 respectively. The resistance to cefuroxime (second generation cephalosporin) in Belgium,
8 Germany, and Spain was 5.5%, 12.8%, and 16.6%, respectively (Kresken et al. 2016), in this
9 study cefuroxime shows low resistance rate similar showed in literature and could be a
10 treatment option for community UTI in our place.

11 Extended-spectrum beta-lactamase were more frequent as the age of women
12 increased, being more common in women over 60. The ESBL prevalence in samples was
13 4,7%, lower than found by Abreu et al (2013) in São Luiz, in northeast, 7,6% and 7,1% by
14 Gonçalves, however, the prevalence is higher than Southern 0,4% and South 1,5% of the
15 country (Abreu, 2013; Gonçalves, 2016; Minarini, 2007; Wollheim, 2011). ESBL prevalence is
16 diverse in countries, study from Pakistan shows 33% ESBL in *E. coli* isolated from UTI in
17 community (Fatima, 2018). In Southern France, approximately 4% of *E. coli* isolates from
18 community-acquired urinary tract infections are extended-spectrum beta-lactamase producers
19 (Zucconi, 2018). Changing prevalence with time can occur as shown in Northwestern Memorial
20 Hospital, Chicago USA, the percentage of ESBL-producing *E. coli* among community-
21 onset urine isolates increased from 0.21% in 2003 to 2.99% in 2008, an increase from 14 times
22 from 2003 to 2008, where CTX-M-producing *E. coli* accounted for the majority of ESBLs
23 producers (Qi, 2010).

24 Our study has limitations. The samples could not represent the real susceptibility profile
25 of uncomplicated UTI, because uroculture is not recommended in first episode of uncomplicated
26 UTI. The empirical treatment is based in a positive test strip (leukocytos+ or nitrites +) and
27 clinical signs and symptoms. We don't have information about clinical history, use of
28 antimicrobial therapy, recurrence of UTI and comorbidities from patients. Fosfomycin was
29 tested in samples resistant to three quinolones, but not for all samples. This antimicrobial
30 is expensive and is not offered free of charge by Public Health System, like, SMX- TMP,
31 ciprofloxacin, norfloxacin, cefalotin, amoxicilin and nitrofurantoin.

32 In conclusion SMX/TMP could be removed from first line treatment for community UTI.
33 Nitrofurantoin, fosfomycin could have the lowest resistance standard and could be chosen
34 empirical antimicrobial for uncomplicated UTI. Resistance to quinolone increases with age, the
35 treatment in older women should be guided by uroculture. Resistance to three quinolones was

1 15,5% in this study, empirical treatment for pielonefritis should be avoided.
2 Continued education (*Stewardship*) is necessary for racional prescription, in an attempt to
3 decrease the selective pressure of resistance, hospital costs with hospitalization and deaths.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

1 **Table 1- Antimicrobial susceptibility of E. coli isolated from women according to age range**

2

	< 15		15-45		46-59		> 60		Valor de p* 3
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Amicacyn	347	100	2130	99,6	1113	99,9	1769	99,5	0,255 5
Gentamicyn	341	98,3	2037	95,2	1059	95,1	1629	91,7	<0,001
Amoxicillin clavulanic	305	87,9	1901	88,9	982	88,2	1518	85,4	0,011 7
Ampicilin	190	54,8	1203	56,2	601	53,9	924	52,0	0,068
Piperacillin tazobactan	338	97,4	2091	97,8	1084	97,3	1703	95,8	0,005 9
Cefalotin	186	53,6	1155	54,0	574	51,5	855	48,1	0,003
Cefepime	339	97,2	2079	97,2	1064	95,5	1635	92	<0,001 10
Ceftriaxone	341	98,3	2079	97,2	1062	95,3	1625	91,4	<0,001 11
Cefuroxim	330	95,1	2009	93,9	1020	91,6	1500	84,4	<0,001 12
Nalidixi acid	279	80,4	1684	78,7	810	72,7	1096	61,7	<0,001 13
norfloxacin	330	95,1	1941	90,7	941	84,5	1306	73,5	<0,001 14
ciprofloxacin	329	94,8	1938	90,6	940	84,4	1303	73,3	<0,001
Ertapenem	347	100	2135	99,8	1106	99,3	1770	99,6	0,081 16
Meropenem	347	100	2136	99,9	1108	99,5	1767	99,4	0,059
nitrofurantoin	334	96,3	2072	96,9	1082	97,1	1698	95,6	0,071 18
SMX /TMP	255	73,5	1573	73,5	781	70,1	1200	67,5	<0,001
ESBL	07	2,0	54	2,5	47	4,2	147	8,3	<0,001 20
TOTAL	347	100	2139	100	1114	100	1777	100	

22 *p valor qui square test or Exact Fisher Test

23 Variables with association significative: gentamicyn, amoxicilina- clavullanic, piparacilin
 24 tazobactan, cefalotin, cefepime, ceftriaxone, cefuroxime, nalidixi acid, norfloxacin,
 25 ciprofloxacin, SMX/TMP

26

27

28

1 **Table 2- Antimicrobial Susceptibility of samples resistant to three quinolones according to**
 2 **age range**

	< 15		15-45		46-59		> 60		Valor de p*
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Amicacyn	17	100	146	99,5	166	100	338	99,6	<0,001
Gentamicyn	17	100	140	72,9	135	81,3	350	75,9	0,031
Amoxicillin clavulanic	15	88,2	146	76	130	78,3	338	73,3	0,339
Ampicilin	02	11,8	32	16,7	46	27,7	89	19,3	0,041
Piperacillin tazobactan	15	88,2	178	92,7	158	95,2	417	90,5	0,246
Cefalotin	05	29,4	62	32,3	58	34,9	127	27,5	0,294
Cefepime	13	76,5	154	80,2	140	84,3	359	77,9	0,349
Ceftriaxone	13	76,5	152	79,2	141	84,9	353	76,6	0,158
Cefuroxim	12	70,6	140	72,9	122	73,5	291	63,1	0,024
Ertapenem	17	100	192	100	161	97	456	98,9	0,076
Meropenem	17	100	192	100	164	98,8	457	99,1	0.414
nitrofurantoin	16	94,1	184	95,8	159	95,8	426	92,4	0,254
TMP/SMX	07	41,2	81	42,2	78	47	200	43,4	0,809
ESBL	05	29,4	37	19,3	24	14,5	105	22,8	0,102
TOTAL	17	100	192	100	166	100	461	100	

3

4

5 p valor qui square and test Exact Fisher Test

6 Variables with significant association (p<0,05): Amycacin, gentamicyn, cefuroxin, ertapenem

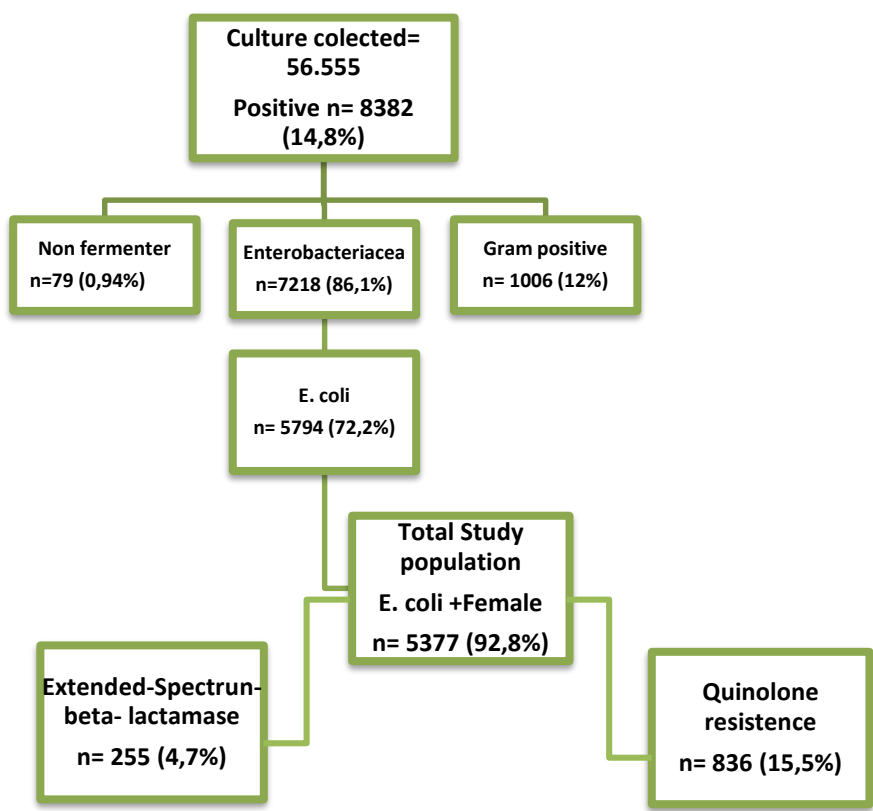
7

8

9

10

1 FIGURE 1- STUDY POPULATION



2

3

4

5

1 Reference

- 2 Abreu GA, Marques SG, Neto VM, Gonçalves AG. Extended-spectrum -lactamase-producing
3 enterobacteriaceae in community-acquired urinary tract infections in São Luís, Brazil. *Brazilian*
4 *Journal of Microbiology*. 2013. 44(2):469-471.
- 5 ANVISA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA-Série Segurança do Paciente e
6 Qualidade em Serviços de Saúde Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à
7 Assistência à Saúde.p.75.v.2013.
- 8 Aypak C, Altunsoy A, Düzgün N. Empiric antibiotic therapy in acute uncomplicated urinary tract
9 infections and fluoroquinolone resistance: a prospective observational study. *Ann Clin*
10 *Microbiol Antimicrob*. 2009 Oct 24;8:27.
- 11 Bratsman A, Mathias K, Laubscher R, Grigoryan L, Rose S. Outpatient fluoroquinolone
12 prescribing patterns before and after US FDA boxed warning. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*.
13 2020 Jun;29(6):701-707.
- 14 Batra P, Abrol AK, Gupta S, Pushpan P, Kumar R. Susceptibility pattern of oral antimicrobials
15 in uncomplicated UTI: Does fosfomycin still stand effective? *J Family Med Prim Care*. 2020
16 Feb 28;9(2):850-853.
- 17 Benko R, Matuz M, Juhasz Z, Bogнар J, Bordas R, Soos G, Hajdu E and Peto Z (2019)
18 Treatment of Cystitis by Hungarian General Practitioners: A Prospective Observational Study.
19 *Front. Pharmacol*. 10:1498
- 20 Carlos E. Reu, Waldemar Volanski, Karoline C. Prediger, Geraldo Picheth, Cyntia M.T. Fadel-
21 Picheth. Epidemiology of pathogens causing urinary tract infections in an urban community in
22 southern Brazil. *Brazilian Journal of Infection Disease*. 2018;22(6):505-507
- 23 Caron F, Galperine T, Flateau C, Azria R, Bonacorsi S, Bruyère F, Cariou G, Clouqueur E,
24 Cohen R, Doco-Lecompte T, Elefant E, Faure K, Gauzit R, Gavazzi G, Lemaitre L, Raymond
25 J, Senneville E, Sotto A, Subtil D, Trivalle C, Merens A, Etienne M. Practice guidelines for the
26 management of adult community-acquired urinary tract infections. *Med Mal Infect*. 2018
27 Aug;48(5):327-358.
- 28 Córdoba G, Holm A, Hansen F, Hammerum AM, Bjerrum L. Prevalence of antimicrobial
29 resistant *Escherichia coli* from patients with suspected urinary tract infection in primary care,
30 Denmark. *BMC Infect Dis*. 2017 Oct 10;17(1):670.

- 1 Cowart K, Worley M, Rouby NE, Sando K. Evaluation of FDA Boxed Warning on Prescribing
2 Patterns of Fluoroquinolones for Uncomplicated Urinary Tract Infections. *Ann Pharmacother.*
3 2019 Dec;53(12):1192-1199.
- 4 Cunha MA, Assunção GL, Medeiros IM, Freitas MR. Antibiotic resistance patterns of urinary
5 tract infections in a northeastern brazilian capital. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2016;58:2.
- 6 Dubbs SB, Sommerkamp SK. Evaluation and Management of Urinary Tract Infection in the
7 Emergency Department. *Emerg Med Clin North Am.* 2019 Nov;37(4):707-723.
- 8 FDA Drug Safety Communication. FDA advises restricting fluoroquinolone antibiotic use for
9 certain uncomplicated infections; warns about disabling side effects that can occur together.
10 05/12/2016.
- 11 Fatima S, Muhammad IN, Usman S, Jamil S, Khan MN, Khan SI. Incidence of multidrug
12 resistance and extended-spectrum beta-lactamase expression in community-acquired urinary
13 tract infection among different age groups of patients. *Indian J Pharmacol.* 2018 Mar-
14 Apr;50(2):69-74.
- 15 Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol.* 2010 Dec;7(12):653-60.
- 16 Gupta K, Hoon TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, et al. International Clinical
17 Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in
18 Women: A 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America and the European
19 Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis.* 2011 Mar 1;52(5):e103–20.
- 20 Gonçalves LF, de Oliveira Martins-Júnior P, de Melo ABF, da Silva RCRM, de Paulo Martins
21 V, Pitondo-Silva A, de Campos TA. Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum
22 β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in
23 the Central-Western Region, Brazil. *J Glob Antimicrob Resist.* 2016 Sep;6:1-4.
- 24 Guneyssel O, Suman E, Ozturk TC. Trimethoprim-sulfamethoxazole resistance and fosfomycin
25 susceptibility rates in uncomplicated urinary tract infections: time to change the antimicrobial
26 preferences. *Acta Clin Croat.* 2016 Mar;55(1):49-57
- 27 Hirsch EB, Raux BR, Zucchi PC, Kim Y, McCoy C, Kirby JE, Wright SB, Eliopoulos GM. Activity
28 of fosfomycin and comparison of several susceptibility testing methods against contemporary
29 urine isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Dec;46(6):642-7.
- 30 Johnson CC. Definitions, classification, and clinical presentation of urinary tract infections. *Med*
31 *Clin North Am.* 1991 Mar;75(2):241-52.

- 1 Kang C-I, Kim J, Park DW, Kim B-N, Ha U-S, Lee S-J, et al. Clinical Practice Guidelines for
2 the Antibiotic Treatment of Community-Acquired Urinary Tract Infections. *Infect Chemother.*
3 2018;50(1):67
- 4 Kobayashi M, Shapiro DJ, Hersh AL, Sanchez GV, Hicks LA. Outpatient Antibiotic Prescribing
5 Practices for Uncomplicated Urinary Tract Infection in Women in the United States, 2002-2011.
6 *Open Forum Infect Dis.* 2016 Aug 2;3(3):ofw159.
- 7 Kot B. Antibiotic Resistance Among Uropathogenic *Escherichia coli*. *Pol J Microbiol.* 2019
8 Dec;68(4):403-415.
- 9 Kresken M, Körber-Irrgang B, Biedenbach DJ, Batista N, Besard V, Cantón R, García-Castillo
10 M, Kalka-Moll W, Pascual A, Schwarz R, Van Meensel B, Wisplinghoff H, Seifert H.
11 Comparative in vitro activity of oral antimicrobial agents against Enterobacteriaceae from
12 patients with community-acquired urinary tract infections in three European countries. *Clin*
13 *Microbiol Infect.* 2016 Jan;22(1):63.e1-63.e5.
- 14 Kung CH, Ku WW, Lee CH, Fung CP, Kuo SC, Chen TL, Lee YT. Epidemiology and risk factors
15 of community-onset urinary tract infection caused by extended-spectrum β -lactamase-
16 producing Enterobacteriaceae in a medical center in Taiwan: a prospective cohort study. *J*
17 *Microbiol Immunol Infect.* 2015 Apr;48(2):168-74
- 18 Lee DS, Lee S-J, Choe H-S. Community-Acquired Urinary Tract Infection by *Escherichia coli*
19 in the Era of Antibiotic Resistance. *BioMed Res Int.* 2018 Sep 26;2018:1–14.
- 20 Minarini LA, Gales AC, Palazzo IC, Darini AL. Prevalence of community-occurring extended
21 spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Brazil. *Curr Microbiol.* 2007
22 May;54(5):335-41.
- 23 Prasada S, Bhat A, Bhat S, Shenoy Mulki S, Tulasidas S. Changing antibiotic susceptibility
24 pattern in uropathogenic *Escherichia coli* over a period of 5 years in a tertiary care center.
25 *Infect Drug Resist.* 2019 May 29;12:1439-1443.
- 26 Qi C, Pilla V, Yu JH, Reed K. Changing prevalence of *Escherichia coli* with CTX-M-type
27 extended-spectrum beta-lactamases in outpatient urinary *E. coli* between 2003 and 2008.
28 *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010 May;67(1):87-91
- 29 Ramírez-Castillo FY, Moreno-Flores AC, Avelar-González FJ, Márquez-Díaz F, Harel J,
30 Guerrero-Barrera AL. An evaluation of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates in urinary
31 tract infections from Aguascalientes, Mexico: cross-sectional study. *Ann Clin Microbiol*
32 *Antimicrob.* 2018 Jul 24;17(1):34

- 1 Rocha JL, Tuon FF, Johnson JR. Sex, drugs, bugs, and age: rational selection of empirical
2 therapy for outpatient urinary tract infection in an era of extensive antimicrobial resistance.
3 *Braz J Infect Dis.* 2012 Mar-Apr;16(2):115-21.
- 4 Sanchez GV, Babiker A, Master RN, Luu T, Mathur A, Bordon J. Antibiotic Resistance among
5 Urinary Isolates from Female Outpatients in the United States in 2003 and 2012. *Antimicrob*
6 *Agents Chemother.* 2016 Apr 22;60(5):2680-3.
- 7 Schappert SM, Rechtsteiner EA. Ambulatory medical care utilization estimates for 2007. *Vital*
8 *Health Stat* 13. 2011 Apr;(169):1-38. PMID: 21614897
- 9 Seija V, Fratchez V, Ventura V, Pintos M, González M. Factores asociados al desarrollo de
10 infección urinaria de origen comunitario causada por *Escherichia coli* resistente a
11 fluoroquinolonas [Risk factors for community-acquired urinary tract infection caused by
12 fluoroquinolone resistant *E. coli*]. *Rev Chilena Infectol.* 2014 Aug;31(4):400-5. Spanish
- 13 Stuck AK, Täuber MG, Schabel M, Lehmann T, Suter H, Mühlemann K. Determinants of
14 quinolone versus trimethoprim-sulfamethoxazole use for outpatient urinary tract infection.
15 *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Mar;56(3):1359-63
- 16 Wollheim C, Guerra IM, Conte VD, Hoffman SP, Schreiner FJ, Delamare AP, Barth AL,
17 Echeverrigaray S, Costa SO. Nosocomial and community infections due to class A extended-
18 spectrum β -lactamase (ESBL A)- producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in southern
19 Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2011 Mar-Apr;15(2):138-43.
- 20 Yamaji R, Rubin J, Thys E, Friedman CR, Riley LW. Persistent Pandemic Lineages of
21 Uropathogenic *Escherichia coli* in a College Community from 1999 to 2017. *J Clin Microbiol.*
22 2018 Mar 26;56(4):e01834-17.
- 23 Zucconi A, Courjon J, Marújouls C, Saintpère F, Degand N, Pandiani L, Pradier C, Mondain
24 V. Managing ESBL-producing Enterobacteriaceae-related urinary tract infection in primary
25 care: a tool kit for general practitioners. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018 May;37(5):983-
26 986.
- 27
- 28
- 29
- 30

1 ARTIGO 2

2 Genomic analysis of *Escherichia coli* isolated from urine samples from patients in 3 South Brazil

4 Authors: Tano Z., Soncini JG., Kobayashi RKT., Pavanelli WR., Vespero EC.,

5 Abstract

6 Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the leading cause of community-acquired
7 urinary tract infection (CAUTI). The increasing prevalence of CA-UTI caused by UPEC strains
8 resistant to broad-spectrum drugs complicates clinical management of these infections. Whole
9 genome sequencing 33 UPEC samples, Fluorquinolones resistant (FQ-R), from community
10 patients to characterize beta-lactamase and fluorquinolones genes of UPEC isolated from
11 cases of CA-UTI in a city in South of Brazil. The phylogenetic group B2 was the most frequent
12 in the sequenced samples. The *iss* (increased serum survival) gene responsible for the
13 increased resistance to the lytic effects of the serum was the most frequent virulence factor.
14 *CTX_{M15}* was the ESBL most frequently among the isolates. ST131 and ST648 were the most
15 frequently found, with *CTX_{M15}* related to ST131. Serogroups O25: H4 were related to ST131
16 while O1: H6 related to ST648. The most frequent resistance to quinolones were mutations in
17 the regions *GyrA* and *ParC* A of the regions that determine quinolone resistance (QRDR),
18 while the *aac(6')-ib-cr* gene present in plasmid-mediated resistance (PMQR). These findings
19 indicate that much of the prevalence of broad-spectrum drug-resistant CA-UTI in our region is
20 due to a limited set of pandemic lineages of UPEC circulating in the community instead of
21 multiple genotypes selected by antimicrobial agents.

22

23 Background

24 *Escherichia coli* (*E. coli*) is the most common uropathogen in urinary tract Infection
25 (UTI) (Marrs, 2005), responsible for 80% of cases (Foxman al., 2003). Uropathogenic
26 *Escherichia coli* (UPEC), classified as Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), are one of
27 the most predominant causes of UTIs. *E. coli* strains are classified in the following phylogenetic
28 groups: A, B1, B2, C, D, E, F, and clade I (Clermont, 2013).

29 Commensal *E. coli*, with no pathogenic features, occur in gastrointestinal tract mucosa,
30 most often belonging to group A or B1; pathogenic *E. coli* responsible for intestinal infections
31 represent phylogenetic groups A, B1 or D. Extraintestinal infections belong to groups B2 and
32 D and Group E is related to group D (including O157: H7), while group F is related to the main
33 group B2. Clones of *E. coli* strains, which are genetically diverse but phenotypically
34 indistinguishable, have been assigned to cryptic clade I (Köhler and Dobrindt, 2011; Tivendale,
35 2010)

1 There are numerous virulence factors (VF) related to the pathogenicity of ExPEC with
2 a wide range of activities, from those related to bacteria colonization to those related to
3 virulence, including adhesins, toxins, iron acquisition factors, lipopolysaccharides,
4 polysaccharide capsules, and invasins, which are usually encoded on pathogenicity islands
5 (PAIs), plasmids and other mobile genetic elements. Mechanisms underlying the dynamics of
6 ExPEC transmission and the selection of virulent clones are still poorly understood and require
7 further research (Dale and Woodford; 2015).

8 Sequency analysis of housekeeping genes called Multilocus Sequence Typing (MLST)
9 explore with more accuracy the phylogenetic structure of *E. coli* species (Chaudhuri and
10 Henderson, 2012). This method based on determining the allele's types of selected
11 housekeeping genes and strains are assigned to Sequence Types, (STs) (Baldy-Chudzik,
12 2015). Analysis with MLST application showed faults and blanks in the past division of *E. coli*
13 into four main phylogenetic groups. Analysis with sequencing revealed that among *E. coli*
14 species there are hybrid groups and about 80–85% of *E. coli* strains were incorrectly assigned
15 to phylogenetic groups (Wirth, 2006; Gordon, 2008; Clermont, 2013). With application of MLST
16 revealed that among multidrug resistant extraintestinal pathogenic *E. coli* strains the most
17 frequent is Sequence Type 131 (ST131) [Rogers, 2013]. ST131 is a clone of *E. coli*
18 disseminated worldwide and resistant to many antibiotics (Sarowska, 2019). Like ST131, also
19 ST405 and ST648 are considered high-risk lineages as they are associated with the spread of
20 resistance genes (Cruz Campos, 2020).

21 UTIs are often treated with different broad-spectrum antibiotics, one with a narrow
22 spectrum of activity may be appropriate because of emerging concerns about infection with
23 resistant organisms, and antimicrobial susceptibility testing of the urinary pathogens
24 constitutes the basis for antibiotic therapy. However, in view of the increasing bacterial
25 resistance, regular monitoring of resistance patterns is necessary to improve guidelines for
26 empirical antibiotic therapy (Kripke,2005).

27 The emergence of *E. coli* isolates carrying several virulence and antimicrobial
28 resistance (AMR) genes represents a worrisome public health issue, which has been
29 associated with severe infections and therapeutic failure (Dale and Woodford; 2015; Cruz
30 Campos AC., 2020). So, this study aimed to characterize virulence, resistance genes to
31 quinolones and β -Lactamics, phylogenetic classification and MLST of UPEC samples isolated
32 from UTI patients in community.

33 **Material and Methods.**

34 **Samples**

1 *E. coli* strains were isolated from urine samples collected from women attended by
2 Public Health service in a city in South Brazil from June 2016 to May 2017. A total of 5377 *E.*
3 *coli* strains were obtained from urine culture, of this 15,5% were resistant to all quinolones
4 tested. The aim of this study was evaluated the genome of *E. coli* samples isolated from
5 women age 18-44 resistant to all quinolones (Nalidixic acid, Norfloxacin, Ciprofloxacin) (FQ-
6 R). The strains were chosen of according to ERIC-PCR.

7

8 **Identification and antimicrobial susceptibility**

9 The identification and bacterial susceptibility were realized by automated VITEK[®]2
10 system, using GN ID card and AST 238 card, all from bioMérieux, USA. The bacterial
11 susceptibility was tested by 14 β -lactam and non- β -lactam antibiotics: ampicillin,
12 amoxicillin/clavulanate, ceftriaxone, cefepime, ertapenem, meropenem, nalidixic acid,
13 ciprofloxacin, norfloxacin, gentamicin, amikacin nitrofurantoin, trimethoprim-sulfamethoxazole
14 and piperacillin-tazobactam. The interpretation was performed according to the CLSI 2017
15 (Clinical and Laboratory Standards Institute) criteria. *E. coli* ATCC25922 was used as quality
16 control strain. All the isolates were kept in Tryptic Soy Broth (TSB) with 15% glycerol (-20°C).

17 Phylogenetic Classification

18 The *E. coli* isolates were classified into 7 phylogenetic groups (A, B1, B2, C, D, E, and
19 F), based on the presence of the genes *chuA*, *yjaA*, *arpA*, and *trpA*, and a DNA fragment
20 (TSPE4.C2), which were detected by the PCR method (Clermont et al., 2013).

21 **Analysis of Genetic Variability**

22 Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) was performed as
23 previously described by Versalovic et al. (1994). The products were stained by ethidium
24 bromide (Invitrogen, Carlsbad, USA) and observed under UV light. The sizes of the fragments
25 were first normalized according to the molecular weight of the DNA markers, and then the
26 fingerprints were analyzed using BioNumerics software (Applied Mathematics, Kortrijk,
27 Belgium, version 4.6), with a position tolerance of 3%. The samples were submitted to similarity
28 analyses using the UPGMA algorithm (unweighted pair-group method, with arithmetic) with the
29 Dice coefficient. DNA fragments greater than 12,000 bp or smaller than 200 bp were excluded
30 from the analysis. Strains were considered genetically related if the similarity index was $\geq 85\%$.

31

32 **DNA isolation and whole-genome sequencing**

33 For DNA extraction, strains were grown on Mueller-Hinton Agar for overnight at 37 °C.
34 Subsequently, a single colony was inoculated in 2 mL of Luria-Bertani broth for 12 hours at 37

1 °C. The suspension was used to continue extraction and purification by the DNA extraction kit
2 (Invitrogen, Carlsbad, CA). To quantify the concentration of extracted DNA, the Qubit dsDNA
3 (double-stranded DNA) BR assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used. After quantification,
4 the DNA was used to construct a paired-end library (150 bp), which was sequenced using the
5 NextSeq platform (Illumina). The instructions of each manufacturer were followed in all steps.

7 **Bioinformatic analysis**

8 Genome assemblies was performed by the CLC Genomics Workbench version 7.0
9 (Aarhus, Denmark). Multilocus sequence type (MLST), resistome and virulome were identified
10 using bioinformatics tools available from the Center for Genomic Epidemiology
11 (<http://genomicepidemiology.org/>), like MLST 2.0, PlasmidFinder 2.0, ResFinder 3.1 and
12 VirulenceFinder 2.0.

14 **Results**

15 In this study 33 *E. coli* isolates were resistant to all three quinolones tested and were
16 used for genome analysis. Antimicrobial resistance profile revealed 25 samples with ESBL
17 phenotype. Resistance to others antimicrobial agents like Sulfamethoxazole/Trimetropin was
18 high, while to carbapenems and aminoglycosides the susceptibility is 100%.

19 The phylogenetic grouping founded were: B2 group 54,5% (n=18), following by Group
20 B1 9,0% (n=3), Group A, C E and F with 6,1 (n=2) each, unknown 12,1% (n=4). Group D was
21 not found. Table 1 show phylogenetic group and susceptibility to antimicrobial agents.

22 In this samples, 87% have at least three virulence factors, ranging from 1 to 8 genes.
23 The virulence factor gene found more frequently was *iss* (n=24), following by *lpfA* (n=17), *gag*
24 (n=16), *iha* (n=12), *eilA* (n=11) and *air* (n=10) (figure 1)

25 The result of the ERIC-PCR and sequencing genome analysis showed genetic diversity
26 among samples (figure 1). The ST also demonstrated high diversity, ST 131 and ST 648 were
27 more frequent. The ST131, serotype O25:H4, was present in 8 samples, following by ST 648,
28 serotype O1:H6 in six. Table 1 show all virulence factors gene, serotype and sequence type of
29 all samples and susceptibility profile.

30 Among Quinolone Resistance Determinant Region (QRDR), all the strains selected
31 had *gyrA* and *parC* mutations, while 69.7% had *parE* mutations too. Five types of mutations
32 were found in *parC*, being S80I the most frequent (97%); while in *gyrA* we found three different
33 mutations, being S83L (100%) and D87N (93.3%) the most frequent; and four types of
34 mutations were found in *parE*, being S458A (30.3%) the most common. Plasmid-mediated
35 quinolone resistance (PMQR) determinants, the *aac(6')-Ib-cr* (aminoglycoside

1 acetyltransferase) gene was found in five strains and *qnrB19* in two. Figure 1 show the ST,
2 quinolone resistance genes, ESBL genes and

3

4 Discussion

5 Whole genome sequencing has become the key technology for understanding AMR pathogen
6 evolution, population dynamics, and genomic epidemiology, as it provides a far greater degree
7 of resolution than previous genotyping methods (Baker, 2018). In this study, 33 UPEC
8 samples, FQ-R, from community patients were sequenced in order to understand their
9 pathogenicity and endemicity. The choice of sequencing FQ-R samples went based in that
10 fluoroquinolones have been frequently prescribed as empirical therapy against community
11 infections due to increased appearance of multiple drug resistant Gram-negative pathogens
12 and to the disease severity. In Brazil has one of the highest rates of resistance to quinolones
13 among Latin American countries. A report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance
14 Program revealed that resistance to nalidixic acid of *Salmonella* spp. was higher in Latin
15 American (15%) than in North America (6.3%), being as high as 50% in Mexico and 33.6% in
16 Brazil (Biedenbach, 2006). Brazilian investigators confirmed the information reporting that the
17 significant increase in resistance of Enterobacteriaceae to quinolones detected in Brazilian
18 Medical Centers may be related to increased drug use in community acquired infections
19 (Minarini; Darini, 2012).

20 Phylogenetic classification of ExPEC isolates can be performed based on the
21 detection of the *chuA*, *yjaA*, *arpA*, *trpA* genes, and DNA fragment known as TSPE4.C2
22 (Clermont et al., 2013). We detected B2 as the most prevalent phylogenetic groups among
23 UPEC isolates. In fact, another study also showed that B2 was reported to be most common
24 phylogenetic group in ExPEC (Micenková et al., 2017). This phylogenetic group B2 and D of
25 ExPEC have higher virulence in humans that allows them to induce extraintestinal infections
26 in both healthy and compromised hosts (Fratamico et al., 2016).

27

28 One of the main mechanisms of fluoroquinolone resistance is amino acid substitutions
29 in the DNA gyrase and topoisomerase IV proteins, in particular in GyrA and ParC (Ruiz, 2003;
30 Hopkinsetal., 2005). Several resistance mutations have been characterized in *E. coli*, and the
31 majority of these are located in the QRDR defined as códons 67–106 in *gyrA* and 56–108in
32 *parC* (*E. coli* numbering). Certain single mutations in *gyrA* are sufficient to generate high-level
33 resistance to nalidixic acid, a non-fluorinated first generation quinolone. Additional mutations
34 in *gyrA* or other tytel topoisomerase genes are, however, necessary for high-level resistance
35 to later generations of fluoroquinolones, such as ciprofloxacin (Hopkinsetal., 2005). Indeed, a

1 study of 58 FQ-R clinical *E. coli* isolates from two hospitals in Houston, TX, USA, found that
2 all isolates had aminoacid substitutions in GyrA and approximately 85% had additional
3 substitutions in ParC (Morgan-Linnell et al., 2009), confirming chromosomal mutations as the
4 main mechanism of clinically relevant fluoroquinolone resistance. The frequency of resistant
5 invasive *E. coli* infections in Europe in 2012 ranged from 9.7% in Iceland to 42.0% in Cyprus
6 (ECDC, 2013). Surveillance outside of Europe is less systematic, but a hospital in India
7 reported that as many as 73% of uropathogenic *E. coli* infections were resistant to ciprofloxacin
8 (Mandaletal., 2012). In this study all the strains selected had *gyrA* and *parC* mutations, being
9 S80I the most frequent in *parC*; while in *gyrA* we found three different mutations, being S83L,
10 in all samples, following of D87N the most frequent; and four types of mutations were four
11 found in *parE*, being S458A.

12 The *Aac(6')-Ib-cr* variant, an enzyme usually encoded by a plasmid-borne gene,
13 extends its drug targets to include fluoroquinolones (FQs) in addition to aminoglycosides. It is
14 characterized by amino acid changes at codon 102 (Trp→Arg) and codon 179 (Asp→Tyr). The
15 *Aac(6')-Ib-cr* protein is able to specifically acetylate hydrophilic FQs presenting a free
16 piperazinyl amine (i.e. ciprofloxacin and norfloxacin) (Robicsek 2006). The association of
17 *aac(6')-Ib-cr* with genes encoding the beta-lactamase CTX-M-15 or other ESBLs has been
18 reported (Pitout et al. 2008). Furthermore, it should be noted that PMQR genes may facilitate
19 the emergence of quinolone resistance, which would have therapeutic implications
20 (Rodríguez-Martínez et al. 2011). In this study, *Aac(6')-Ib-cr* went the PMQR genes most and
21 was related to ST 131.

22 This worldwide increase in resistance of UPEC is associated with specific evolutionary
23 successful lineages, such as the often multidrug-resistant, as ST131 clone (Mathers et al.,
24 2015; Price et al., 2013). Isolates of this lineage often belong to phylogenetic group B2 and
25 serotype O25b:H4 and possess a variable combination and number of virulence genes, which
26 may be responsible for their virulence potential and successful global spread (Dahbi et al.,
27 2013; Peirano and Pitout, 2014). MDR-ExPEC clones are often associated with plasmid-based
28 Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) genes, such as the frequently detected CTX-M-
29 15 genes (Johnson et al., 2012). Recently, the classification of ST131 isolates in virotypes
30 according to the presence of specific virulence genes was introduced, virotype C being the
31 most prevalent among ESBL-producing ST131 *E. coli* (Miyoshi-akiyama et al., 2016). Other
32 evolutionary successful lineages, as ST69, ST73, ST405, and ST648, have been associated
33 with an enhanced ability to colonize and persist in the host. Like ST131, also ST405 and ST648

1 are considered high-risk lineages as they are associated with the spread of resistance genes.
2 In this study, the samples with ST 131 were also the majority CTX-M-15, following ST648.

3 In conclusion, our results suggest that the community prevalence of antimicrobial resistant UTI
4 is strongly linked to the community dissemination of pandemic lineages of ExPEC. Future
5 studies are warranted to identify factors driving the dissemination of these resistant UPEC
6 genotypes in this and other communities.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

1 REFERENCES

- 2 Baker S, Thomson N, Weill FX, Holt KE. Genomic insights into the emergence and spread of
3 antimicrobial-resistant bacterial pathogens. *Science*. 2018 May 18;360(6390):733-738.
- 4 Baldy-Chudzik K, Bok E, Mazurek J. Znane i nowe warianty patogennych *Escherichia coli* jako
5 konsekwencja plastycznego genomu [Well-known and new variants of pathogenic *Escherichia*
6 *coli* as a consequence of the plastic genome]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015 Mar
7 17;69:345-61.
- 8 Biedenbach DJ, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance
9 to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and
10 Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004).
11 *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006 Jan;54(1):13-21.
- 12 Marrs CF, Zhang L, Foxman B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there
13 distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Nov
14 15;252(2):183-90.
- 15 Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-
16 typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups.
17 *Environ Microbiol Rep*. 2013 Feb;5(1):58-65.
- 18 da Cruz Campos AC, Couto N, Lucas da Silva Andrade N, Friedrich AW, de Paula Rosa AC,
19 Vieira Damasco P, Chlebowicz-Fliss MA, Rossen JWA; SOLIDNESS Working Group.
20 Virulence and resistance properties of *E. coli* isolated from urine samples of hospitalized
21 patients in Rio de Janeiro, Brazil - The role of mobile genetic elements. *Int J Med Microbiol*.
22 2020 Dec;310(8):151453.
- 23 Dale AP, Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage
24 and clones. *J Infect*. 2015 Dec;71(6):615-26
- 25 Foxman B, Brown P. Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors,
26 incidence, and costs. *Infect Dis Clin North Am*. 2003 Jun;17(2):227-41.
- 27 Fratamico PM, DebRoy C, Liu Y, Needleman DS, Baranzoni GM, Feng P. Advances in
28 Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2016 May 3;7:644.
- 29 Gordon DM, Clermont O, Tolley H, Denamur E. Assigning *Escherichia coli* strains to
30 phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ*
31 *Microbiol*. 2008 Oct;10(10):2484-96.
- 32 Frasson I, Cavallaro A, Bergo C, Richter SN, Palù G. Prevalence of *aac(6')-Ib-cr* plasmid-
33 mediated and chromosome-encoded fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae* in Italy.

- 1 Gut Pathog. 2011 Aug 9;3(1):12. doi: 10.1186/1757-4749-3-12. PMID: 21827661; PMCID:
2 PMC3163596.
- 3 Johnson JR, Owens KL, Clabots CR, Weissman SJ, Cannon SB. Phylogenetic relationships
4 among clonal groups of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as assessed by multi-locus
5 sequence analysis. *Microbes Infect.* 2006 Jun;8(7):1702-13.
- 6 Köhler CD, Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med*
7 *Microbiol.* 2011 Dec;301(8):642-7.
- 8 Minarini LA, Darini AL. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and
9 *parC* in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. *Braz J Microbiol.* 2012 Oct;43(4):1309-14.
- 10 Micenková L, Beňová A, Frankovičová L, Bosák J, Vrba M, Ševčíková A, Kmeťová M, Šmajš
11 D. Human *Escherichia coli* isolates from hemocultures: Septicemia linked to urogenital tract
12 infections is caused by isolates harboring more virulence genes than bacteraemia linked to
13 other conditions. *Int J Med Microbiol.* 2017 Apr;307(3):182-189.
- 14 Pitout JD, Wei Y, Church DL, Gregson DB. Surveillance for plasmid-mediated quinolone
15 resistance determinants in Enterobacteriaceae within the Calgary Health Region, Canada: the
16 emergence of *aac(6)-Ib-cr*. *J Antimicrob Chemother.* 2008 May;61(5):999-1002.
- 17 Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-
18 mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother.* 2011 Apr;17(2):149-82
- 19 Rogers BA, Doi Y. Who is leading this dance? Understanding the spread of *Escherichia coli*
20 sequence type 131. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013 Apr;34(4):370-2
- 21 Sarowska J; Futoma-Koloch, B; Jama-Kmiecik, A; Frej-Madrzak, M; Ksiazczyk, M;
22 Bugla-Ploskonska G, Choroszy-Krol, I. Virulence factors, prevalence and potential
23 transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources:
24 recent reports. *Gut Pathog* (2019) 11:10
- 25 Tivendale KA, Logue CM, Kariyawasam S, Jordan D, Hussein A, Li G, Wannemuehler Y, Nolan LK.
26 Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able
27 to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infect Immun.*2010;78:3412–9.
- 28 Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC.
29 Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside
30 acetyltransferase. *Nat Med.* 2006;12:83–88
- 31 Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and
32 application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991 Dec
33 25;19(24):6823-31.

1 Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC,
2 Ochman H, Achtman M. Sex and virulence in *Escherichiacoli*: an evolutionary perspective. Mol
3 Microbiol. 2006;60:1136–51.

4 Yun KW, Kim HY, Park HK, Kim W, Lim IS. Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli
5 of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. J Microbiol Immunol Infect.
6 2014 Dec;47(6):455-61.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

TABLE 1- Antimicrobial Susceptibility Profile according phylogenetic group													
	AMK	AMC	AMP	CEFAL	CEFEP	CEFT	CXM	ERT	GEN	MER	NIT	PIP	SMX
Phylogenetic group	N/%	N/%	N/%	N/%	N/%	N/%	N/%	N/%	N/%	N/%	N/%	N/%	N/%
Group A	2 (100)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	0 (0)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	1 (50)	1 (50)
Group B1	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (66,6)	2 (66,6)	1 (33,3)	3 (100)	2 (66,6)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	2 (66,6)
Group B2	18 (100)	6 (33,3)	0 (0)	0 (0)	4 (22,2)	4 (22,2)	4 (22,2)	18 (100)	8 (44,4)	18 (100)	17 (94,4)	14 (77,8)	5 (27,8)
Group C	2 (100)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	1 (50)
Group E	2 (100)	1 (50)	1 (50)	1 (50)	1 (50)	1 (50)	1 (50)	2 (100)	1 (50)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	1 (50)
Group F	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	1 (50)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	0 (0)
Unknown	4 (100)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	1 (25)	1 (25)	4 (100)	3 (75)	4 (100)	4 (100)	3 (75)	0 (0)

1 **ARTIGO 3 (Submetido à Revista Microbiology Resource Announcements)**

2 **Genome Sequences of three *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary**
3 **tract infections in Brazil**

4 Zuleica Naomi Tano, João Gabriel Soncini Louise Cerdeira, Vívian D'Afonseca, Nilton
5 Lincopan, Eliana Carolina Vespero, Wander Rogério Pavanelli

6

7 **ABSTRACT**

8 *Escherichia coli* is a common inhabitant of the gastrointestinal tract and also an important
9 human pathogen. Three *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract
10 infections (UTI) in Brazil were identified during a genomic surveillance. In this study, we
11 report the draft genomes of *E. coli* (ST57, ST59 and ST393), which present different
12 antimicrobial resistance profiles and classical repertory of virulence genes. These data could
13 provide insights to understanding the pathogenicity of these strains.

14

15 **ANNOUNCEMENT**

16 *Escherichia coli* is a common inhabitant of the gastrointestinal tract of most warm-
17 blooded mammals and it is an important human pathogen (1). Urinary tract infection (UTI) is
18 the second most common bacterial infection managed in primary care and uropathogenic *E.*
19 *coli* (UPEC) is responsible for 75% to 95% of the cases (2). It is estimated that half of women
20 will have at least one UTI during their lifetimes, generating a high annual expenditure on
21 healthcare services. (3-4). Additionally, infections caused by extended spectrum β -lactamase
22 (ESBL)-producing *E. coli* represent a significant healthcare and their isolation from food-
23 production animals are increased worldwide, especially from chicken meat (5-6). We report
24 three draft genome sequences of multidrug-resistant *E. coli* strains (ST57, ST59 and
25 ST393). These bacteria were isolated from community-acquired urinary tract infections (UTI) in
26 Brazil during a genomic surveillance in South region.

1 Genomic DNA was extracted using a PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Life
2 Technologies, CA). The quality and concentration of genomic DNA were assessed using a
3 Qubit1 2.0 fluorometer (Life Technologies). Libraries were prepared with a NexteraXT library
4 prep kit (Illumina Inc., San Diego, CA). The samples were sequenced via Illumina Next Seq
5 500 platform (Illumina Inc., San Diego, CA), using 150-bppaired-end reads. Reads were *de*
6 *novo* assembled using Unicycler0.4.0 software (7). The *E. coli* genomes were annotated using
7 the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline v.3.2 (PGAP) from National Center for
8 Biotechnology Information (NCBI). Multilocus sequence type (MLST), antimicrobial resistance
9 (AMR) genes, virulence factors and plasmid replicons were predicted using the MLST 2.0,
10 pMLST 2.0, ResFinder 4.1, FimTyper 1.0, VirulenceFinder 2.0 and PlasmidFinder 2.1
11 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>) softwares (8).

12 For ST57, ST59 and ST393 the sequencing yielded 9.234.415, 9.103.782 and
13 8.915.121 paired-end reads with (231, 228 and 223 coverages) and 266, 212 and 104 contigs
14 respectively. The draft genomes were of length 147,4 bp (ST57); 148,4 bp (ST59) and 148,2
15 bp (ST393) with mean GC content of 99,72%, 99,87% and 99,83%. A total of 4871 CDS, 83
16 tRNAs and 0 rRNAs were annotated for ST57 strain. For ST59 the numbers were (4802, 85
17 and 10) and for ST393 were (4803, 85 and 0).

18 Multiple AMR profiles were identified in all genomes. ST57 and ST59 shared a similar
19 antimicrobial profile, which they were resistant to several beta-lactam antibiotics. Additionally,
20 these strains harbor Col-like resistance plasmids, ST57 carries Col(MP18), ColRNAI and
21 Col(MG828) and ST59 harbors the Col(BS512). ST393 presented resistance to quinolones and
22 fluoroquinolones antibiotics. This strain carries the genes *parC*, *pare* and *gyrA* mutated and
23 IncF, IncX4 and p0111 plasmids.

24 Concerning virulence, adhesins as *ipfA* (ST393 and ST59) and *iha* (all), toxins factors
25 as *sigA* (ST57) and *sat* (ST393 and ST59) and environment resistance as *iss* (ST393 and
26 ST57) and *gad* (ST57 and 59) are present in these genomes. ST57 carries microcin H47 unit
27 composed of *mchB*, *mchC*, *mchF* genes.

1 In summary, the genome information provided to these three sequences may help to
2 better understand the pathogenicity basis of circulating *E. coli* in Brazil.

3
4 **Data availability.** Draft whole-genome assemblies were deposited in DDBJ/ENA/GenBank
5 under the SRA accession numbers SRR10310388 (ST57), SRR10310390 (ST59) and
6 SRR10310415 (ST393).

7 8 **Competing interests**

9 The authors declare no conflict of interests.

10 11 **Ethical approval**

12 The study was approved by the Ethics and Research Committee of the State University of
13 Londrina CAAE 56869816.0.0000.5231 and the Health Department of the Municipality of
14 Londrina, Paraná

15 .

16 **ACKNOWLEDGMENT**

17 The authors would like to thank the financial support of the Bill and Melinda Gates
18 Foundation's Grand Challenges Explorations Brazil – New Approaches to characterize the
19 global burden of antimicrobial resistance (OPP1193112), the Research Support Facilities
20 Center of the State University of São Paulo (CEFAP-USP), Institute of Biomedical Sciences of
21 State University of São Paulo (ICB-USP) and Master's program Clinical and Laboratory
22 Pathophysiology of the State University of Londrina.

23 24 **REFERENCES**

- 25 1. Sarowska J, Futoma-Koloch B, Jama-Kmiecik A, Frej-Madrzak M, Ksiazczyk M, Bugla-
26 Ploskonska G, Choroszy-Krol I. 2019. Virulence factors, prevalence and potential

- 1 transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different
2 sources: recent reports. *Gut Pathog***11**:10-26. doi: 10.1186/s13099-019-0290-0
- 3 2. Subashchandrabose S, Mobley HLT. 2015. Virulence and Fitness Determinants of
4 Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr***(4)**:10.1128/microbiolspec.UTI-0015-
5 2012. doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012.
- 6 3. Asadi Karam MR, Habibi M, Bouzari S. 2019. Urinary tract infection: Pathogenicity,
7 antibiotic resistance and development of effective vaccines against
8 Uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Immunol***108**:56-67. doi:
9 10.1016/j.molimm.2019.02.007.
- 10 4. Conover MS, Ruer S, Taganna J, Kalas V, De Greve H, Pinkner JS, Dodson KW,
11 Remaut H, Hultgren SJ. 2016. Inflammation-Induced Adhesin-Receptor Interaction
12 Provides a Fitness Advantage to Uropathogenic *E. coli* during Chronic Infection. *Cell*
13 *Host Microbe***20(4)**:482-492. doi: 10.1016/j.chom.2016.08.013.
- 14 5. Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, Schwarz S. 2018.
15 Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr***6(4)**: 289-290. doi:
16 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.
- 17 6. Reid CJ, McKinnon J, Djordjevic SP. 2019. Clonal ST131-H22 *Escherichia coli* strains
18 from a healthy pig and a human urinary tract infection carry highly similar resistance and
19 virulence plasmids. *Microb Genom***5(9)**:e000295. doi: 10.1099/mgen.0.000295.
- 20 7. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. 2017. Unicycler: Resolving bacterial genome
21 assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol***13**:e1005595. doi:
22 [10.1371/journal.pcbi.1005595](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595).
- 23 8. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, VoldbyLarsen M, Lund O, Villa L,
24 MøllerAarestrup F, Hasman H. 2014. In silico detection and typing of plasmids using
25 PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents*
26 *Chemother***58**:3895-3903. doi: [10.1128/AAC.02412-14](https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14).

1 9.CONCLUSÃO

2 A nitrofurantoína e a fosfomicina são boas opções para o tratamento de primeira escolha para
3 as infecções urinárias não complicadas.

4 O SMX-TPM apresentou resistência elevada, não sendo indicado para o tratamento de ITU
5 não complicada em pacientes da comunidade.

6 A resistência às quinolonas aumenta proporcionalmente à faixa etária. Nos maiores de 60
7 anos a norfloxacin e a ciprofloxacina apresentam 27% de resistência.

8 A presença de amostras ESBL aumentou proporcionalmente à faixa etária, alcançando 8,3%
9 em pacientes acima de 60 anos.

10 O grupo filogenético B2 foi o mais frequente nas amostras sequenciadas.

11 O gene *iss* (*increased serum survival*), responsável pelo aumento da resistência aos efeitos
12 líticos do soro, foi o fator de virulência mais frequente.

13 A CTX M15 foi a ESBL mais frequentemente encontrada entre os isolados.

14 O ST131 e o ST648 foram os mais frequentemente encontrados, sendo o CTX M15
15 relacionado ao ST131.

16 Os sorogrupos O25:H4 foram relacionados ao ST131, enquanto o O1:H6 foi relacionado ao
17 ST648.

18 A resistência mais frequente às quinolonas foram as mutações nas regiões GyrA e ParC das
19 regiões determinantes de resistência às quinolonas (QRDR), enquanto o gene *aac(6')-ib-cr*
20 esteve presente na resistência mediada por plasmídeo (PMQR).

21

22

23

24

25

26

27

28

29

1 10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

2 O estudo permite concluir que o SMX-TMP poderia ser substituído pela nitrofurantoína como
3 primeira escolha no tratamento das infecções urinárias não complicadas.

4 A fosfomicina apresentou sensibilidade aproximada de 98,3% em amostras resistentes às
5 quinolonas, porém é uma medicação que não está no rol de antimicrobianos disponíveis nos
6 postos de saúde para tratamento gratuito.

7 O uso de cefalosporina de 1ª geração, como a cefalotina, deve ser realizado com precaução
8 pela alta resistência encontrada, assim como a ampicilina.

9 A cefuroxima axetil, uma cefalosporina de 2ª geração, apresentou sensibilidade próxima de
10 95%, porém também não está disponível para tratamento gratuito nos postos de saúde.

11 As quinolonas têm aumento da resistência proporcional à idade. Mulheres acima de 60 anos
12 possuem maior risco de resistência, não sendo apropriado seu uso empírico em infecções de
13 trato urinário complicadas, exceto quando houver um antibiograma em mãos.

14 Este estudo possui algumas limitações:

15 Não houve controle sobre os sintomas apresentados pelas pacientes como disúria, urgência
16 miccional ou dor em baixo ventre. O estudo teve acesso apenas aos dados demográficos e
17 microbiológicos, portanto, não se sabe se as culturas obtidas representam bacteriúria
18 assintomática, infecção urinária não complicada ou complicada.

19 Para minimizar esses vieses, obteve-se apenas uroculturas de mulheres (infecções urinárias
20 em homens são consideradas complicadas) e as avaliações de resistência às quinolonas
21 foram realizadas em mulheres entre 15 e 45 anos, faixa etária comum de infecções não
22 complicadas.

23 É necessária educação continuada em antimicrobianos (*Stewardship*), para que haja um uso
24 racional na tentativa de diminuição da pressão seletiva da resistência, custos hospitalares
25 com internação e mortes.

26

27

28

29

30

1 11.REFERÊNCIAS

- 2 Akash MSH, Rehman K, Fiayyaz F, Sabir S, Khurshid M. **Diabetes-associated infections:**
3 **development of antimicrobial resistance and possible treatment strategies.** Arch
4 Microbiol. 2020 Jul;202(5):953-965.
- 5 Ana L. Flores.-Mireles*, Jennifer N. Walker*, Michael Caparon and Scott J. Hultgren. Urinary
6 tract infections: **epidemiology, mechanisms of infection and treatment options.**Nature
7 Reviews, 2015; 13
- 8 Asadi Karam MR, Habibi M, Bouzari S. **Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic**
9 **resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic Escherichia**
10 **coli.** Mol Immunol. 2019 Apr;108:56-67.
- 11 Bader MS, Loeb M, Brooks AA. **An update on the management of urinary tract infections**
12 **in the era of antimicrobial resistance.** Postgrad Med. 2017 Mar;129(2):242-258.
- 13 Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, organizadores. Mandell, Douglas, and Bennett's principles
14 and practice of infectious diseases. Eighth edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2015.
15 2 p
- 16 Benko R, Matuz M, Juhasz Z, Bognar J, Bordas R, Soos G, Hajdu E, Peto Z. **Treatment of**
17 **Cystitis by Hungarian General Practitioners: A Prospective Observational Study.** Front
18 Pharmacol. 2019 Dec 19;10:1498.
- 19 Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Cr terios Diagnósticos de Infec es**
20 **Relacionadas   Assist ncia   Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanit ria.** Brasília:
21 Anvisa, 2017
- 22 Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. **The Clermont Escherichia coli phylo-**
23 **typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-**
24 **groups.** Environ Microbiol Rep. 2013 Feb;5(1):58-65.
- 25 Córdova E, Lespada MI, Cecchini D, et al. **Prevalencia de gérmenes multirresistentes en**
26 **infecciones del tracto urinario de la comunidad y asociadas a los cuidados de la salud.**
27 Actual SIDA Infectol. 2014;22:33–8.
- 28 da Cruz Campos AC, Couto N, Lucas da Silva Andrade N, Friedrich AW, de Paula Rosa AC,
29 Vieira Damasco P, Chlebowicz-Fliss MA, Rossen JWA; SOLIDNESS Working Group.
30 **Virulence and resistance properties of E. coli isolated from urine samples of**

- 1 **hospitalized patients in Rio de Janeiro, Brazil - The role of mobile genetic elements.** Int
2 J Med Microbiol. 2020 Dec;310(8):151453.
- 3 Cunha MA, Assunção GL, Medeiros IM, Freitas MR. **Antibiotic resistance patterns of**
4 **urinary tract infections in a northeastern brazilian capital.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo.
5 2016;58:2
- 6 de Cueto M, Aliaga L, Alós JI, Canut A, Los-Arcos I, Martínez JA, Mensa J, Pintado V,
7 Rodriguez-Pardo D, Yuste JR, Pigrau C. **Executive summary of the diagnosis and**
8 **treatment of urinary tract infection: Guidelines of the Spanish Society of Clinical**
9 **Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC).** Enferm Infecc Microbiol Clin. 2017
10 May;35(5):314-320. English, Spanish.
- 11 Dhakal BK, Kulesus RR, Mulvey MA. **Mechanisms and consequences of bladder cell**
12 **invasion by uropathogenic *Escherichia coli*.** Eur J Clin Invest. 2008 Oct;38 Suppl 2:2-11.
- 13 Dozois CM, Dho-Moulin M, Brée A, Fairbrother JM, Desautels C, Curtiss R 3rd. **Relationship**
14 **between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and**
15 **localization and analysis of the Tsh genetic region.** Infect Immun. 2000 Jul;68(7):4145-54.
- 16 E. Simões de Paula. As origens da medicina. **A medicina no antigo Egito.**
17 file:///D:/Tese/Artigos/121683-Texto%20do%20artigo-227217-1-10-20161007.pdf
18 [www.journals.usp.br > revhistoria > article > download](http://www.journals.usp.br/revhistoria/article/download). Acessado em 03/09/2020/
- 19 Eriksson I, Gustafson Y, Fagerström L, Olofsson B. **Prevalence and factors associated with**
20 **urinary tract infections (UTIs) in very old women.** Arch Gerontol Geriatr. 2010 Mar-
21 Apr;50(2):132-5.
- 22 Eyer MM, Läng M, Aujesky D, Marschall J. **Overtreatment of asymptomatic bacteriuria: a**
23 **qualitative study.** J Hosp Infect. 2016 Jul;93(3):297-303.
- 24 Fasugba O, Gardner A, Mitchell BG, Mnatzaganian G. **Ciprofloxacin resistance in**
25 **community- and hospital-acquired *Escherichia coli* urinary tract infections: a**
26 **systematic review and meta-analysis of observational studies.** BMC Infect Dis. 2015 Nov
27 25;15:545
- 28 Foxman B. **The epidemiology of urinary tract infection.** Nat Rev Urol. 2010 Dec;7(12):653-
29 60.
- 30 Foxman B, Geiger AM, Palin K, Gillespie B, Koopman JS. **First-time urinary tract infection**
31 **and sexual behavior.** Epidemiology. 1995 Mar;6(2):162-8.

- 1 Foxman B, Marsh J, Gillespie B, Rubin N, Koopman JS, Spear S. **Condom use and first-time**
2 **urinary tract infection**. *Epidemiology*. 1997 Nov;8(6):637-41.
- 3 Foxman B, Gillespie B, Koopman J, Zhang L, Palin K, Tallman P, Marsh JV, Spear S, Sobel
4 JD, Marty MJ, Marrs CF. **Risk factors for second urinary tract infection among college**
5 **women**. *Am J Epidemiol*. 2000 Jun 15;151(12):1194-205.
- 6 Foxman B. **Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk**
7 **factors, and disease burden**. *Infect Dis Clin North Am*. 2014 Mar;28(1):1-13.
- 8 Foley SL, Horne SM, Giddings CW, Robinson M, Nolan LK. **Iss from a virulent avian**
9 **Escherichia coli**. *Avian Dis*. 2000 Jan-Mar;44(1):185-91.
- 10 Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. **Antimicrobial resistance among Gram-**
11 **negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial**
12 **Surveillance Program (Latin America, 2008-2010)**. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012
13 Aug;73(4):354-60.
- 14 Gonçalves LF, de Oliveira Martins-Júnior P, de Melo ABF, da Silva RCRM, de Paulo Martins
15 V, Pitondo-Silva A, de Campos TA. **Multidrug resistance dissemination by extended-**
16 **spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary**
17 **tract infection in the Central-Western Region, Brazil**. *J Glob Antimicrob Resist*. 2016
18 Sep;6:1-4.
- 19 Gusso GFD. **Diagnóstico de demanda em Florianópolis utilizando a Classificação**
20 **Internacional de Atenção Primária: 2ª edição (CIAP-2)** [tese]. São Paulo. Universidade de
21 São Paulo; 2009. 168 p. [Citado 10 Set 2014]. Disponível em:
22 <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5159/tde-08032010-164025/pt-br.php>
- 23 Gupta K, Hooton T, Naber KG et al. **International Clinical Practice Guidelines for the**
24 **treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update**
25 **by the Infectious Diseases Society of América and the European Society for**
26 **Microbiology and Infectious Diseases**. *Clinical Infectious Diseases* 2011; 52:e105-115.
- 27 Harmanli OH, Cheng GY, Nyirjesy P, Chatwani A, Gaughan JP. **Urinary tract infections in**
28 **women with bacterial vaginosis**. *Obstet Gynecol*. 2000 May;95(5):710-2.
- 29 Hooper DC, Jacoby GA. **Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance**. *Ann N Y*
30 *Acad Sci*. 2015 Sep;1354(1):12-31.

- 1 Hooton TM. Clinical practice. **Uncomplicated urinary tract infection.** N Engl J Med. 2012
2 Mar 15;366(11):1028-37.
- 3 Johnson JR, Stell AL. **Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from**
4 **patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise.**J Infect Dis
5 2000;181(1):261-72
- 6 Johnson JR, Stell AL. **Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from**
7 **patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise.** J Infect Dis. 2000
8 Jan;181(1):261-72.
- 9 Kahlmeter G, Poulsen HO. **Antimicrobial susceptibility of Escherichia coli from**
10 **community-acquired urinary tract infections in Europe: the ECO-SENS study revisited.**
11 Int J Antimicrob Agents. 2012 Jan;39(1):45-51.
- 12 Kang CI, Kim J, Park DW, Kim BN, Ha US, Lee SJ, Yeo JK, Min SK, Lee H, Wie SH. **Clinical**
13 **Practice Guidelines for the Antibiotic Treatment of Community-Acquired Urinary Tract**
14 **Infections.** Infect Chemother. 2018 Mar;50(1):67-100.
- 15 Klingeberg A, Noll I, Willrich N, Feig M, Emrich D, Zill E, Krenz-Weinreich A, Kalka-Moll W,
16 Oberdorfer K, Schmiemann G, Eckmanns T: **Antibiotic-resistant E. coli in uncomplicated**
17 **community-acquired urinary tract infection—a prospective cohort study from 2015/16**
18 **(the SARHA study) compared with data from the Antimicrobial Resistance Surveillance**
19 **System (ARS).** Dtsch Arztebl Int 2018; 115: 494–500.
- 20 Kotb DN, Mahdy WK, Mahmoud MS, Khairy RMM. **Impact of co-existence of PMQR genes**
21 **and QRDR mutations on fluoroquinolones resistance in Enterobacteriaceae strains**
22 **isolated from community and hospital acquired UTIs.** BMC Infect Dis. 2019 Nov
23 21;19(1):979.
- 24 Lichtenberger P, Hooton TM. **Complicated urinary tract infections.** Curr Infect Dis Rep.
25 2008 Nov;10(6):499-504.
- 26 Lüthje P, Brauner A. **Virulence factors of uropathogenic E. coli and their interaction with**
27 **the host.** Adv Microb Physiol. 2014;65:337-72.
- 28 Le Bouguéne C. **Adhesins and invasins of pathogenic Escherichia coli.** Int J Med
29 Microbiol. 2005 Oct;295(6-7):471-8.
- 30 Lo DS, Barreira ER, Gilio AE. **A Brazilian survey of the antimicrobial susceptibility of 847**
31 **Escherichia coli isolates from community-acquired urinary tract infections.** Urol Nephrol

- 1 Mulvey MA. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. Cell Microbiol. 2002
2 May;4(5):257-71.
- 3 Nicolaou KC, Rigol S. **A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis.**
4 J Antibiot (Tokyo). 2018 Feb;71(2):153-184.
- 5 Olson PD, Hunstad DA. **Subversion of Host Innate Immunity by Uropathogenic**
6 **Escherichia coli.** Pathogens. 2016 Jan 4;5(1):2.
- 7 Protocolos e diretrizes: **Antibioticoterapia e prevenção de infecções hospitalares /**
8 **Coordenação: Cláudia M. Dantas de Maio Carrilho, Jaqueline Dario Capobiango. – 4. ed. –**
9 **Londrina : Unimed, 2019. 183 p. : il.**
- 10 Ramos NL, Sekikubo M, Dzung DT, Kosnopfel C, Kironde F, Mirembe F, Brauner A.
11 **Uropathogenic Escherichia coli isolates from pregnant women in different countries.** J
12 Clin Microbiol. 2012 Nov;50(11):3569-74.
- 13 Walther-Rasmussen J, Høiby N. **OXA-type carbapenemases.** J Antimicrob Chemother. 2006
14 Mar;57(3):373-83.
- 15 Resolução-rdc nº 44, de 26 de outubro de 2010. Disponível em:
16 https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0044_26_10_2010.html
- 17 Reu CE, Volanski W, Prediger KC, Picheth G, Fadel-Picheth CMT. **Epidemiology of**
18 **pathogens causing urinary tract infections in an urban community in southern Brazil.**
19 Braz J Infect Dis. 2018 Nov-Dec;22(6):505-507.
- 20 de Rossi P, Cimerman S, Truzzi JC, Cunha CAD, Mattar R, Martino MDV, Hachul M, Andriolo
21 A, Vasconcelos Neto JA, Pereira-Correia JA, Machado AMO, Gales AC. **Joint report of SBI**
22 **(Brazilian Society of Infectious Diseases), FEBRASGO (Brazilian Federation of**
23 **Gynecology and Obstetrics Associations), SBU (Brazilian Society of Urology) and**
24 **SBPC/ML (Brazilian Society of Clinical Pathology/Laboratory Medicine):**
25 **recommendations for the clinical management of lower urinary tract infections in**
26 **pregnant and non-pregnant women.** Braz J Infect Dis. 2020 Mar-Apr;24(2):110-119.
- 27 Ruppé É, Woerther PL, Barbier F. **Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-**
28 **negative bacilli.** Ann Intensive Care. 2015 Dec;5(1):61.
- 29 Russo TA, Johnson JR. **Medical and economic impact of extraintestinal infections due to**
30 **Escherichia coli: focus on an increasingly important endemic problem.** Microbes Infect.
31 2003 Apr;5(5):449-56.

- 1 Stamm WE, Norrby SR. **Urinary tract infections: disease panorama and challenges.** J
2 Infect Dis. 2001 Mar 1;183 Suppl 1: S1-4.
- 3 Spoor LE, McAdam PR, Weinert LA, Rambaut A, Hasman H, Aarestrup FM, Kearns AM,
4 Larsen AR, Skov RL, Fitzgerald JR. Livestock origin for a human pandemic clone of
5 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. mBio. 2013 Aug
6 13;4(4):e00356-13. doi: 10.1128/mBio.00356-13. PMID: 23943757; PMCID: PMC3747577.
- 7 Stekel D. **First report of antimicrobial resistance pre-dates penicillin.** Nature. 2018
8 Oct;562(7726):192.
- 9 Stuck AK, Täuber MG, Schabel M, Lehmann T, Suter H, Mühlemann K. **Determinants of**
10 **quinolone versus trimethoprim-sulfamethoxazole use for outpatient urinary tract**
11 **infection.** Antimicrob Agents Chemother. 2012 Mar;56(3):1359-63.
- 12 Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. **Infectious Diseases**
13 **Society of America Antimicrobial Resistant Treatment Guidance: Gram-Negative**
14 **Bacterial Infections.** Clin Infect Dis. 2020 Oct 27:ciaa1478.
- 15 Tavares NUL, Bertoldi AD, Muccillo-Baisch AL. **Prescrição de antimicrobianos em**
16 **unidades de saúde da família no Sul do Brasil.** Cad. Saúde Pública. 2008;24(8):1791-800.
17
- 18 Tubino P, Alves EMO. **A urina na história da medicina.** Jornal Brasileiro da História da
19 Medicina 201;17 (1): 9-19.
20
- 21 Walther-Rasmussen J, Høiby N. **Class A carbapenemases.** J Antimicrob Chemother. 2007
22 Sep;60(3):470-82.
- 23 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (acesso dia
24 20/01/2021)
- 25
26
27
28
29
30

- 1 12.Anexos
- 2 1.Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina