

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL

Ubiratan Alegransi Bones

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Escherichia coli* E AVALIAÇÃO
DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

Frederico Westphalen, RS
2023

Ubiratan Alegransi Bones

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Escherichia coli* E AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e tecnologia Ambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) *campus* Frederico Westphalen, como requisito de obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental**.

Orientador: Prof. Dr. Genesio Mario da Rosa

Frederico Westphalen, RS
2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Bones, Ubiratan Alegransi
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE Escherichia coli E
AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS / Ubiratan
Alegransi Bones.- 2023.
76 p.; 30 cm

Orientador: Genesio Mario da Rosa
Coorientador: Jefferson Alves da Costa Junior
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Campus de Frederico Westphalen, Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, RS, 2023

1. Biologia Molecular 2. Microbiologia 3. Saúde
Pública 4. Meio Ambiente I. Mario da Rosa, Genesio II.
Alves da Costa Junior, Jefferson III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, UBIRATAN ALEGRANSI BONES, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Ubiratan Alegransi Bones

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Escherichia coli* E AVALIAÇÃO DE
SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e tecnologia Ambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) campus Frederico Westphalen, como requisito de obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental**.

Aprovada em 27 de abril de 2023.

Genesio Mario da Rosa, Dr. (UFSM)
(Orientador)

Jefferson Alves da Costa Junior (UFSM)
(Co-orientador)

Alexandre Tiburski Neto, Dr. (UNOESC)

Paulo Ricardo Del'Armeline Rocha, Dr. (FIOCRUZ)
(Parecerista)

Frederico Westphalen, RS
2023

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, por todo o esforço que fizeram para que eu pudesse estudar.

AGRADECIMENTOS

Com tantas pessoas especiais que estiveram em minha vida, desde o dia em que nasci, é quase doloroso agradecer com nomes, sabendo que seria injusto. Além de minha família, amigos, devo agradecer a todo ser vivo e não vivo que cruzou meu caminho, pois cada detalhe é de extrema importância para a formação de um ser humano.

Em todos esses anos fui ensinado a caminhar, falar, comer, me relacionar, amar, conviver, respeitar, agir e dar valor para tudo. Eu tive oportunidades que, infelizmente, são negadas à maioria da população, principalmente àqueles que nascem em lugares e famílias menos favorecidas. Portanto, sei que cada passo dado não é um mérito próprio ou fruto de exclusividade. Não há nada na vida que seja feito individualmente, pois tudo dependerá de alguém ou algo a mais para acontecer.

Desse modo, agradeço por ter nascido e por ainda estar vivo para poder tentar melhorar como humano e, conseqüentemente, proporcionar uma vida melhor aos demais. Deixo meu carinho pela instituição, professores, servidores e todos os demais que trabalham para que a educação seja prioridade no País. Agradeço à UFSM, CAPES, CNPQ e FAPERGS, pelos recursos que viabilizaram esse e outros trabalhos que ainda serão publicados.

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Escherichia coli* E AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

AUTOR: Ubiratan Alegransi Bones

ORIENTADOR: Genesisio Mario da Rosa

A qualidade dos recursos naturais garante a sobrevivência e perpetuação de espécies. Nesse sentido, a água é um recurso primário e indispensável para a existência de vida no planeta. Em função da degradação ambiental generalizada, causada mau uso e ocupação do solo, os recursos hídricos encontram-se contaminados por poluentes químicos, físicos e microbiológicos. Porém, alguns destes carecem de legislação que disponha sobre a necessidade de monitoramento de presença ou quantificação. No caso dos contaminantes microbiológicos, *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria amplamente reconhecida e discutida pela ciência. Inicialmente prevista como um microrganismo comensal da flora intestinal de animais e sangue quente, passou a ser entendida como um risco de saúde global, em função de sua capacidade de mutação. Além de possuir características intrínsecas de um patógeno, devido à sua estrutura celular, *E. coli* adquiriu maior resistência às pressões seletivas e virulência para invadir e colonizar células de hospedeiros, devido à mecanismos genéticos e ambientais. Em função disso, os tratamentos convencionais utilizados para tratar pacientes tem perdido sua eficácia ano após ano e a própria organização mundial da saúde trata desse assunto como uma ameaça prioritária a ser neutralizada. Desse modo, considerando a grande quantidade de infecções registradas no Brasil e no mundo, por essa bactéria, é relevante que sejam realizados estudos analíticos que respondam quais são as possíveis fontes de contaminação e disseminação deste patógeno no ambiente, de modo a favorecer as ações de instituições públicas, em defesa da população. O presente trabalho analisou uma série histórica de vinte anos disponibilizados pelo Ministério da Saúde, de surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) e a partir da análise desses dados, identificou-se uma crescente em infecções de *E. coli* de cinco patotipos. A partir disso, seguiu-se para uma pesquisa de campo, com o intuito de estudar o dinamismo do perfil de resistência ou susceptibilidade bacteriana na superfície da água de microbacias com diferentes usos e ocupação do solo. Os resultados dessa pesquisa demonstraram que a resistência de *E. coli* está prevalecendo nos mais diversos compartimentos ambientais, com maior ênfase para as aglomerações urbanas, o que sugere ainda mais estudos sobre a persistência desse microrganismo no ambiente e seus mecanismos de patogenicidade.

Palavras-chave: Poluentes. Microrganismos. Resistência.

ABSTRACT

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Escherichia coli* AND EVALUATION OF SENSITIVITY TO ANTIMICROBIALS

AUTHOR: Ubiratan Alegransi Bones

ADVISOR: Genesis Mario da Rosa

The quality of natural resources guarantees the survival and perpetuation of species. In this sense, water is a primary and indispensable resource for the existence of life on the planet. Due to widespread environmental degradation, caused by misuse and occupation of land, water resources are contaminated by chemical, physical and microbiological pollutants. However, some of these lack legislation that provides for the need to monitor their presence or quantification. In the case of microbiological contaminants, *Escherichia coli* (*E. coli*) is a bacterium widely recognized and discussed by science. Initially envisaged as a commensal microorganism of the intestinal flora of warm-blooded animals, it came to be understood as a global health risk, due to its ability to mutate. In addition to having intrinsic characteristics of a pathogen, due to its cellular structure, *E. coli* acquired greater resistance to selective pressures and virulence to invade and colonize host cells, due to genetic and environmental mechanisms. As a result, conventional treatments used to treat patients have lost their effectiveness year after year and the world health organization itself treats this issue as a priority threat to be neutralized. Thus, considering the large number of infections registered in Brazil and in the world, by this bacterium, it is important that analytical studies be carried out that answer what are the possible sources of contamination and dissemination of this pathogen in the environment, in order to favor the actions of public institutions, in defense of the population. The present work analyzed a historical series of twenty years made available by the Ministry of Health, of outbreaks of diseases transmitted by water and food (DTHA) and from the analysis of these data, an increase in *E. coli* infections of five pathotypes was identified. From this, field research was carried out, with the aim of studying the dynamism of the bacterial resistance or susceptibility profile on the water surface of watersheds with different land uses and occupation. The results of this research demonstrated that *E. coli* resistance is prevailing in the most diverse environmental compartments, with greater emphasis on urban agglomerations, which suggests further studies on the persistence of this microorganism in the environment and its pathogenicity mechanisms.

Keywords: Polluting. Microorganisms. Resistance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 CAPÍTULO 1 – MANUSCRITO 1. VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA BACTERIANA EM <i>Escherichia coli</i>: FATORES DE PATOGENICIDADE DE ALERTA GLOBAL	14
3.1 INTRODUÇÃO	15
3.1.1 <i>Escherichia coli</i> como principal causador de surtos de DTHA no brasil	16
3.1.2 principais patótipos humanos de <i>Escherichia coli</i>	19
3.1.2.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica – EPEC.....	22
3.1.2.2 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica – ETEC	23
3.1.2.3 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva – EIEC.....	24
3.1.2.4 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa – EAEC.....	24
3.1.2.5 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica – EHEC	25
3.1.2.6 <i>Escherichia coli</i> de aderência difusa – DAEC	26
3.1.2.7 <i>Escherichia coli</i> de aderência difusa – AIEC.....	27
3.1.2.8 <i>Escherichia coli</i> Uropatogênica – UPEC	27
3.1.2.9 <i>Escherichia coli</i> causadora de meningite neonatal – NMEC	28
3.1.2.10 <i>Escherichia coli</i> causadora de septicemia – SEPEC	28
3.1.3 Mecanismos de resistência aos antibióticos em <i>Escherichia coli</i>	29
3.1.3.1 Resistência natural.....	31
3.1.3.2 Resistência adquirida.....	31
3.1.4 Relação entre resistência e virulência bacteriana	34
3.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS	37
4 CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO 2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>Escherichia coli</i> E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA BACTERIANA EM MICROBIAS COM DIFERENTES USOS E OCUPAÇÃO DO SOLO	46
4.1 INTRODUÇÃO.....	38
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.2.1 Coleta das amostras de água e caracterização da área de estudo	36
4.2.2 Cultura Estoque	36
4.2.3 Quantificação de <i>Escherichia coli</i> e coliformes totais	36

4.2.4 Métodos de isolamento bacteriano para <i>Escherichia coli</i>	36
4.2.5 Procedimentos e reagentes para PCR	36
4.2.5.1 Tampão de corrida da amostra e gel de agarose	36
4.2.5.2 Pré-Mix para PCR	36
4.2.5.3 Análise de especificidade, preparo e diluição dos oligonucleotídeos – primers	36
4.2.5.4 Quantificação dos reagentes para amplificação.....	36
4.2.5.5 Obtenção do DNA bacteriano e amplificação em termociclador	36
4.2.5.6 Ajuste de parâmetros para eletroforese	36
4.2.6 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos	36
4.2.6.1 Cálculo da Múltipla resistência a antibióticos das cepas de <i>Escherichia coli</i>	36
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.3.1 Determinação do uso e ocupação do solo nas diferentes microbacias da área estudada	36
4.3.2 Análise Microbiológica: Determinação da presença ou ausência e quantificação de <i>Escherichia coli</i>	36
4.3.3 Isolamento e identificação molecular de <i>Escherichia coli</i>	36
4.3.4 Perfil de resistência das cepas isoladas aos antimicrobianos	36
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS	36
5 CONCLUSÕES FINAIS GERAIS	36
REFERÊNCIAS GERAIS	36

1 INTRODUÇÃO GERAL

A água é um bem primário para a existência de vida no planeta. Nesse sentido, a disponibilidade e segurança desse recurso, para consumo ou recreação, deve ser assegurado para todos, pois dá suporte à saúde e gera qualidade de vida. No entanto, em países com menores condições econômicas e baixa cobertura de indicadores de saneamento básico, a água tende a possuir baixa qualidade e até oferecer riscos à saúde pública, devido a poluição que facilita a presença de microrganismos patogênicos. Desse modo, a gestão da água, desde o manejo, captação, tratamento e abastecimento, deve ser rigorosa para garantir a segurança dos consumidores (STEC et al., 2022).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 50% dos óbitos por doenças relacionadas à água é causada por infecções bacterianas intestinais (WATER et al., 2002). O problema das doenças causadas por micróbios transmitidos pela água é um grande desafio de saúde pública. Isso ocorre devido à baixa qualidade microbiológica de reservatórios de águas naturais, que pode levar a sérias consequências, seja pelo contato recreativo ou como finalidade de consumo humano. Por isso é imprescindível que seja realizado o monitoramento da qualidade de águas superficiais (NAIDOO e OLANIRAN, 2014; FEWTRELL e KAY, 2015; MAGANA-ARACHCHI e WANIGATUNGE, 2020).

Os riscos para a saúde humana associado à água não potável, especialmente de fontes naturais, ainda não configuram um consenso, considerando que a qualidade das águas superficiais pode mudar rapidamente. Essas mudanças podem representar alto risco, principalmente quando são relativas aos agentes bacterianos, que possuem potencial patogênico diversificado e dinamismo com outros agravantes ambientais. Essas mudanças, geralmente ocorrem no ambiente, devido à liberação de águas residuais municipais domésticas, escoamento de águas pluviais, efluentes industriais, bem como efluentes agropecuários que são lançados em mananciais, como rios e lagos (NAIDOO e OLANIRAN, 2014; EDOKPAYI, ODIYO e DUROWOJU, 2017).

No contexto microbiológico, de acordo com os relatórios de doenças de transmissão hídrica e alimentar do País (BRASIL, 2021), o microrganismo que mais causou doenças dessa modalidade, na última década, foi *Escherichia coli*, bactéria presente naturalmente no corpo humano que contribui com funcionamento correto dos órgãos e organismo. *E. coli*, por exemplo, é amplamente conhecida e estudada por sua versatilidade, pois além de ser um microrganismo comensal em humanos, é utilizada para produção de fármacos e enzimas industriais. Além disso, reduz as chances de colonização por bactérias patogênicas e favorece o hospedeiro ao produzir

vitamina K e B12, que favorecem o processo de coagulação do sangue e a formação de glóbulos vermelhos. No entanto, ao passo que pode gerar inúmeros benefícios, essa bactéria também pode gerar doenças intestinais e extra intestinais, bem como outros danos, em função das mutações sofridas constantemente para sua adaptação e sobrevivência (BENTLEY e MEGANATHAN, 1982; LAWRENCE e ROTH, 1996; BLOUNT, 2015).

Os fatores ligados às mutações em *E. coli*, podem gerar virulência e aumento da resistência contra antibióticos. A virulência se desenvolve desde o início da colonização. Essa característica, atribuída à *E. coli*, uma caracterização em diferentes grupos, classificados como patotipos, determinando diferenças na capacidade de colonizar as células e tecidos do hospedeiro, também atribuída ao conjunto de genes e os locais de infecção. No caso da resistência, há uma separação por classes de drogas, levando em consideração os sítios de inibição da ação dos antibacterianos. A resistência existe desde a exposição dos microrganismos à droga no ambiente. Por isso, apesar desta ser uma tendência natural, o problema tem sido acentuado em função do uso indevido e indiscriminado de antibióticos (BECEIRO, TOMÁS e BOU, 2013).

Em função do aumento de pesquisas debatendo o assunto e dos riscos que cepas patogênicas de *E. coli* representam à saúde pública, as discussões para compreensão das origens desses fatores, bem como os meios de disseminação e consequências, passam a exigir dos pesquisadores uma análise sistemática. Desse modo, faz-se necessário estudar as potencialidades do agente patogênico, analisando o grau de risco de sua persistência e quais ambientes podem estar associados ao aumento da resistência das bactérias (DCD, 2023). Apesar do exposto, uma das grandes lacunas existentes na ciência é a falta de pesquisas que, ao menos, possam sugerir ou indicar possíveis focos de persistência de bactérias resistentes, que facilitem a ação das autoridades para uma tomada de decisões assertivas.

Nesse sentido, não só no Brasil, como em outros países, cepas de *E. coli* patogênica são consideradas um dos maiores problemas microbiológicos persistentes da atualidade, causando milhares de doentes e óbitos todos os anos. Com aumentos significativos em seu perfil de resistência aos antibióticos de todas as classes, sendo algumas cepas quase impossíveis de combater com doses convencionais dos fármacos. As medidas atuais, para mitigar esses problemas, além da prospecção de novos fármacos é a recomendação de diminuição do uso de doses sub-letais para produção de alimentos de origem animal, bem como a redução para tratamento humano, quando não for necessário (WHO, 2020; CDC, 2021; ECDC, 2023).

Desse modo, essa pesquisa foi executada de forma a estudar os fatores de patogenicidade mais relevantes e atuais, presentes em cepas de *E. coli*, discutindo, de forma sistemática, as

interações que facilitam a adaptação e evolução do microrganismo para garantir sua sobrevivência. Além disso, a segunda etapa deste trabalho teve o objetivo de analisar as correlações entre o perfil de resistência de isolados ambientais de *E. coli*, com os diferentes tipos de uso e ocupação do solo, em microbacias localizadas no norte do Rio Grande do Sul.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a bactéria *Escherichia coli* e avaliar o perfil de resistência e susceptibilidade de cepas isoladas da superfície da água em sub-bacias de um lajeado, com diferentes características de uso e ocupação do solo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Realizar uma revisão de literatura atual sobre os fatores de patogenicidade de *E. coli*;
- II. Avaliar a presença e quantificar *E. coli* ao longo do Lajeado Pardo;
- III. Identificar cepas de *E. coli*, por meio de PCR e avaliar o perfil de suscetibilidade a antibacterianos;
- IV. Analisar a persistência de resistência nas microbacias com diferentes usos e ocupação do solo;

3 CAPÍTULO 1 – MANUSCRITO 1. VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA BACTERIANA EM *Escherichia coli*: FATORES DE PATOGENICIDADE DE ALERTA GLOBAL

RESUMO

O potencial patogênico de microrganismos está diretamente ligado à sua capacidade de mutação para adaptação nos diferentes ambientes aos quais são submetidos. Nesse sentido, *Escherichia coli* é a bactéria mais estudada na atualidade, devido à sua facilidade em adquirir genes que lhe permitem invadir células humanas, persistir em diversas partes do corpo e resistir a grande parte dos fármacos conhecidos nos centros de tratamento. A partir de uma análise bibliométrica, de manuscritos publicados sobre *E. coli*, observou-se a relação entre algumas palavras-chave amplamente citadas no espaço amostral do mapa gerado. Em função disso, esse manuscrito procedeu como uma análise de dados do relatório de doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) causadas por esse patógeno no Brasil. Considerando a relevância observada no relatório, seguiu-se para uma avaliação do estado da arte da ciência, para descrever todos os patótipos de *E. coli* capazes de infectar humanos, citados na literatura. Além disso, descrever os fatores de resistência e a relação sinérgica ou antagônica entre a virulência e resistência nas células bacterianas. Os resultados revelaram que o microrganismo aqui citado, representou mais de 20% de todas as infecções causadas por veiculação hídrica e alimentar no País. Além disso, dos dez patótipos apresentados ao longo desse manuscrito, cinco já foram notificados no Brasil. A facilidade de disseminação de *E. coli* no ambiente e o alto potencial patogênico de suas cepas mutantes sugere a necessidade de um alerta para toda a população. Levando em conta a subnotificação de casos e a precariedade dos sistemas sanitário e de saúde pública brasileiros, faz-se necessário que as autoridades entendam a gravidade e o potencial epidemiológico dessa bactéria.

Palavras-chave: Análise bibliométrica. Fatores de patogenicidade. Epidemiologia.

VIRULENCE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN *Escherichia coli*: GLOBAL ALERT PATHOGENICITY FACTORS

ABSTRACT

The pathogenic potential of microorganisms is directly linked to their ability to mutate to adapt to the different environments to which they are subjected. In this sense, *Escherichia coli* is the most studied bacterium today, due to its ability to acquire genes that allow it to invade human cells, persist in different parts of the body and resist most of the drugs known in treatment centers. From a bibliometric analysis of published manuscripts on *E. coli*, the relationship between some widely cited keywords in the sample space of the generated map was observed. As a result, this manuscript proceeded as an analysis of data from the report on waterborne and foodborne diseases (DTHA) caused by this pathogen in Brazil. Considering the relevance observed in the report, an evaluation of the state of the art of science was carried out, to describe all the pathotypes of *E. coli* capable of infecting humans, mentioned in the literature. Furthermore, describe resistance factors and the synergistic or antagonistic relationship between virulence and resistance in bacterial cells. The results revealed that the microorganism

cited here represented more than 20% of all infections caused by water and food transmission in the country. In addition, of the ten pathotypes presented throughout this manuscript, five have already been reported in Brazil. The ease of dissemination of *E. coli* in the environment and the high pathogenic potential of its mutant strains suggest the need for a warning to the entire population. Taking into account the underreporting of cases and the precariousness of the Brazilian sanitary and public health systems, it is necessary for the authorities to understand the seriousness and epidemiological potential of this bacterium.

Key-words: Bibliometric analysis. Pathogenicity factors. Epidemiology.

3.1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*), além de ser um microrganismo comensal e viver de forma harmônica no organismo de humanos e outros animais, também é conhecida por ser uma das causas mais comuns de diarreias. No entanto, a preocupação com esse agente infeccioso vem crescendo, devido ao fato de nos últimos 20 anos haver a identificação de cepas virulentas dessa bactéria associadas a notificações de doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA).

Além de sintomas diarreicos, o microrganismo é responsável por cerca de 90% de todas as infecções do trato urinário (ITU), gerando altos custos financeiros e causando significativa mortalidade entre os pacientes infectados (MOMTAZ H, et al., 2013; JOHNSON JR, 1991). De acordo com o Ministério da Saúde (2022), casos ainda mais graves são relatados em relação à infecção intestinal sanguinolenta (colite hemorrágica), que pode ainda evoluir para complicações extraintestinais como uma síndrome hemolítico uremica. Todas essas complicações são diretamente ligadas aos fatores de virulência dos patótipos de *E. coli*, sejam eles intrínsecos ou adquiridos pelas bactérias, que estão constantemente em contato com diversos ambientes suscetíveis a mutações.

A resistência antimicrobiana (RAM) está presente nos mais diversos agentes infecciosos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas, podendo ser relacionados a uma questão natural, relativa ao ambiente ou adquiridos pelo uso inadequado de medicamentos. Essa resistência é uma ameaça crescente à saúde pública de preocupação significativa para os países e para a saúde pública. Existem evidências crescentes da identificação de bactérias multirresistentes que causam infecções consideradas simples, mas que, devido ao fato de serem resistente ao tratamento com medicamentos convencionais, torna-se um problema grave (WHO, 2021).

O ambiente e seus reservatórios contribuem para o surgimento e disseminação da virulência e resistência de microrganismos. Locais de descarga de águas residuais de comunidades ou industriais, unidades de saúde, fabricantes de antimicrobianos, produção

animal e vegetal possuem alta carga microbiana e facilitam a sobrevivência e mutação destes das mais diversas formas (FAO, 2016).

Apesar de existir uma gama de trabalhos sobre vários patógenos microbianos, geralmente são discutidos de forma fragmentada, abordando partes do problema. Porém, é necessário que haja uma visão integral para o entendimento e ação de mitigação ou resolução dos possíveis danos à saúde humana e ambientais, atendendo inclusive os objetivos do desenvolvimento sustentável (ODS) que dignificam a vida humana. Em específico, o objetivo três, visa garantir o acesso à saúde de qualidade e promover o bem-estar para todos, em todas as idades. Para o cumprimento dessa meta, muitos esforços deverão ser voltados ao cuidado com a disseminação de microrganismos resistentes e virulentos, com ênfase à *E. coli*, que representa a maior parcela das infecções e doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) do País. O Brasil, de acordo com o relatório de 2020, encontra-se na classificação médio-alto em relação à cobertura de informações sobre AMR (WHO, 2021).

No ano de 2019, a resistência microbiana foi declarada como uma das 10 principais ameaças globais à saúde pública, enfrentadas pela humanidade. De acordo com relatório da Organização Pan-Americana de Saúde – OPS (2023), desde o ano de 2014, *Escherichia coli* é o patógeno mais representativo em relação à resistência antimicrobiana. Juntamente com seus fatores de virulência forma-se um fenômeno de riscos complexos e será necessária uma abordagem intersetorial para harmonizar humanos, animais, plantas e meio ambiente. Assim, a vigilância é uma ferramenta fundamental para monitorar os padrões emergentes de agentes infecciosos, a capacidade e efetividade na contenção destes.

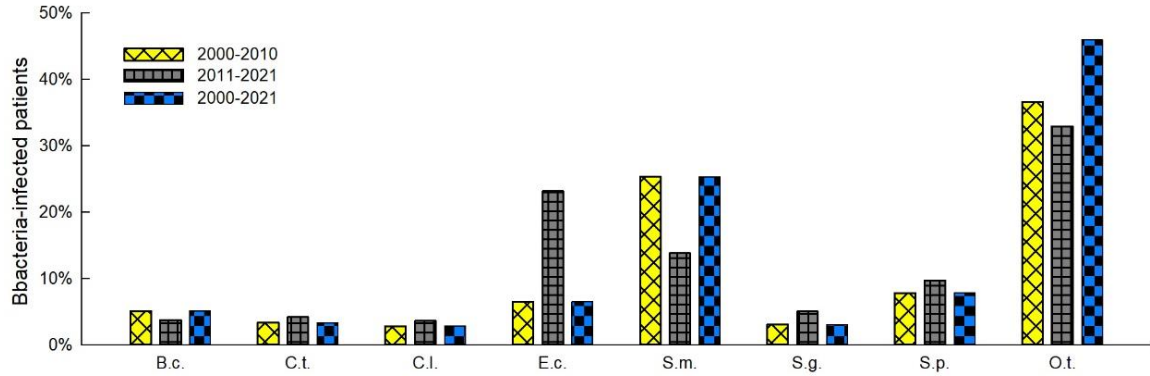
A partir da análise bibliométrica e dos casos de DTHA notificados desde o ano 2000 até 2021 no Brasil, enfatiza-se que a bactéria alvo desse estudo, possui destaque nos casos de infecções. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é abordar características específicas de virulência e resistência em *E. coli* e a relação entre esses dois fatores, bem como discutir informações relevantes e atualizadas sobre seu potencial patogênico.

3.1.1 *Escherichia coli* COMO PRINCIPAL CAUSADOR DE SURTOS DE DTHA NO BRASIL

De acordo com dados do DATASUS (2020), foram registrados mais de 167 mil internações e 1898 óbitos causados por doença de veiculação hídrica. Nesse mesmo ano, foram totalizados mais de 70 milhões de reais gastos com essas internações. Em consonância com esses dados, *E. coli* foi o agente etiológico que mais causou surtos de DTHA no país (23,16%),

nos últimos dez anos registrados. Destaca-se a primeira década dos anos 2000 (Figura 1), quando outros microrganismos representaram grande parcela de infecções e doenças, tendo uma maior representatividade de *Salmonella*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

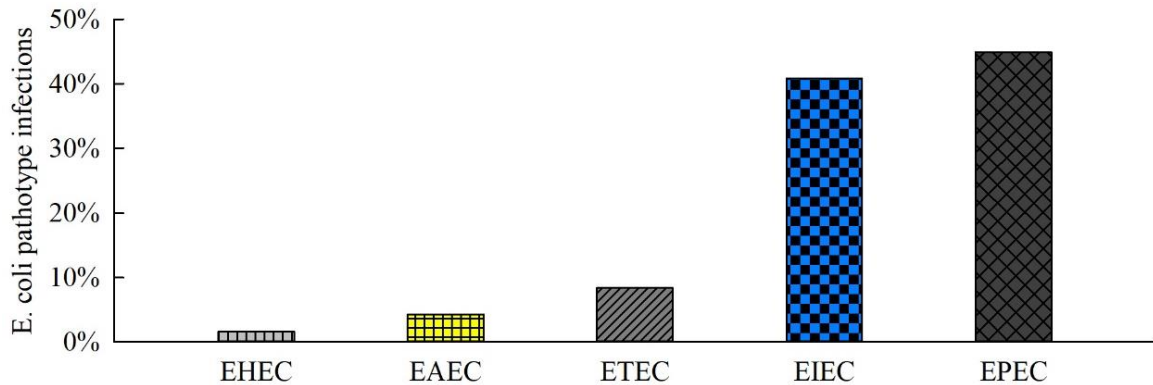
Figura 1 – Principais agentes etiológicos causadores de surtos de DTHA, por período.



Fonte: Autor (2023).

Considerando a importância de *E. coli* como um poluente emergente e com alto potencial de mutação, apesar das limitações técnicas para detecção e diferenciação de subespécies, no País, houve um aumento de mais de 60% das notificações de surtos causadas por diferentes patótipos de *E. coli*. Dentre as cepas patogênicas dessa bactéria (conforme a figura 2), apenas cinco, dos sete patótipos conhecidos, já foram notificados como agentes causadores de DTHA no Brasil.

Figura 2 – Principais patótipos de *Escherichia coli* causadores de DTHA, no Brasil.



*CEPAS: *EHEC – Enterohemorrágica; *EAEC – Enteroagregativa; *ETEC – Enterotoxigênica; *EIEC – Enteroinvasiva; *EPEC – Enteropatogênica.

Fonte: Autor (2023).

riscos à saúde pública, discutiu-se a classificação dos patótipos virulentos e os mecanismos de resistência da bactéria.

3.1.2 PRINCIPAIS PATOTIPOS HUMANOS DE *Escherichia coli*

Fatores de virulência são moléculas específicas, principalmente proteínas produzidas e liberadas por bactérias, fungos, protozoários e vírus. Esses fatores são codificados por genes específicos localizados no cromossomo ou elementos genéticos móveis (por exemplo, plasmídeos ou transposons) em patógenos bacterianos. Cada patótipo de *E. coli* tem seus mecanismos de patogenicidade característicos e um perfil específico de fatores de virulência codificados por agrupamentos de genes específicos (WU, WANG E JENNINGS, 2008; ALEGBELEYE, SINGLETON E SANT'ANA 2018).

Parte dos patótipos de *E. coli* causam, em sua maioria, problemas especificamente intestinais, sendo eles: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa coli (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e, um novo patótipo, *E. coli* aderente-invasiva (AIEC), causando principalmente diarreia e distúrbios intestinais (ALEGBELEYE E SANT'ANA, 2020).

Além destes, existem outros patótipos de *E. coli* altamente patogênicas, definidas como patógenos extra intestinais (ExPEC), que podem causar infecções do trato urinário, septicemia e meningite neonatal em humanos. Essas cepas são abrangidas pelos patótipos *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada a sepse (SEPEC), *E. coli* causadora de meningite neonatal (NMEC) (BÉLANGER et al. 2011 ; MESSAILI, MESSAI E BAKOUR, 2019).

Na tabela 1, são apresentados os patótipos de *E. coli* comentados anteriormente, bem como há uma abordagem de parte dos genes e suas funções que conferem virulência à essa bactéria. Os dados encontrados na literatura passaram por conferência no banco de dados Genbank – National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Tabela 1 - Patótipos e genes de virulência em *Escherichia coli*

Patótipo	Função	Genes
EPEC	Expressão de fímbrias	csgA, fimA
	Aderência	bfp
	Fixação e remoção do enterócito	eae
	Receptor translocado de intimina	tir
	Ligação inicial aos enterócitos	lifA
	Perturbação da funcionalidade mitocondrial e morte da célula hospedeira	MAP
	Sinalização de quorum	sdiA

	Estruturas translocadoras de T3SS, pili comum de <i>E. coli</i>	espA
	Estruturas translocadoras de T3SS, inibição da fagocitose	espB
	Clivagem de estruturas translocadoras T3SS	espC, espP
	Estruturas translocadoras de T3SS	espD
	Evasão mune, morte da célula hospedeira	espF
	Inibição da fagocitose	espH
	Inibição da fagocitose e formação de biofilme	espJ
	Ativação do inflassoma, inibição da secreção de citocinas	nleA
	Ativação do inflassoma e morte da célula hospedeira	nleF
	Interrupção do ciclo celular e retardo da apoptose	cif
EHEC	Fixação e remoção do enterócito	eae
	Receptor translocado de intimina	tir
	Expressão de fímbrias	csgA, fimA
	Efeito citotóxico, localização da superfície de nucleolina	stx1, stx2
	Evasão mune, morte da célula hospedeira	espF
	Inibição da fagocitose e formação de biofilme	espJ
	Morte da célula hospedeira	espT
	Ativação do inflassoma e morte da célula hospedeira	nleF
	Fímbrias polares longas e fixação inicial	lfp
	Formação de biofilme	nle(H,Eou B), bleG, sab, saa, eha
	Estabelecimento de biofilme e adesão	toxB
EIEC	Síntese de aerobactina	iutA
	Complexo receptor de ferro sideróforo	iucB
	Atividade mucolítica, indução de extrusão de células epiteliais, SPATE, expressão de ShET1	pic
	Citotoxina, acúmulo de fluido intestinal, SPATE	sigA
	Efector tipo III, reorganização do citoesqueleto, bloqueio de morte celular	ipaA
	Efector tipo III, adesão, escape do fagossomo, renovação celular	ipaB
	Efector tipo III, adesão, polimerização de actina, escape do fagossomo	ipaC
	Efector tipo III, adesão, escape do fagossomo, bloqueio da morte celular	ipaD
	Invasão e ameniza a resposta inflamatória	ipaH
	Inibição da membrana de tráfego de células hospedeiras, inibição de inflamassomas	ipaJ
	Reorganização do citoesqueleto, formação de rugosidades	ipgB1
	Reorganização do citoesqueleto	ipgD
	Reorganização do citoesqueleto, inibição da autofagia, bloqueio da morte celular	vira
	Síntese genética do fator de virulência	virB
	Expressão gênica do fator de virulência	virF
	Nucleação de actina	virG
	Ameniza a resposta inflamatória	ospB
	Descolamento celular	ospE
	Ameniza a resposta inflamatória	ospF, ospG, ospI, ospZ
AIEC	Fator necrosante citotóxico I	cnf eu
	Lipopolissacarídeo, principais partes da membrana externa	Ips
	Atravessamento da camada mucosa e peptídeos de defesa do hospedeiro	lpfA
	Invasão da proteína A do endotélio cerebral	ibeA
	Invasão, ameniza a resposta inflamatória	ipaH
	Síntese de cápsulas	kpsMT II
	α -Hemolisina	hlyA
	Captação de yersiniabactina férrica	fyuA
	Proteína de resposta ao estresse polipeptídico	yjaA
	Fímbria	fimH, sfa
DAEC	Fímbria	fimA
	Afa/Dr adesinas, secreção de IL-8	afaA-E
	Rearranjo do citoesqueleto, destruição microvilosidades, Afa/Dr adesinas, secreção de IL-8, expressão de MICA	DraA-E, daaA-E

	Adesina, pili	pop
	Toxina enteroagregativa estável ao calor, diarreia secretora	astA
	Indução da extrusão de células epiteliais, entrada na célula hospedeira, SPATE	pet
	Citotoxina, acúmulo de fluido intestinal, SPATE	sigA
	SPATE, toxina autotransportadora secretada, mediação da autofagia	sat
	Clivagem de estruturas translocadoras T3SS	espP
ETEC	Colonização	CFA/I, CFA/II, CFA/IV, CS1-6
	Ligação inicial	etpA
	Toxina ST I, diarreia aquosa e secretora, secreção de quimiocinas e citocinas	estA, estB
	Diarréia aquosa	LT I, LT II
	SPATE	eatA
	Toxina enteroagregativa estável ao calor, diarreia secretora	astA
	Shigella enterotoxina, secretor de atividade intestinal	ShET1, ShET2
	Proteína autotransportadora	etp
	Secreção de toxinas ST	tolC
EAEC	Dispersão no epitélio intestinal (dispersina)	Aap
	Sistema de secreção tipo VI (T6SS)	aaiA-Y
	Toxina alfa-hemolisina	hlyE
	Enterotoxina extracelular de shigella, citotoxina	sepA
	Citotoxina, acúmulo de fluido intestinal, SPATE	sigA
	Indução da extrusão de células epiteliais, entrada na célula hospedeira, SPATE	pet
	Atividade mucolítica, indução de extrusão de células epiteliais, SPATE, expressão de ShET1	pic
	Toxina enteroagregativa estável ao calor, diarreia secretora	astA
	Fímbria de adesão agregativa	aggA, aafA, agg3A, agg4A, agg5A
	Fixação e aderência	aggR
UPEC	Produção de Hemolisina	Hly (A; F; D)
	Fator necrosante citotóxico	cnf1
	Colicina	cvaC
	Fatores de adesão que ligam o fator de interferência de decaimento (DAF)	drb
	Aderência a células uroepiteliais e invasão mediada por FimH	<i>fim1</i>
	Fator de adesão	<i>hra, iha, sfa</i>
	Aderência às células uroepiteliais	<i>papG_{AD/IA2}, prsG_{J96}</i>
	Protease de membrana externa	<i>ompT</i>
	Produção de polissacarídeos capsulares	<i>kpsMT</i>
	Receptor de sideróforo	<i>iroN</i>
	Sideróforo que se liga ao ferro	<i>iucD</i>
	Autotransportador de serina protéase - colonização intestinal	<i>picU</i>
	Toxina autotransportadora secretada	sat
	Bacteriocina	usp
	Toxina autotransportadora vacuolizante	<i>iva, vat</i>
	Aerobactina	<i>iutA</i>
	Pili associado à pielonefrite	<i>papEF, papG(II; III), papC, papA</i>
	Aglutinina resistente ao calor	<i>hra</i>
	Adesina afimbrial	<i>afa</i>
SEPEC	Fímbrias	<i>Sfa, foc</i>
	Pili	<i>fimH</i>
	Receptor de sideróforo	<i>iroN</i>
	Colicina	<i>cvaC</i>
	Aumento da sobrevivência sérica	<i>iss</i>
	Polissacarídeo capsular	<i>kpsMKI, kpsMTII</i>
	Fator necrotizante citotóxico	<i>cnf1</i>
	Proteína de invasão	<i>ibeA</i>
NMEC	Proteína da membrana externa	<i>ompT</i>
	Proteína de invasão	<i>ibeA</i>

Hemaglutinina sensível à temperatura	<i>tsh</i>
Polissacarídeo capsular	<i>kpsMkI, kpsMTII</i>
Colicina	<i>cvaC</i>
Aumento da sobrevivência sérica	<i>iss</i>
Aerobactina	<i>iutA</i>
Receptor de sideróforo	<i>iroN</i>
Fímbrias	<i>fimH</i>
	<i>sfa, foc</i>

Referências: (BOISEN et al., 2020; BUGAREL et al., 2011; FARAJZADEH-SHEIKH et al., 2020; PERNA et al., 2020; MEZA-SEGURA et al., 2020; PAKBIN, BRÜCK E ROSSEN, 2021; SCHÜROFF et al., 2021; SAROWSKA et al., 2019; CUNHA et al., 2017; SAIDENBERG et al., 2022; CONCEIÇÃO et al., 2012).

***SPATE** - serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae; ***ShET** – Shigella enterotoxina; ***MICA** – Marcador de estresse celular

Fonte: Autor (2023).

3.1.2.1 *Escherichia coli* enteropatogênica – EPEC

EPEC geralmente está associada a surtos de diarreia em berçários, não sendo comum em crianças maiores e adultos. Tem a capacidade de colonizar o intestino, onde pode ocorrer a necrose de células epiteliais, devido à liberação de enterotoxina do autotransportador de serina protease (OCHOA et al. 2008) e adesão à superfície do enterócito e mudança morfológica das células, o que gera lesões nas microvilosidades, semelhantes às causadas por *E. coli* O157:H7, não havendo evidência de uma invasão dos tecidos (ROTHBAUM, R. A. J. et al., 1982; TAYLOR, C. J. A. et al., 1986).

Por definição, as EPEC não possuem genes para produzir a toxina Shiga (stx). Existem dois tipos de caracterização de cepas EPEC (típica e atípica). Cepas de *E. coli* que são classificadas como EPEC típicas, possuem genes *eae* e *bfpA*. A maioria dessas produzem o fenótipo de aderência localizada associado a produção de fímbria BFP. No caso das cepas de *E. coli* atípica, possui apenas o gene *eae* e podem exibir expressão de forma localizada, difusa ou adesão agregativa (SCALETSKY I.C.A. et al., 2010; SERAPIO-PALACIOS, 2020).

A diarreia resulta da perda das propriedades absorptivas das células infectadas é aquosa, com muco, mas sem sangue, náuseas, dores abdominais, vômitos, dores de cabeça, febre e arrepios. Os sintomas surgem 17 a 72 horas após ao consumo do alimento contaminado e desaparecem, normalmente, ao fim de 3 dias (ASAE, 2022).

3.1.2.2 *Escherichia coli* enterotoxigênica – ETEC

ETEC é frequentemente associado à diarreia do viajante, além de também causar diarreia infantil, necessitando de uma alta quantidade de bactérias para o desenvolvimento de sintomas. Este é um forte indicador de países com baixo desenvolvimento (BLACK, R.E., et

al., 1981; VON MENTZER et al. 2014). De acordo com os relatórios da Organização Mundial da Saúde, a ETEC causa anualmente mais de 157.000 casos humanos de diarreia que levam à morte (BUUCK et al. 2020). Os sintomas mais comuns são diarreia leve e cólicas abdominais. Os casos mais severos fazem lembrar a cólera com diarreia de alta secreção, que leva a um quadro de desidratação grave em crianças nos primeiros anos de vida (FLECHENSTEIN E KHULMANN, 2019).

Dentre os fatores de colonização, CFA/I, CFA/II e CFA/IV são os principais facilitadores para ETEC nas células epiteliais do intestino, além de estruturas proteicas fimbriais e não fimbriais, proteínas autotransportadoras e flagelos (HAZEN et al. 2017). Ochoa et al. (2008), demonstraram que ETEC afeta, com maior gravidade, pacientes com tipo sanguíneo A, devido à secreção adesina EtpA que é uma lectina/hemaglutinina específica desse grupo sanguíneo.

De acordo com Mirhoseini, Amani e Nazarian (2017), as enterotoxinas termoestáveis (STs) e termolábeis (LTs) podem ser expressas separadamente ou juntas, ativando a produção de nucleotídeos cíclicos, contribuindo para a perda líquida intestinal de água, sal e líquidos, causando diarreia secretora em humanos e animais.

3.1.2.3 *Escherichia coli* enteroinvasiva – EIEC

Esse patotipo, com maior frequência, infecta organismos de adultos e crianças com maior faixa etária, em países com baixos índices de desenvolvimento econômico. Infecções por EIEC, até o momento, foram relatadas apenas em humanos, indicando um grau de especificidade do hospedeiro muito raramente observado no gênero *Escherichia* (DENAMUR et al. 2021).

Possui alta semelhança à *Shigella* na sua atividade bioquímica, antigénica e patológica. O mecanismo de virulência deste sorotipo é por invasão na mucosa do cólon, onde uma vez alcançado os enterócitos intestinais, ela confunde o mecanismo de fagocitose do lisossomo do hospedeiro e pode invadir outros enterócitos. Multiplica-se e eventualmente pode causar úlcera no intestino (CROXEN E FINLAY, 2010).

Os sintomas surgem após o consumo de alimento e água contaminados, sendo que os mais comuns incluem diarreia profusa ou disenteria (as fezes geralmente são mucóides e sanguinolentas), arrepios, febre. Diferente de outros patotipos, EIEC é imóvel, lisina descarboxilase negativa e incapaz de fermentar lactose (VAN DEN BELD E REUBSAET 2012; VAN DEN BELD et al. 2019).

EIEC é um patógeno intracelular obrigatório sem fatores de adesão nem flagelos. Em função disso, esse patotipo fornece integridade à célula hospedeira, bloqueando a morte da mesma para manter seu nicho de replicação (BELOTSEKOVSKY e SANSONETTI, 2018). De acordo com Bona et al. (2019), quando alocadas no citoplasma da célula epitelial, essas bactérias suprimem a resposta imune do hospedeiro, usando efetores de proteínas para sobreviver dentro das células do cólon do intestino grosso.

3.1.2.4 *Escherichia coli* enteroagregativa – EAEC

Este patotipo de *E. coli*, diferencia-se dos demais por ter uma duração de sintomas que costumam ultrapassar 7 dias. Esse microrganismo é causador de diarreia aguda e persistente em adultos e crianças, apresentando fezes aquosas não formadas e febre baixa (OKEKE e NATARO, 2001).

EAEC é capaz de formar agregados bacterianos, biofilmes robustos que podem agregar-se inclusive em superfícies sintéticas de vidro e plástico, envoltas por estrutura polissacarídica que, por sua vez, são totalmente diferentes do mecanismo promovido por cepas de *E. coli* não patogênicas (OKEKE e NATARO, 2001). O mecanismo de patogenicidade se dá após adesão ao epitélio intestinal (enterócitos) via fímbrias agregativas de adesão, formação de biofilme e secreção de toxinas, inflamação da mucosa e danos citotóxicos (NATARO e KAPER, 1998; CROXEN et al. 2013; BOISEN et al. 2020).

Alguns fatores de virulência diferenciais incluem vesiculação de microvilosidades, aberturas de criptas aumentadas e aumento da extrusão de células epiteliais (HARRINGTON, DUDLEY E NATARO, 2006). Em registro de estudo realizado por Nataro, Steiner e Guerrant (1998), o patotipo causou encurtamento induzido nas vilosidades, acarretando em necrose hemorrágica superficial e resposta inflamatória leve, com edema e infiltração mononuclear da submucosa. Em uma ala de desnutrição do hospital da Cidade do México, foi registrada a análise de íleos de pacientes que morreram de diarreia persistente, onde danos à mucosa foram demonstrados (ESLAVA, C., et al. 1993).

3.1.2.5 *Escherichia coli* enterohemorrágica – EHEC

E. coli O157:H7 foi identificada como bactéria patogênica em 1982 quando foi associada com dois surtos de colite hemorrágica. Subseqüentes surtos foram relatados e posteriormente relacionados com carne picada mal cozinhada (RILEY et al. 1983).

A colonização em humanos ocorre no intestino grosso. A toxina Shiga liberada liga-se às células endoteliais que expressam globotriaosilceramida - Gb3, permitindo a absorção na corrente sanguínea e a disseminação da toxina para outros órgãos (PHILIPS et al. 2000; SANDVIG, 2001). Estudos realizados por Karch et al. (1999) ; Matsushiro et al. (1999) ; Wagner et al. (2002) e Tarr et al. (2005), demonstram que a administração de antibióticos como forma de tratamento de infecções causada por EHEC pode ser arriscado, piorando o caso clínico de pacientes e aumentando o risco de desenvolver síndrome hemolítico urêmica (SHU). Os antibióticos promovem a produção da toxina Shiga aumentando a replicação e a expressão dos genes stx.

Um fator importante que favorece a infecção desse patotipo é a resistência ácida, o que lhe permite resistir ao ambiente estomacal e adoecer o hospedeiro em baixas concentrações que variam de 10 a 100 unidades formadoras de colônia (TUTTLE et al. 1999).

Os sintomas mais comuns são colite hemorrágica caracterizada por uma diarreia sanguinolenta, fortes dores abdominais, vômitos e ausência de febre (MELTON-CELSA, 2014). Em casos mais graves pode ocorrer SHU e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) em crianças e idosos, respectivamente. Estas síndromas caracterizam-se por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, alterações da função renal, febre e anomalias do sistema nervoso central. A taxa de mortalidade associada é elevada.

Cerca de 5 a 10% dos indivíduos infectados com *E. coli* desenvolvem SHU, sendo este microrganismo o responsável por mais de 90% dos casos SHU em crianças. Dos sobreviventes a SHU, cerca de 5% tem necessidade de tratamentos de diálise ou de transplante renal e, dos restantes, 5 a 10% apresentam problemas neurológicos ou pancreáticos que diminuem significativamente a sua qualidade de vida (ASAE, 2022).

3.1.2.6 *Escherichia coli* de aderência difusa – DAEC

Mais recentemente identificada em crianças com diarreia, ainda não possui elucidações concretas sobre sua real função em relação às síndromes diarreicas. Apesar da indefinição sobre a produção de toxinas, alguns fatores de adesão têm sido identificados e relacionados por semelhança às identificadas em cepas responsáveis por infecções urinárias. As adesinas podem ser consideradas como fator de virulência para esse patotipo. A adesão resulta em alteração das microvilosidades das proteínas do citoesqueleto que devido ao aumento da permeabilidade dos enterócitos, contribui para a ocorrência de diarreia (KAPER, NATARO E MOBLEY, 2004).

Atualmente DAEC tem sido dividida em duas classes. A primeira inclui cepas que abrigam adesinas Afa/Dr (Afa/Dr DAEC) e estão associadas a infecções do trato urinário como pielonefrite, cistite e bacteriúria assintomática. A segunda classe inclui cepas d que expressam uma adesina envolvida na aderência difusa (AIDA-I), que é uma causa potencial de diarreia infantil.

Conforme Tieng et al. (2002), DAEC é capaz de induzir a expressão de marcador de estresse celular (MICA) por células epiteliais intestinais células, indicando que a infecção pode ser pró-inflamatória e este efeito pode ser precursor de doenças inflamatórias intestinais.

3.1.2.7 *Escherichia coli* de aderência difusa – AIEC

E. coli aderente invasora é associado à causa de colite ulcerativa e doença de Crohn (NADALIAN, et al. 2020), devido ao seu isolamento em pacientes portadores da mesma. Possui mecanismos de adesão e invasão a células epiteliais, conseguindo sobreviver e replicar-se dentro de macrófagos. De acordo com Darfeuille-Michaud (2004), supõe-se que a bactéria pode desencadear o início do processo inflamatório, em função da invasão das células do epitélio intestinal e, devido à sobrevivência nos macrófagos, pode promover um estímulo antigênico constante, inflamação crônica e o desenvolvimento de granulomas.

Em casos como relatado por Craven (2012) e Simpson (2006), estudos com cepas AIEC isoladas de cães com colite granulomatosa e modelos murinos com doença de Crohn ileal, demonstraram que quando as cepas desse patotipo de *E. coli* foram erradicadas, a doença entra em estado de remissão. Apesar das evidências encontradas na literatura atualizada, ainda não haver clareza e exatidão sobre o papel das cepas EIEC em relação às doenças de infecção intestinal (BRUDER E ESPÉLI, 2022).

3.1.2.8 *Escherichia coli* Uropatogênica – UPEC

Dentre todas as infecções não complicadas do trato urinário, a *E. coli* uropatogênica (UPEC) representa de 50 a 90%, tornando-se o organismo mais comum nesse tipo de infecções (RAKSHA, SRINIVASA E MACADEN, 2003; FOXMAN, 2014).

Os fatores de virulência da superfície celular bacteriana mais comumente incluem fímbrias que ajudam na adesão à superfície da célula hospedeira, invasão tecidual (importante na patogênese da UPEC causando ITUs), formação de biofilme, captação de ferro, fatores de resistência sérica, cápsulas, toxinas, flagelos, elementos de adesão e indução de citocinas. O

fator de virulência da superfície celular bacteriana também inclui flagelo, lipopolissacarídeo capsular e proteínas da membrana externa. Hemolisina e sideróforos são fatores de virulência secretados (JOHNSON, 1991; EMODY, KERENYI E NAGY, 2003). Esses fatores de virulência facilitam a colonização do trato urinário e persistência contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (VAGARALI et al., 2008).

Devido à organização genética, o gene CNF1, que confere fator necrosante citotóxico, é altamente característico de UPEC hemolítica, pois está sempre aparece ligado ao gene HlyA. No entanto, o gene HlyA é independente da presença de CNF1, tanto que outros patotipos carregam apenas o gene HlyA.

De acordo com Foxman & Brown (2003), as ITUs podem ser limitadas ao trato urinário inferior (cistite) ou envolver o trato renal (pielonefrite aguda). A maioria dos pacientes são mulheres e metade de todas as mulheres na idade de 32 anos já tiveram ITU pelo menos uma vez.

3.1.2.9 *Escherichia coli* causadora de meningite neonatal – NMEC

Essas Cepas podem sobreviver na corrente sanguínea e invadir meninges de bebês, causando meningite neonatal que é uma das infecções mais comuns que geram alta taxa de mortalidade neonatal entre 15 e 40%, sendo que 30% dos sobreviventes apresentam sequelas (GRIMWOOD et al. 2000). Devido às pesquisas com NMEC ainda serem recentes e haver heterogeneidade genotípica e fenotípica entre as cepas, há dificuldade de distingui-la das cepas comensais do mesmo microrganismo (PARSEK E SINGH, 2003).

Sugere-se que essas cepas bacterianas são transmitidas aos recém nascidos no período perinatal. Após a colonização, as NMEC passam do trato gastrointestinal para a corrente sanguínea e atravessam a barreira hematoencefálica para o sistema nervoso central. Esse tipo de infecções requer uma grande quantidade de células bacterianas e para isso, os genes virulentos são indispensáveis (CROXEN E FINLAY, 2010).

Fatores de virulência importantes de NMEC incluem o antígeno capsular K1, protegendo contra a fagocitose e responsável pela disseminação de bactérias, ibe (A, B e C) promovendo invasão nas células e posteriormente nos tecidos, proteína Iss protegendo contra a fagocitose - ação bactericida do soro, e o fator V estimulador de colônias (SCHIMIDT E HENSEL, 2004).

Wijetunge et al. (2015), com base nos resultados de genotipagem das cepas NMEC examinadas, descobriram que todos os isolados têm a capacidade de invadir células endoteliais

do cérebro humano, e mais de 70% deles carregavam os genes *kpsII*, *K1*, *neuC*, *iucC*, *sit*. As cepas NMEC examinadas demonstraram alta capacidade (79,2%) de formar biofilmes.

3.1.2.10 *Escherichia coli* causadora de septicemia – SEPEC

A sepse bacteriana ocorre quando bactérias entram na corrente sanguínea e infectam vários órgãos. O microrganismo isolado com mais frequência do sangue de pacientes é a *E. coli*. SPEEC é o patotipo de *E. coli* causador de sepse e apesar de não ter seus mecanismos bem elucidados, devido à semelhança entre genes com NMEC e UPEC, algumas especificidades já foram observadas pela literatura (MOKADY, GOPHNA E RON, 2005).

De acordo com estudo de Guirelli et al. (2019), as cepas SEPEC foram citotóxicas para células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), causando perda de junções intercelulares, alongamento e morte. Tibo et al. (2016), relataram aumento a permeabilidade da monocamada HUVEC, o fator citotóxico SEPEC purificado facilitou a translocação de bactérias através da monocamada (transcitose).

SEPEC aderiram às células Vero, formaram microcolônias, produziram uma matriz extracelular, invadiram células e provavelmente se replicaram dentro das células. A adesão e invasão de células Vero por cepas SEPEC podem ser fatores importantes envolvidos na sua patogenicidade, o que sugere uma das possíveis etapas da entrada de SEPEC nos vasos sanguíneos renais. A adesão ao tecido renal pode fornecer a entrada para a corrente sanguínea. Uma vez na corrente sanguínea, as cepas SEPEC devem ter composições genéticas favoráveis para sobreviver no sangue e, assim, induzir a sepse (ANANIAS E YANO, 2008).

Conceição et al. (2012), sugeriram que a adesão do SEPEC às superfícies celulares ocorre com o envolvimento de mecanismos não-fimH. Além disso, todos os isolados de SEPEC aderiram e invadiram células na presença de D-manose (monossacarídeo hexose simples utilizado contra infecções urinárias).

3.1.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM *Escherichia coli*

Antibióticos são medicamentos sugeridos por profissionais da saúde para tratar infecções causadas por bactérias. Assim como outros fármacos, essa classe possui especificidades e limitações quanto à sua administração, de acordo com o agente infeccioso, o quadro clínico do paciente e demais fatores intrínsecos. Por esse motivo, são comercializados apenas mediante receita médica em vários países, como é o caso do Brasil.

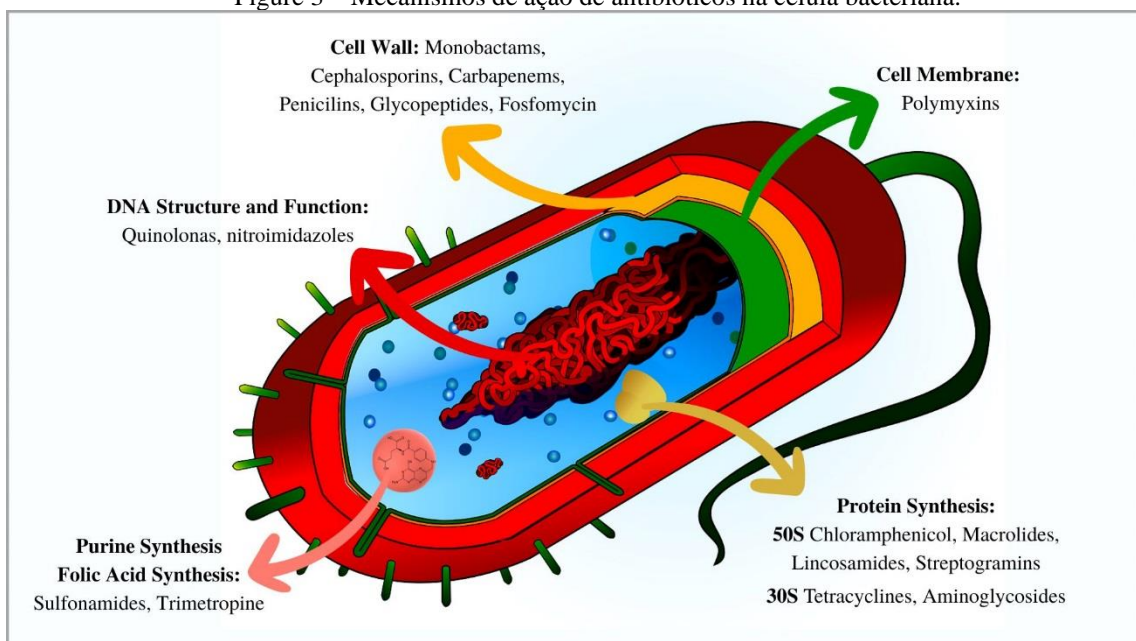
Apesar de não haver um consenso sobre como a resistência a antibióticos surge em microrganismos após sua exposição a antibióticos, Baquero (2001), sugere que a exposição a concentrações muito baixas de antibióticos pode selecionar mutantes de baixo nível de resistência, que servem como propulsor para as cepas com alto nível de resistência.

Estudos clínicos indicaram que o tratamento tardio com antibióticos inadequados para bacteremia multirresistente exerceria uma influência negativa na recuperação do paciente (MELZER E PETERSEN, 2007; ESPARCIA et al. 2014). De acordo com Cantón et al. (2012) o uso de um antibiótico em uma concentração capaz de prevenir a geração de mutantes, acima da concentração inibitória mínima, restringiria o surgimento de cepas altamente resistentes em meio aos microrganismos suscetíveis.

Outra dinâmica crescente de bactérias resistentes é a distribuição de antibióticos nos ecossistemas, pois a ingestão humana de produtos alimentares de origem animal e vegetal carrega um forte potencial para a disseminação de genes de resistência a antibióticos através do consumo de resíduos de antibióticos e bactérias resistentes a antibióticos. Além disso, o uso contínuo de antibióticos no gado e em outros empreendimentos agrícolas pode em breve tornar esses medicamentos ineficazes para uso terapêutico humano (HARRISON E SEVEC, 1998).

A figura 3, representa como os principais fármacos utilizados para o tratamento de infecções causadas por *E. coli*, age na célula, em diferentes sítios de controle, visando um comportamento bacteriostático ou bactericida.

Figure 3 – Mecanismos de ação de antibióticos na célula bacteriana.



Fonte: Autor (2023).

De acordo com Hawkey (1998), Mihăescu, Chifiriuc e Dutu (2007), os genes que codificam a resistência a antibióticos já existem no ambiente natural de seleção das bactérias antes mesmo da inserção de antibióticos como tratamento. Desse modo, a resistência bacteriana pode ser descoberta logo após os primeiros anos de uso de antibióticos como prática terapêutica. O surgimento da resistência aos antibióticos é inerente à sua introdução em maiores escalas (TODAR, 2008).

Conforme Coculescu (2009), até mesmo as bactérias mais resistentes podem ser combatidas com o uso de antibióticos. Porém, as concentrações exigidas para que isso aconteça podem causar um efeito danoso para a saúde humana. Por isso, é importante que as concentrações de fármacos como tratamento para inibição dos microrganismos seja a menor possível.

3.1.3.1 Resistência natural

Esse tipo de resistência pode ser intrínseca ou induzida. No caso da primeira, esse fator já está associado universalmente à expressão em uma determinada espécie, independente de exposição prévia ou transferência de genes. A permeabilidade reduzida da membrana e atividade natural das bombas de efluxo são exemplos comuns envolvidos nessa modalidade que confere menor susceptibilidade de bacilos Gram-negativos a Macrólitos, Lincosamida e Estreptogramina B.

Na segunda, os genes já estão presentes nas bactérias, mas só serão expressos quando expostos aos antibióticos. Nesse caso, também existem bombas de efluxo naturais, associadas a resistência para uma grande variedade de drogas.

3.1.3.2 Resistência adquirida

A resistência adquirida ocorre por transferência de genes, de forma horizontal, podendo ser permanente ou temporária. Existem mutações possíveis nas células bacterianas, que conferem essa habilidade aos microrganismos, podendo ocorrer deleções de bases na estrutura de um gene, substituições de uma base nitrogenada por outra, adição de nucleotídeos suplementares na estrutura de um gene, inversão de códons na estrutura gênica e a mutação por duplicação ou deficiência. As mutações que configuram resistência, ocorrem em genes específicos, sendo que codificam: alvos de drogas, transportadores de drogas, reguladores que controlam os transportadores de drogas e enzimas modificadoras de antibióticos (MARTINEZ, 2014).

O mecanismo gênico das bactérias possui o nucleóide, que corresponde ao cromossomo e elementos gênicos extracromossômicos, que são os plasmídeos, transposons, íntegrans e outros. O primeiro chega a representar até 20% dos casos de resistência adquirida, enquanto o segundo representa aproximadamente 80% destes (HAWKEY, 1998). Por esses fatores, é possível compreender a facilidade de *E. coli* em desenvolver a resistência com maior facilidade do que grande parte das outras bactérias.

A transferência horizontal de genes desempenha um papel fundamental na evolução das bactérias e na disseminação de genes de resistência antimicrobiana. Envolve a aquisição pela célula bacteriana de DNA estranho, fenômeno que pode ocorrer por meio de três mecanismos: transformação (captura de DNA livre), transdução (via DNA de bacteriófago) ou conjugação (WOZNIAK E WALDOR, 2010).

Apesar de existir uma extensa gama de medicamentos para tratamentos por infecções bacterianas, existe um problema que vem evoluindo em relação à capacidade destes microrganismos em reagir aos fatores invasivos à célula. O resultado da resistência adquirida são alguns mecanismos que variam em sua forma de ação, conforme o exposto na tabela 2.

Tabela 2 – Mecanismos de ação de resistência bacteriana e suas drogas alvo.

Ação	Mecanismo	Drogas alvo
Destruição ou inativação enzimática da droga	Produção de enzimas, de forma natural ou induzida, para inativar o efeito do princípio ativo da droga	B-Lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos e fenicóis
Bloqueio do sítio alvo	Produção de enzimas ou presença de estruturas celulares bacterianas que impedem a ligação do antibiótico ao sítio alvo	Tetraciclina, e Penicilinas
Alteração no sítio alvo	Constituição de uma nova molécula substitutiva ao alvo original ou alteração na molécula original	Quinolonas, Eritromicina, Meticilina, Vancomicina e Clindamicina
Efluxo e ejeção do antibiótico	Bombas que expõem as drogas antes que atinjam a concentração necessária para matar a bactéria	Macrolídeos, fluoroquinolonas e Tetraciclina
Redução na permeabilidade da membrana	Redução ou exclusão da abertura das porinas, onde o antibiótico se torna incapaz de entrar no espaço periplasmático e agir	Cefotaxima, Cefepime e Carbapenênicos
Formação de biofilme	Adesão das células em determinada Superfície e formação de multicamadas para síntese de matriz extracelular de proteção	Antimicrobianos em geral

Referências: (Li et al., 2015; RUPPÉ et al., 2015; NAAS, 2016).

Fonte: Autor (2023).

A modificação enzimática ou destruição do antibiótico geralmente é promovida por quatro classes de enzimas modificadoras de antibióticos (hidrolases, transferases de grupo, enzimas redox e lisases). As hidrolases, como as amidases que clivam o anel β -lactâmico, quebram ligações químicas susceptíveis à hidrólise, como ésteres e amidas, que muitas vezes são essenciais para a atividade biológica dos antibióticos. Essas enzimas solúveis em água podem ser facilmente excretadas de bactérias como uma contramedida profilática, interceptando moléculas de antibióticos antes do contato com as bactérias (WORTHINGTON E MELANDER, 2013).

O grupo transferases representam uma classe de enzimas bacterianas que impõem modificações covalentes em antibióticos para inibir a ligação do antibiótico ao alvo (DISNEY, 2012). A resistência aos aminoglicosídeos é frequentemente conferida com base na inativação antibiótica induzida por transferases (SHAW et al. 1993). As enzimas redox não tem seu mecanismo totalmente elucidado, mas a resistência à tetraciclina conferida pela enzima TetX, conhecida e citada na literatura, é promovida por essa classe (YANG et al. 2004). As lisases clivam as ligações carbono-carbono, carbono-oxigênio, carbono-nitrogênio e carbono-enxofre por um mecanismo independente da clivagem hidrolítica ou oxidativa. O Vgb, responsável pela resistência à estreptogramina, é exemplo dessa classe enzimática (MUKHTAR et al. 2001).

Os alvos dos antibióticos podem ser reprogramados ou camuflados, como por proteção assistida por fator do alvo da droga. Um exemplo é a proteína de ligação à penicilina 2 (PBP2), que confere uma ligação de baixa afinidade com antibióticos β -lactâmicos, permitindo a continuidade da biossíntese da parede celular bacteriana sem impedimentos. A modificação do alvo do antibiótico (por exemplo, metilação do rRNA) pode servir para reduzir a afinidade com custos limitados para a adequação (WILSON, 2014).

As bombas de efluxo bacteriano funcionam como um mecanismo de proteção da célula bacteriana para manter a homeostase e a comunicação celular, bombeando ativamente solutos, metabólitos, moléculas de detecção de quorum e toxinas, especificamente antimicrobianas compostos (LI E NIKAIDO, 2009; COLLU E CASCELLA, 2013). Existem cinco famílias de bombas de efluxo de drogas bacterianas. No entanto, a resistência a múltiplas drogas pode ser adquirida através da regulação em uma única bomba de efluxo, tornando este um sistema altamente eficaz (HIGGINS, 2007). Li et al. (2004), descobriu que 94% dos compostos antimicrobianos testados em seu experimento, eram susceptíveis ao efluxo pelo sistema endógeno de efluxo de múltiplas drogas em *E. coli*. A falta de especificidade da droga facilita o acoplamento sinérgico da regulação do efluxo com outros mecanismos de resistência,

particularmente mudanças na permeabilidade da membrana externa poderá afetar negativamente as drogas em desenvolvimento.

Assim como na virulência, a formação de biofilme é uma parte essencial na resistência a antibióticos. Uma vez que as células começam a produzir adesões e alguma matriz polimérica extracelular, as células são consideradas irreversivelmente aderidas à superfície. Durante a fase de maturação, as células aderidas começam a proliferar e produzem uma matriz polissacarídica extracelular, como proteção da comunidade bacteriana diminuindo a suscetibilidade a antibióticos, entre outros fatores (KHARDORI E YASSIEN, 1995). Além disso, a comunidade bacteriana pode adquirir ainda mais resistência por transferência horizontal de genes, devido à diversidade de subespécies da mesma bactéria, bem como de diferentes espécies bacterianas (HOIBY et al., 2010).

Interromper a adesão bacteriana antes da formação do glicocálice pode ser uma estratégia antibiótica com eficácia análoga às terapias destinadas a matar bactérias planctônicas (CAVALLARO, TAHERI E VASILEV, 2014). É importante ressaltar que, uma vez estabelecido um biofilme aderente à superfície, as terapias projetadas para matar bactérias planctônicas são ineficazes. Os biofilmes já são até 1.000 vezes mais resistentes a antibióticos quando comparados com suas contrapartes planctônicas flutuantes. Além disso, essa comunidade coordenada, protegida por uma matriz viscosa chamada glicocálice, também facilita a disseminação da resistência a antibióticos (STEWART E COSTERTON et al., 2001; STOODLEY et al., 2002).

O aumento da resistência aos antimicrobianos tem ocorrido, em grande parte, devido ao seu uso intensivo e, em alguns casos, imprudente. O contato de microrganismos entre si com resíduos de antibióticos e material genético (ARG) em estações de tratamento de esgoto e aplicações de efluentes agrícolas nos campos, representam um grande reservatório e ambiente de disseminação para bactérias ainda mais resistentes e adaptadas. Esses fatores adicionais sobre ambientes de disseminação de resistência e virulência podem ser amplamente encontrados na literatura citada (BERENDONK et al. 2015; PETRIE E BARDEN, 2015; WHO, 2014).

3.1.4 RELAÇÃO ENTRE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA BACTERIANA

Embora a virulência se desenvolva desde o início da colonização do organismo hospedeiro e a resistência desde o surgimento dos antibióticos, estas não são características independentes. Algumas relações tem sido descritas em manuscritos científicos, onde a

aquisição de resistência a determinados antibióticos pode ser associada à diminuição dos níveis de virulência do microrganismo. Porém, também existem evidências onde um mecanismo é potencializador do outro (BECEIRO, TOMÁS E BOU, 2013).

A depender dos mecanismos específicos de cada patótipo, nicho ecológico, condições ambientais e do sistema imunológico do hospedeiro, podem haver maior ou menor gravidade nos sintomas gerados a partir da infecção. Conforme Cepas e Soto (2020), foram observadas três possibilidades de combinação de fatores relacionadas, sendo o primeiro relativo ao aumento de resistência e um consequente aumento de virulência; o segundo prevê um aumento da resistência e diminuição da virulência e o terceiro considera um possível aumento de resistência, sem alterar as características virulentas do microrganismo.

Além dos efeitos que a aquisição de resistência tem sobre a virulência, pode ocorrer uma seleção de ambas as características, adaptando esses fatores genéticos para garantir uma condição mais favorável ao patógeno. Isso pode ocorrer através de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e elementos integrativos e conjugativos que são transferidos entre cepas bacterianas pertencentes à mesma espécie ou a espécies diferentes, conferindo persistência que atribui adaptação a diferentes ambientes e nichos (JOHNSON E NOLAN, 2009).

Os principais estudos que fazem referência à relação entre genes de resistência e virulência em *E. coli*, tratam do patótipo UPEC, devido a estas causarem infecções não complicadas do trato urinário (ITUs) que, em todo o mundo, são as infecções mais comuns em humanos. Conforme Shah et al. (2019), uma associação significativa foi encontrada entre os fatores de virulência da UPEC e a resistência antimicrobiana da UPEC. O surgimento de microorganismos resistentes a medicamentos entre as cepas de UPEC eleva os riscos à saúde global (TABASI et al. 2015).

Os MGEs também podem codificar genes de virulência, onde podem ocorrer interações entre resistência a antibióticos e virulência (Bunduki et al., 2021). Estudo desenvolvido por Firoozeh et al. (2022), demonstra que a aquisição de genes de resistência leva à perda de genes de virulência e, em alguns outros casos, o aumento da resistência a antibióticos aumenta a virulência das cepas de UPEC.

De acordo com Villa et al. (2010), é possível que os determinantes genéticos de virulência, se localizados na mesma plataforma genética que os genes de resistência antimicrobiana (plasmídeos, transposons, integrons), possam ser comobilizados sob pressão seletiva antimicrobiana. Além disso, as cepas virulentas estáveis podem ser perpetuadas se adquirirem determinantes de resistência (DA SILVA E MENDONÇA, 2012).

Os estudos que abordam essa relação ainda estão em desenvolvimento e fase de entendimento dessas relações. Considerando as particularidades de cada microrganismo e cada patotipo, para uma informação mais concreta sobre a interação de resistência e virulência bacteriana, ainda serão necessárias muitas análises moleculares e estatísticas que possibilitem uma correlação ou não entre os fatores (YAZDANPOUR, TADJROBEHKAR E SHAHKHAH, 2020; CEPAS E SOTO, 2020; FIROOZEH et al., 2022). A depender do tipo de droga, características ambientais e outros fatores genéticos envolvidos, será um grande desafio para os pesquisadores.

3.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Escherichia coli é um microrganismo amplamente estudado, que tem evoluído devido às pressões ambientais às quais é submetido constantemente. Os mecanismos para infectar hospedeiros e resistir aos tratamentos utilizados para o seu combate, bem como a velocidade e a versatilidade para se adaptar em ambientes de difícil sobrevivência, tem preocupado as entidades mundiais, tanto que os próprios relatórios da organização mundial da saúde enfatizam, em número, os riscos associados a esse patógeno.

No Brasil, apesar de existirem relatórios elaborados pelos órgãos responsáveis pela saúde pública, os dados abertos ainda são limitados e com poucas informações complementares sobre os isolados. Considerando o número de pessoas que morrem antes de ter acesso a tratamento, somado à pouca cobertura de identificação dos patógenos, é possível constatar que existe uma subnotificação de casos e da disseminação dos mais diversos patotipos de *E. coli* que causam doenças no País.

A resistência e a virulência dessa bactéria possuem um amplo espectro de mutações e adaptações que, apesar da grande quantidade de dados científicos, ainda necessitam de mais estudo para maior elucidação, inclusive sobre a relação existente entre esses dois fatores que, como abordado nesse manuscrito, em alguns estudos demonstra sinergia e em outros antagonismo. Apesar do longo período em que essa bactéria vem sendo estudada pela ciência, as descobertas parecem

Ademais, *E. coli* cresce no cenário mundial como um poluente emergente com alto potencial de disseminação e agravamento em sintomas, podendo aumentar o número de óbitos em suas infecções.

REFERÊNCIAS

- ALEGBELEYE, Oluwadara O.; SANT'ANA, Anderson S. Pathogen subtyping tools for risk assessment and management of produce-borne outbreaks. **Current Opinion in Food Science**, 2020, 32: 83-89.
- ALEGBELEYE, Oluwadara Oluwaseun; SINGLETON, Ian; SANT'ANA, Anderson S. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. **Food microbiology**, 2018, 73: 177-208.
- ANANIAS, M.; YANO, T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2008, 41: 877-883.
- ASAE, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. *Escherichia coli*. 2022. Disponível em: https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos_biologicos/escherichia-coli.aspx. Acesso em: 10 dez. 2022.
- BAQUERO, Fernando. Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. **Drug Resistance Updates**, 2001, 4.2: 93-105.
- BECEIRO, Alejandro; TOMÁS, María; BOU, Germán. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world?. **Clinical microbiology reviews**, 2013, 26.2: 185-230.
- BÉLANGER, Louise et al. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 1-10, 2011.
- BELOTSERKOVSKY, Iliia; SANSONETTI, Philippe J. Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Escherichia coli, a Versatile Pathogen**, p. 1-26, 2018.
- BERENDONK, Thomas U., et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature reviews microbiology**, 2015, 13.5: 310-317.
- BLACK, Robert E, et al. Incidence and severity of rotavirus and *Escherichia coli* diarrhoea in rural Bangladesh: implications for vaccine development. **The Lancet**, 1981, 317.8212: 141-143.
- BOISEN, Nadia et al. Redefining enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): Genomic characterization of epidemiological EAEC strains. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 9, p. e0008613, 2020.
- BRASIL, Ministerio da Saude. **Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU)**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/shu#:~:text=%C3%89%20uma%20doen%C3%A7a%20grave%2C%20caracterizada,epis%C3%B3dios%20de%20diarreia%20com%20sangue..> Acesso em: 14 dez. 2022.
- BRUDER, Emma; ESPÉLI, Olivier. *Escherichia coli* bacteria associated with Crohn's disease persist within phagolysosomes. **Current Opinion in Microbiology**, 2022, 70: 102206.

BUGAREL, Marie, et al. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. **BMC microbiology**, 2011, 11.1: 1-10.

BUUCK, S., et al. Epidemiology of Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in Minnesota, 2016–2017. **Epidemiology & Infection**, 2020, 148.

CAVALLARO, Alex; TAHERI, Shima; VASILEV, Krasimir. Responsive and “smart” antibacterial surfaces: Common approaches and new developments. **Biointerphases**, 2014, 9.2: 029005.

CEPAS, Virginio; SOTO, Sara M. Relationship between virulence and resistance among gram-negative bacteria. **Antibiotics**, 2020, 9.10: 719.

COCULESCU, Bogdan-Ioan. Antimicrobial resistance induced by genetic changes. **Journal of medicine and life**, 2009, 2.2: 114.

COLLU, Francesca; CASCELLA, Michele. Multidrug resistance and efflux pumps: insights from molecular dynamics simulations. **Current topics in medicinal chemistry**, 2013, 13.24: 3165-3183.

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

CRAVEN, Melanie, et al. Inflammation drives dysbiosis and bacterial invasion in murine models of ileal Crohn’s disease. **PloS one**, 2012, 7.7: e41594.

CROXEN, Matthew A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

CROXEN, Matthew A.; FINLAY, B. Brett. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, 2010, 8.1: 26-38.

CUNHA, Marcos Paulo Vieira, et al. Pandemic extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil. **PLoS One**, 2017, 12.6: e0178970.

DA SILVA, Gabriela J.; MENDONÇA, Nuno. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. **Virulence**, 2012, 3.1: 18-28.

DARFEUILLE-MICHAUD, Arlette et al. Alta prevalência de *Escherichia coli* aderente-invasiva associada à mucosa ileal na doença de Crohn. **Gastroenterologia**, v. 127, n. 2, pág. 412-421, 2004.

DENAMUR, Erick, et al. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, 2021, 19.1: 37-54.

DISNEY, Matthew D. Studying Modification of Aminoglycoside Antibiotics by Resistance-Causing Enzymes via Microarray. *Carbohydrate Microarrays: Methods and Protocols*, 2012, 303-320.

EMODY, L.; KERENYI, Monika; NAGY, Gabor. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. **International journal of antimicrobial agents**, 2003, 22: 29-33.

ESLAVA, C., et al. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. In: 93rd **General Meeting of the American Society for Microbiology**. 1993. p. 44.

ESPARCIA, Ana, et al. Influence of inadequate antimicrobial therapy on prognosis in elderly patients with severe urinary tract infections. **European Journal of Internal Medicine**, 2014, 25.6: 523-527.

FAO. **The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016- 2020**. 2016 (<http://www.fao.org/3/a-i5996e.pdf>, accessed 08/04/2021)

FARAJZADEH-SHEIKH, Ahmad, et al. Distribution of genes encoding virulence factors and the genetic diversity of enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) isolates from patients with diarrhea in Ahvaz, Iran. **Infection and drug resistance**, 2020, 119-127.

FIROOZEH, Farzaneh, et al. Virulence factors, antimicrobial resistance and the relationship between these characteristics in uropathogenic *Escherichia coli*. **Gene Reports**, 2022, 101622.

FLECKENSTEIN, James M.; KUHLMANN, F. Matthew. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. **Current infectious disease reports**, v. 21, n. 3, p. 1-9, 2019.

FOXMAN, Betsy. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. **Infectious Disease Clinics**, 2014, 28.1: 1-13.

GRIMWOOD, Keith et al. Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. **Archives of disease in childhood**, v. 83, n. 2, p. 111-116, 2000.

GUIRELLI, Pâmela Mendonça, et al. **Células endoteliais humanas (HUVEC) infectadas por *Toxoplasma gondii* modulam funções biológicas de células trofoblásticas extravilosas humanas (HTR-8/SVneo)**. 2019. Tes(Doutorado em em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/24818/3/C%3a9lulasEndoteliaisHumanas.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2023

HARRINGTON, Susan M.; DUDLEY, Edward G.; NATARO, James P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS microbiology letters**, 2006, 254.1: 12-18.

HARRISON, John W.; SVEC, Timothy A. The beginning of the end of the antibiotic era? Part I. The problem: abuse of the " miracle drugs". **Quintessence international**, 1998, 29.3.

HAWKEY, Peter M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **Bmj**, 1998, 317.7159: 657-660.

HAZEN, Tracy H. et al. Comparative genomics and transcriptomics of *Escherichia coli* isolates carrying virulence factors of both enteropathogenic and enterotoxigenic *E. coli*. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-17, 2017.

HIGGINS, Christopher F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. **Nature**, 2007, 446.7137: 749-757.

JOHNSON, James R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical microbiology reviews**, 1991, 4.1: 80-128.

JOHNSON, Timothy J.; NOLAN, Lisa K. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2009, 73.4: 750-774.

NATARO, James P., et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric infectious disease journal**, 1987, 6.9: 829-831.

KAPER, James B.; NATARO, James P.; MOBLEY, Harry LT. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**, 2004, 2.2: 123-140.

KARCH, H., et al. Shiga toxins even when different are encoded at identical positions in the genomes of related temperate bacteriophages. **Molecular and General Genetics MGG**, 1999, 262.4: 600-607.

KHARDORI, N.; YASSIEN, M. Biofilms in device-related infections. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, 1995, 15.3: 141-147.

LI, Xian-Zhi; NIKAIDO, Hiroshi. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. **Drugs**, 2009, 69: 1555-1623.

LI, Xian-Zhi; PLÉSIAT, Patrick; NIKAIDO, Hiroshi. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 2, p. 337-418, 2015.

LI, Xiaoming, et al. Multicopy suppressors for novel antibacterial compounds reveal targets and drug efflux susceptibility. **Chemistry & biology**, 2004, 11.10: 1423-1430.

MARTINEZ, Jose L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. **Drug Discovery Today: Technologies**, 2014, 11: 33-39.

MATSUSHIRO, Aizo, et al. Induction of prophages of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 with norfloxacin. **Journal of bacteriology**, 1999, 181.7: 2257-2260.

MELTON-CELSA, Angela R. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. **Microbiology spectrum**, 2014, 2.4: 2.4. 06.

MELZER, Mark; PETERSEN, Irene. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. **Journal of Infection**, 2007, 55.3: 254-259.

MESSAILI, Chahinez; MESSAI, Yamina; BAKOUR, Rabah. Virulence gene profiles, antimicrobial resistance and phylogenetic groups of fecal *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens in Algeria. **Veterinaria Italiana**, v. 55, n. 1, p. 35-46, 2019.

MEZA-SEGURA, Mario, et al. New insights into DAEC and EAEC pathogenesis and phylogeny. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2020, 10: 572951.

MIHĂESCU, Grigore; CHIFIRIUC, Carmen; DIȚU, Lia Mara. Antibiotice și substanțe chimioterapeutice antimicrobiene. **Editura Academiei Române**, 2007.

MIRHOSEINI, Ali; AMANI, Jafar; NAZARIAN, Shahram. Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 162-169, 2018.

MOKADY, Daphna; GOPHNA, Uri; RON, Eliora Z. Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, 2005, 43.1: 66-73.

MOMTAZ, Hassan, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, 2013, 12: 1-12.

MUKHTAR, Tariq A., et al. Vgb from *Staphylococcus aureus* inactivates streptogramin B antibiotics by an elimination mechanism not hydrolysis. **Biochemistry**, 2001, 40.30: 8877-8886.

NAAS, Thierry; DORTET, Laurent; I IORGA, Bogdan. Structural and functional aspects of class A carbapenemases. **Current drug targets**, v. 17, n. 9, p. 1006-1028, 2016.

NADALIAN, Banafsheh, et al. Prevalence of the pathobiont adherent-invasive *Escherichia coli* and inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. **Journal of gastroenterology and hepatology**, 2021, 36.4: 852-863.

NATARO, James P.; STEINER, Theodore; GUERRANT, Richard L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 2, p. 251, 1998.

OCHOA, Theresa J., et al. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2008, 102.9: 852-856.

OKEKE, Iruka N.; NATARO, James P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **The Lancet infectious diseases**, 2001, 1.5: 304-313.

PAKBIN, Babak; BRÜCK, Wolfram M.; ROSSEN, John WA. Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: A review. **International journal of molecular sciences**, 2021, 22.18: 9922.

PARSEK, Matthew R.; SINGH, Pradeep K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 677-701, 2003.

PERNA, Angelica, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC): cause or consequence of inflammation, dysbiosis, and rupture of cellular joints in patients with IBD?. **Journal of cellular physiology**, 2020, 235.6: 5041-5049.

PETRIE, B.; BARDEN, R. Kasprzyk/Hordern B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understanding areas and recommendations for future monitoring. **Water research**, 2015, 72: 3-27.

PHILLIPS, A. D., et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. **Gut**, 2000, 47.3: 377-381.

RAKSHA, R.; SRINIVASA, H.; MACADEN, R. S. Occurrence and characterisation of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract infections. **Indian journal of medical microbiology**, 2003, 21.2: 102-107.

RILEY, Lee W., et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England journal of medicine**, 1983, 308.12: 681-685.

ROTHBAUM, Robert, et al. A clinicopathologic study of enterocyte adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. **Gastroenterology**, 1982, 83.2: 441-454.

RUPPÉ, Étienne; WOERTHER, Paul-Louis; BARBIER, François. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of intensive care**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2015.

SAIDENBERG, Andre Becker S., et al. Genomic analysis of the zoonotic ST73 lineage containing avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC). **Veterinary Microbiology**, 2022, 267: 109372.

SANDVIG, K. Shiga toxins. **Toxicon**, 2001, 39.11: 1629-1635.

SAROWSKA, Jolanta, et al. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. **Gut pathogens**, 2019, 11: 1-16.

SCALETSKY, Isabel CA, et al. Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. **Journal of clinical microbiology**, 2010, 48.1: 302-306.

SCHMIDT, Herbert; HENSEL, Michael. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clinical microbiology reviews**, 2004, 17.1: 14-56.

SCHÜROFF, Paulo A., et al. The aggregate-forming pili (AFP) mediates the aggregative adherence of a hybrid-pathogenic *Escherichia coli* (UPEC/EAEC) isolated from a urinary tract infection. **Virulence**, 2021, 12.1: 3073-3093.

SERAPIO-PALACIOS, Antonio; FINLAY, Barton Brett. Dynamics of expression, secretion and translocation of type III effectors during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Current opinion in microbiology**, 2020, 54: 67-76.

SHAH, Chhaya, et al. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. **BMC microbiology**, 2019, 19: 1-6.

SHAW, K. J., et al. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. **Microbiological reviews**, 1993, 57.1: 138-163.

SIMPSON, Kenneth W., et al. Adherent and invasive *Escherichia coli* is associated with granulomatous colitis in boxer dogs. **Infection and immunity**, 2006, 74.8: 4778-4792.

STOODLEY, Paul, et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**, 2002, 56.1: 187-209.

TABASI, Mohsen, et al. Phenotypic assays to determine virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolates and their correlation with antibiotic resistance pattern. **Osong public health and research perspectives**, 2015, 6.4: 261-268.

TARR, Phillip I.; GORDON, Carrie A.; CHANDLER, Wayne L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. **The lancet**, 2005, 365.9464: 1073-1086.

TAYLOR, C. J., et al. Ultrastructural and biochemical changes in human jejunal mucosa associated with enteropathogenic *Escherichia coli* (O111) infection. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, 1986, 5.1: 70-73.

TIBO, Luiz Henrique Soares, et al. Cytotoxic factor secreted by *Escherichia coli* associated with sepsis facilitates transcytosis through human umbilical vein endothelial cell monolayers. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 2016, 20: 298-302.

TIENG, Vannary, et al. Binding of *Escherichia coli* adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2002, 99.5: 2977-2982.

TODAR, Kenneth. **Bacterial resistance to antibiotics** (page 3). Todar's online textbook of bacteriology, p. 4, 2011.

TRABULSI, Luiz R.; KELLER, Rogéria; GOMES, Tânia A. Tardelli. 10.321/eid0805. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging infectious diseases**, 2002, 8.5: 508.

TUTTLE, J., et al. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157 [ratio] H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. **Epidemiology & Infection**, 1999, 122.2: 185-192.

ULSHEN, Martin H.; ROLLO, John L. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man—another mechanism. **New England Journal of Medicine**, 1980, 302.2: 99-101.

VAGARALI, M. A., et al. Haemagglutination and siderophore production as the urovirulence markers of uropathogenic *Escherichia coli*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, 2008, 26.1: 68-70.

VAN DEN BELD, M. J. C.; REUBSAET, F. A. G. Differentiation between Shigella, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 6, p. 899-904, 2012.

VAN DEN BELD, Maaïke JC et al. Incidence, clinical implications and impact on public health of infections with Shigella spp. and entero-invasive *Escherichia coli* (EIEC): Results of a multicenter cross-sectional study in the Netherlands during 2016–2017. **BMC infectious diseases**, v. 19, p. 1-12, 2019.

VILLA, Laura, et al. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, 2010, 65.12: 2518-2529.

VON MENTZER, Astrid, et al. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. **Nature genetics**, 2014, 46.12: 1321-1326.

WAGNER, Patrick L., et al. Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, 2002, 44.4: 957-970.

WHO, World Health Organization. *E. coli*. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>. Acesso em: 05 dez. 2022.

WIJETUNGE, Dona Saumya S., et al. Characterizing the pathotype of neonatal meningitis causing *Escherichia coli* (NMEC). **BMC microbiology**, 2015, 15.1: 1-15.

WILSON, Daniel N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, 2014, 12.1: 35-48.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2021**. 2021.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION, et al. **Evaluation of certain veterinary drug residues in food: seventy-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. WHO technical report series, 2014, 988.

WORTHINGTON, Roberta J.; MELANDER, Christian. Overcoming resistance to β -lactam antibiotics. **The Journal of organic chemistry**, 2013, 78.9: 4207-4213.

WOZNIAK, Rachel AF; WALDOR, Matthew K. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. **Nature Reviews Microbiology**, 2010, 8.8: 552-563.

WU, Hsing-Ju; WANG, Andrew HJ; JENNINGS, Michael P. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. **Current opinion in chemical biology**, 2008, 12.1: 93-101.

YANG, Wangrong, et al. TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. **Journal of Biological Chemistry**, 2004, 279.50: 52346-52352.

YAZDANPOUR, Zahra; TADJROBEHKAR, Omid; SHAHKHAH, Motahareh. Significant association between genes encoding virulence factors with antibiotic resistance and phylogenetic groups in community acquired uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **BMC microbiology**, 2020, 20.1: 1-9.

4 CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO 2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Escherichia coli* E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA BACTERIANA EM MICROBACIAS COM DIFERENTES USOS E OCUPAÇÃO DO SOLO

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Escherichia coli* E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA BACTERIANA EM MICROBACIAS COM DIFERENTES USOS E OCUPAÇÃO DO SOLO

RESUMO

Escherichia coli é um microrganismo versátil, que está presente nos mais diversos ambientes. Nos últimos anos tem chamado atenção da ciência pelo seu alto poder de mutação, adquirindo resistência e driblando os mecanismos de ação dos antimicrobianos. Apesar da existência de uma ampla quantidade de manuscritos tratando da resistência antimicrobiana, não há um consenso sobre quais são as principais fontes que permitem que esse microrganismo consiga se disseminar rapidamente e causar frequentes infecções e surtos sintomáticos. O objetivo dessa pesquisa foi analisar a qualidade microbiológica da água em microbacias com diferentes características de uso e ocupação do solo, visando identificar se há resistência nas cepas de *E. coli* isoladas e quais são as suas possíveis origens. Para tal, foram realizadas três campanhas de coletas, das quais esses microrganismos foram isolados e identificados por PCR, passando posteriormente por testes de susceptibilidade com nove antibacterianos amplamente utilizados para tratar infecções causadas por essa espécie bacteriana. Observou-se que a microbacia receptora de efluentes sanitários do município apresentou maior contaminação de cepas resistentes aos antibióticos testados e que estas foram persistentes durante o período das coletas. Além disso, 80% de todas as cepas apresentaram resistência à Ampicilina, indicando a necessidade de alerta para os riscos de infecção que o contato com este corpo d'água pode causar. Portanto, é importante que mais monitoramentos e análises sejam feitos nesses e em outros mananciais para que seja possível identificar o curso principal desse problema que gera um ônus constante para a população, tanto em relação à saúde pública, quanto ao restante dos ecossistemas.

Palavras-chave Detecção. Patogenicidade. Poluentes emergentes.

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Escherichia coli* AND EVALUATION OF BACTERIAL RESISTANCE PROFILE IN MICROBACTIONS WITH DIFFERENT USE AND LAND OCCUPATION

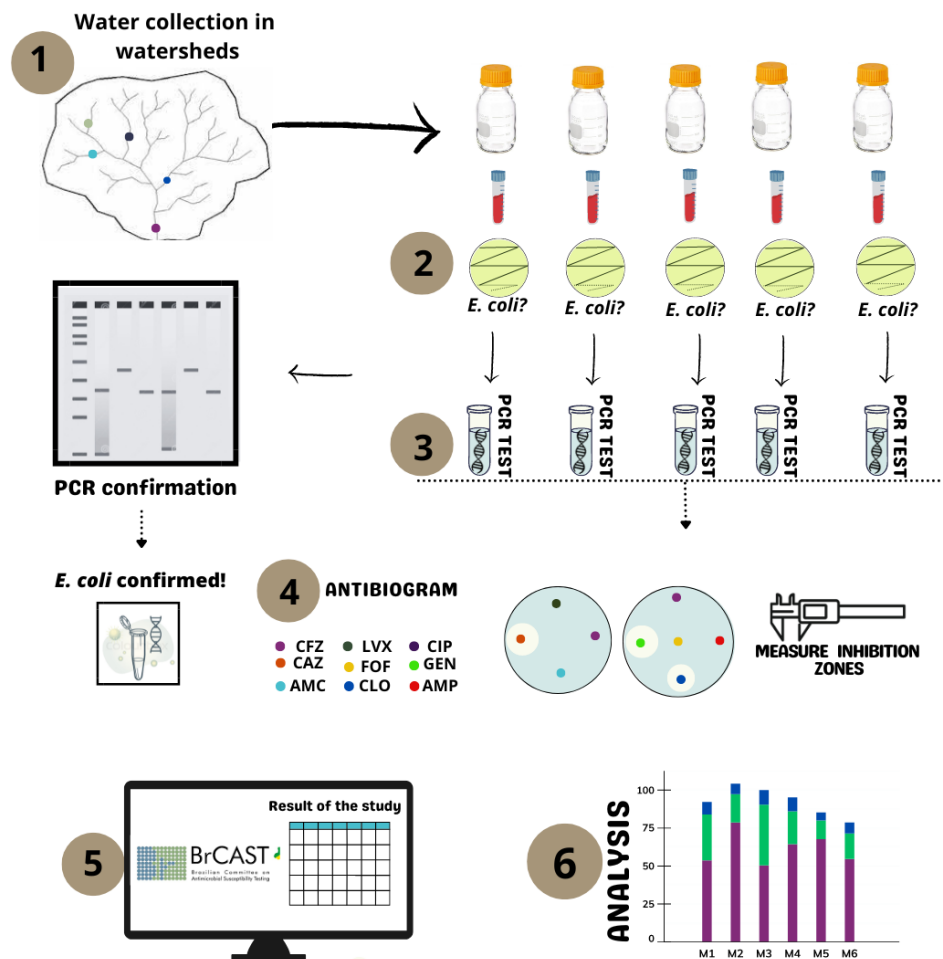
ABSTRACT

Escherichia coli is a versatile microorganism, which is present in the most diverse environments. In recent years, it has attracted the attention of science due to its high power of mutation, acquiring resistance and circumventing the mechanisms of action of antimicrobials. Despite the existence of a large amount of manuscripts dealing with antimicrobial resistance, there is no consensus on which are the main sources that allow this microorganism to spread rapidly and

cause frequent infections and symptomatic outbreaks. The objective of this research was to analyze the microbiological quality of water in microbasins with different characteristics of land use and occupation, in order to identify whether there is resistance in the isolated *E. coli* strains and what are their possible origins. To this end, three collection campaigns were carried out, from which these microorganisms were isolated and identified by PCR, subsequently undergoing susceptibility tests with nine antibacterials widely used to treat infections caused by this bacterial species. It was observed that the microbasin that receives sanitary effluents from the municipality showed greater contamination of strains resistant to the antibiotics tested and that these were persistent during the collection period. In addition, 80% of all strains showed resistance to Ampicillin, indicating the need to be alert to the risks of infection that contact with this body of water can cause. Therefore, it is important that more monitoring and analysis be carried out in these and other sources so that it is possible to identify the main course of this problem that generates a constant burden for the population, both in relation to public health and the rest of the ecosystems.

Key-words: Detection. Pathogenicity. Emerging pollutants.

RESUMO GRÁFICO



4.1 INTRODUÇÃO

A qualidade da água é um pilar base de sobrevivência na Terra. Apesar de ser uma condição de existência para a humanidade, grande parte desse recurso se encontra contaminado e em condições inadequadas para usos específicos (LI E WU et al., 2019). Em função disso, é pertinente que sejam realizados estudos periódicos, que avaliem e identifiquem possíveis contaminantes com potencial de toxicidade.

Um dos maiores problemas e contaminantes ativos da água são os microrganismos que entram em contato com mananciais através de despejo de efluentes (domésticos, industriais, agroindustriais, etc.) sem tratamento prévio. Desse modo, a pressão ambiental sofrida por bactérias, frente ao uso de antibióticos de forma indiscriminada, promove seleção de patógenos mais resistentes, problematizando as formas convencionais de tratamento, tanto na área clínica, quanto ambiental (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

Nesse sentido, cerca de 86% dos microrganismos causadores de infecções em humanos no Brasil, por veiculação hídrica ou alimentar, são bactérias, das quais, nos últimos 10 anos, *Escherichia coli* foi o principal agente causador de doenças (BRASIL, 2023). Dessa forma, é necessária a avaliação de possíveis perfis de resistência dessa bactéria que podem acentuar problemas de saúde pública, sociais, ambientais e econômicos. Atrelada a necessidade de evitar esses danos, a tecnologia de identificação molecular, facilita o trabalho de cientistas e oferece dados confiáveis para que as autoridades possam agir em defesa da população (KADRI, 2019).

Em relação aos patógenos, o manejo incorreto de resíduos e poluentes oriundos da atividade de criação de animais, e a ocupação urbana sem o devido saneamento básico, bem como o efluente de agroindústrias, podem acarretar diversos problemas ao solo e aos mananciais de água, alterando os ciclos naturais (CAO et al., 2021; SAVIN et al., 2021). Nessa vertente, quando a qualidade da água se encontra comprometida, é possível verificar a intensidade dos danos ao ambiente a partir do monitoramento e análise de determinados indicadores, dos quais, *Escherichia coli* (*E. coli*) é um dos microrganismos mais estudados (MEAYS et al., 2004; WEN et al., 2020; HOLCOMB E STEWART, 2020).

Por outro lado, há uma grande produção de antibióticos, em âmbito mundial, para combater microrganismos causadores de doenças, no entanto, o uso excessivo destes medicamentos para tratamento de pacientes infectados, bem como na produção animal, conduz grandes quantidades de resíduos de fármacos que não são metabolizados pelo organismo para estações de tratamento de esgoto, rios e lagos. Esse processo desencadeia a resistência antimicrobiana (RAM), em função da exposição gradual destes microrganismos aos

medicamentos presentes no ambiente, transmitindo essa capacidade às próximas gerações e até para outras bactérias (GUPTA; DUBEY; KUMAR, 2016; ALAWI, TORRIJOS E WALSH, 2022).

Conforme Murray et al. (2022), a partir de uma análise de dados globais, estima-se que, em 2019, cerca de 4,95 milhões de mortes foram associadas à Resistência Antimicrobiana (RAM) bacteriana, sendo que 1,27 milhão foram diretamente atribuídas a estes microrganismos patogênicos. Além disso, dentre os seis principais patógenos de morte associados à resistência, *E. coli* teve maior evidência.

O Brasil é um país extenso e enfrenta crises sanitárias históricas que podem ser vistas por grande parte da população como impossíveis de solucionar. Sendo assim, segundo o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento – SNIS, em 2019, quase 100 milhões de brasileiros ainda não tinham acesso à coleta de esgoto. Isso prova que a possibilidade de disseminação de doenças de veiculação hídrica e acúmulo de vetores é uma realidade.

Compreender os danos da RAM e as principais combinações patógeno-medicamento que contribuem para ela é crucial para tomar decisões políticas baseadas nas realidades locais, sobre programas de prevenção e controle de infecções, acesso a antibióticos essenciais e pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos (MURRAY et al., 2022).

Considerando o exposto, esse trabalho teve como objetivo isolar e confirmar a identidade molecular de cepas ambientais de *Escherichia coli* presentes em um corpo d'água, com diferentes perfis de uso e ocupação de microbacias. Além disso, quantifica-las para analisar o enquadramento do corpo hídrico, delineando o perfil de resistência ou susceptibilidade das bactérias isoladas, para mapear possíveis focos de contaminação e verificar a presença de risco para a população.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Coleta das amostras de água e caracterização da área de estudo

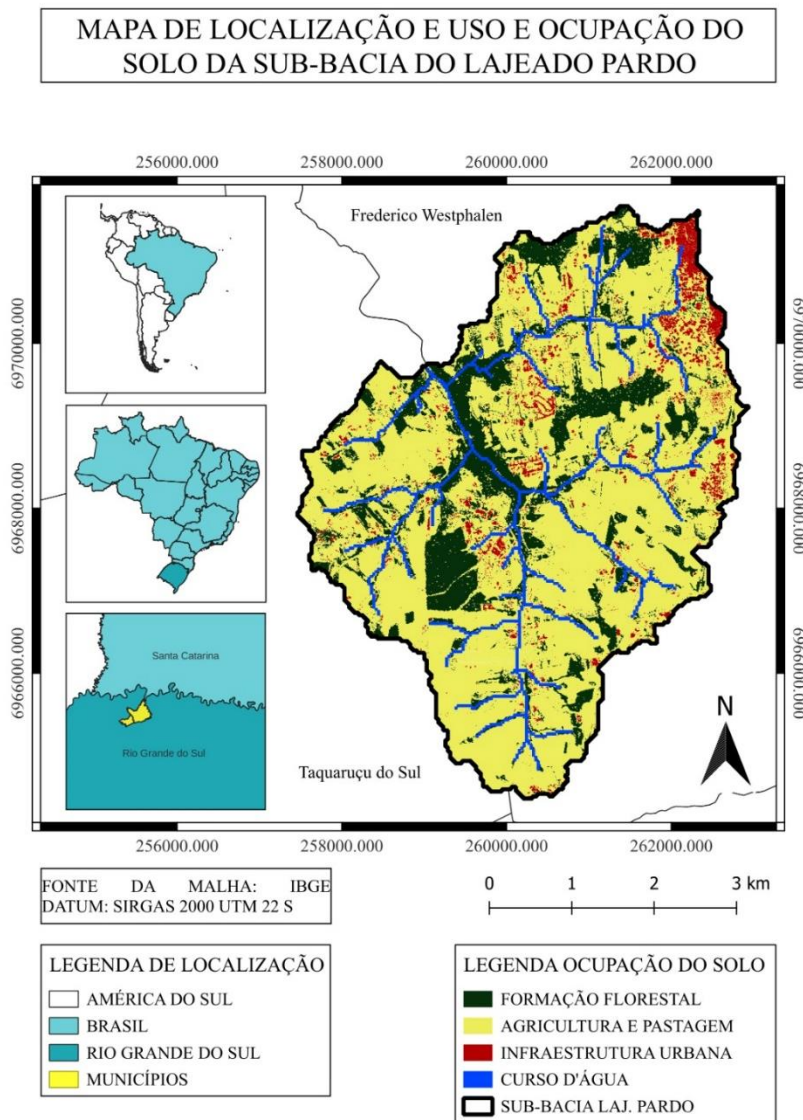
As coletas de água ocorreram em microbacias do Lajeado Pardo, localizadas entre os municípios de Frederico Westphalen e Taquaruçu do Sul, região noroeste do estado do RS, Brasil (IBGE, 2023). O Lajeado Pardo possui uma extensão de 5.700 m, tem sua nascente nas coordenadas: latitude 27° 25'43''S e longitude: 53° 43'25'', com uma altitude média de 488 m. Da nascente até o ponto de represamento para captação de água que abastece os municípios de

Frederico Westphalen e Caiçara – RS, Brasil. Foram realizadas três campanhas de coletas, que se estenderam de janeiro até março de 2022. Os tubos utilizados para coleta foram pré-esterilizados e armazenados na ausência de luz durante o transporte até o laboratório.

A confecção dos mapas de localização, delimitação da sub-bacia, microbacias e uso e ocupação do solo, foi realizada no software QGIS v.3.10.9. As imagens espaciais foram obtidas pelo portal do instituto nacional de pesquisas espaciais (INPE, 2022), do satélite CBERS4A, câmera imageadora WPM, com imagens processadas em L4, bandas espectrais RGB e resolução espacial de oito metros. Os cursos d'água e a delimitação das bacias foram gerados a partir do modelo altimétrico, fornecidos pelo banco de dados geomorfométricos do Brasil (TOPODATA).

A sub-bacia foi delimitada a partir do exutório, conectando os pontos de maior elevação, baseados nas curvas de nível. As classes, representadas na figura 1, utilizadas para caracterização de uso e ocupação do solo, foram: formação florestal, agricultura e pastagem e infraestrutura urbana, conforme as classificações sugeridas pelo instituto brasileiro de geografia e estatística (IBGE, 2020).

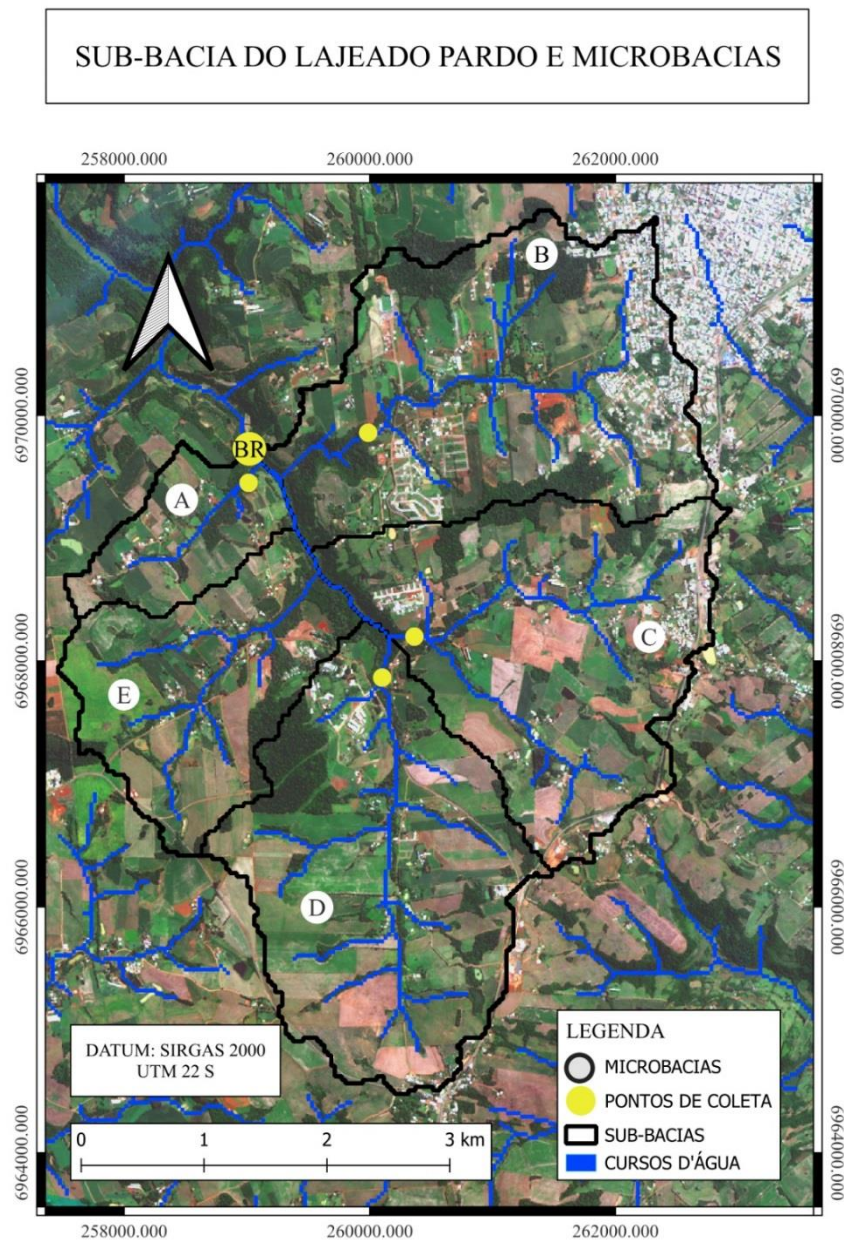
Figura 1 – Mapas de localização com temática de uso e ocupação do solo e delimitação das microbacias, com pontos de coleta da água analisada, no Lajeado Pardo – RS, Brasil



Fonte: Autor (2023).

Na figura 2, é apresentado o mapa representativo das microbacias, onde podem ser observados os pontos de coleta que ficam locados no exutório de cada microbacia (A, B, C, D e E), e um ponto a barragem de captação de água para abastecimento municipal. Desta-se se microbacia “E”, por trem sido as coletas em período de estiagem, não foi posivel coletas pois essa estava em escassez hídrica, assim foram coletadas amostras penas nas microbacia A, B, C e D.

Figura 2 – Mapa com delimitação das microbacias e pontos de coleta das amostras analisadas.



Fonte: Autor (2023).

4.2.2 Cultura Estoque

As culturas de estoque foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em 80% de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), com e 20% de glicerol (KOUADIO-NGBESSO et al., 2019). A cepa padrão utilizada como controle positivo foi *Escherichia coli* INCQS P3089 (laudo inserido no material suplementar), cepa cedida pelo laboratório de microrganismos de referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

4.2.3 Quantificação de *Escherichia coli* e coliformes totais

As amostras de água coletadas foram submetidas à detecção simultânea da enumeração de coliformes totais e *E. coli*, usando método Colilert, padrão para água e esgoto no Brasil (BRASIL, 2013), método aprovado pelo *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (SMEWW) (RICE et al., 2012).

Para compilar os dados dos poços pequenos e poços grandes positivos e gerar o número mais provável (NMP) do sistema *Quanti-Tray/2000*, utilizou-se do software gratuito *IDEXX Water NMP Generator*®, disponibilizado pelo laboratório da IDEXX. Ao inserir os valores dos poços pequenos e grandes positivos, o software informa automaticamente o NMP tanto de coliformes totais quanto de *E. coli*, para cada amostra.

4.2.4 Métodos de isolamento bacteriano para *Escherichia coli*

O método da membrana filtrante com filtros de acetato celulose de 47 mm de diâmetro e tamanho do poro de 0,45 µm, consiste na filtração de uma amostra de água (100 mL) previamente homogeneizada, mediante pressão negativa (vácuo) na intenção de reter os microrganismos na membrana. Posteriormente a membrana é inserida assepticamente sob meio sólido seletivo apropriado em placa de Petri, que por capilaridade entra em contato com a bactéria. As placas são incubadas por 24 horas em incubadora B.O.D., com temperatura adequada de cada meio de cultura (BRASIL, 2013). Para o controle negativo utilizou-se água destilada autoclavada e o controle positivo procedeu-se com cepa de referência da cultura de estoque, anteriormente descrita.

Para cultivo diferencial, foi utilizado o ágar Macconkey, um meio seletivo utilizado para o isolamento e diferenciação de enterobactérias Gram-negativas. Neste meio é possível diferenciar bactérias fermentadoras de lactose, através da formação de colônias róseas, das bactérias não fermentadoras da lactose, com formação de colônias incolores (ALLEN, 2005).

O meio *EC Medium*, favoreceu o isolamento de *E. coli*, conforme metodologia padrão executada a temperaturas elevadas (44,5 e 45,4 °C) por 24 horas. O teste para coliforme fecal que utiliza o meio EC é aplicável para investigações em água de consumo humano, poluição de córregos, fontes de água natural, sistemas de tratamento de esgoto, água para banho, água salgada e monitoramento de água em geral (RICE, 2012).

Por fim, foi realizada coloração de Gram para analisar se houve pureza dos isolados em relação à estrutura, tipo de parede celular e agrupamento. Essa técnica permite distinguir dois

tipos de estrutura celular em Gram-positivas ou Gram-negativas, justamente pela diferenciação de coloração das células (MOYES; REYNOLDS; BREAKWELL, 2009).

4.2.5 Procedimentos e reagentes para PCR

Para identificação das cepas isoladas em meios seletivos, foi utilizada a metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR), visando amplificar sequências específicas de DNA que representam cada espécie ou gene estudado.

4.2.5.1 Tampão de corrida da amostra e gel de agarose

A solução de TBE foi feita com 108 g de Trisamino (Hidroximetil) Aminometano, 55 g de Ácido Bórico, 7,5 g de EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético tetrassódico), completando até o nível de 1L de água desionizada, em balão volumétrico. Não houve necessidade de ajuste de pH, pois o mesmo se manteve em 8,0 ao final do preparo. O preparo seguiu as quantidades de reagentes utilizados em soluções comerciais de TBE padrão para o uso proposto nesse estudo.

Em função do tamanho do fragmento a ser amplificado, o gel de agarose foi feito em uma concentração de 0,8%, levando em conta as considerações de Serwer (1983), que realizou um estudo sobre diferentes concentrações de géis e a resolução dos fragmentos.

4.2.5.2 Pré-Mix para PCR

O Pré-Mix utilizado na reação possui todos os reagentes básicos para a reação de PCR: tampão de reação (Tris (Hidroximetil) Aminometano e KCl), pH 8,4, concentração de 2,0 mM de MgCl₂, 0,2mM dNTP e 2,5 U de Taq DNA Polimerase recombinante.

4.2.5.3 Análise de especificidade, preparo e diluição dos oligonucleotídeos – primers

Os primers para identificação de espécie (*forward* e *reverse*) disponíveis na literatura, foram analisados quanto a sua especificidade, formação de estruturas secundárias e demais parâmetros para uma boa amplificação. Para isso, utilizou-se o *software* Netprimer (BIOSOFT, 2022) e após análise, aquele que apresentou melhor avaliação foi escolhido. Depois da aquisição do produto, com massa de 25 nmol e purificados por dessalinização,

foram diluídos em solução de estoque e solução de trabalho. A solução de estoque foi diluída em 10 vezes multiplicadas pela quantidade de primer em cada amostra. Para a solução de trabalho, foram retirados 10 uL da solução de estoque e a esta quantidade foram adicionados mais 100 uL de água ultrapura. Desse modo, a concentração final da solução de trabalho de 1 pmol/uL.

4.2.5.4 Quantificação dos reagentes para amplificação

Para cada reação, seguindo o padrão do fabricante (anexo ao material suplementar), foram acrescentados a um microtubo de 200 uL (livre de DNase e RNase): 12,5 uL de Pré-Mix, 2,5 uL de cada primer (*forward* e *reverse*), 6,5 uL de água ultrapura e 1 uL de DNA molde em uma concentração aproximada de 5 ng, quantificados em espectrofotômetro UV, em comprimento de onda de 260 nm.

4.2.5.5 Obtenção do DNA bacteriano e amplificação em termociclador

O material genético bacteriano (DNA) foi obtido pelo método de fervura simples, considerado não só superior em sua simplicidade, custo e curto tempo de manuseio, mas também confiável (PENG et al., 2013; YAMAGISHI et al., 2016).

A amplificação foi testada com diferentes parâmetros de curva, inclusive com aqueles utilizados por McDaniels et al. (1996), para padronizar a reação antes do experimento principal. Neste caso específico, a metodologia foi ajustada para a reação, seguindo 1 ciclo inicial para desnaturação a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de três etapas: desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (55°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 2,5 minutos). Por fim, foi programado mais 1 ciclo a 72°C por 5 minutos de extensão no término da reação.

4.2.5.6 Ajuste de parâmetros para eletroforese

Os parâmetros para corrida de eletroforese em gel de agarose, foram ajustadas de acordo com as sugestões já utilizadas na literatura (SERWER, 1983; STELLWAGEN, 2009). Considerando um valor de aproximadamente 10 V/cm entre eletrodos da cuba. Desse modo, foram testadas voltagens entre 60 e 100 V (considerando que a distância dos eletrodos da cuba utilizada é de 10 cm). A melhor resolução foi observada quando se utilizou 70 V por 60 minutos.

Portanto, as demais amostras seguiram o mesmo padrão de metodologia.

4.2.6 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

O teste de sensibilidade tem como objetivo avaliar o perfil de resistência de cepas padrão ou ambientais, visando facilitar o entendimento dos profissionais da saúde no momento de administrar drogas para tratar pacientes infectados, reduzindo significativamente sua mortalidade (PATEL e FANG, 2018). Considerando rapidez e a prevalência de cepas resistentes no meio ambiente, é necessário que haja monitoramento e relato de casos que somem à literatura para mitigar impactos na saúde pública, que afetam diretamente as populações mais carentes (FERNÁNDEZ e VEZQUEZ, 2019).

A partir das cepas previamente isoladas, junto ao padrão, seguiu-se a metodologia de Bauer et al. (1966), com ajustes de metodologia, considerando atualizações feitas pela instituição Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BRCAST, 2022).

Os testes foram feitos em três repetições com cada cepa testada, para 9 tipos de antibióticos utilizados para o tratamento de *Escherichia coli*, sendo eles: Ampicilina (AMP 10 µg), Amoxicilina-clavulanato (AMC 20/10 µg), Cloranfenicol (CLO 30 µg), Gentamicina (GEN 10 µg), Ciprofloxacino (CIP 5 µg), Cefazolina (CFZ 30 µg), Ceftazidima (CAZ 30 µg), Fosfomicina (FOS 200 µg) e Levofloxacino (LVX 5 µg).

Após o preparo de todos os reagentes e insumos para os testes e a execução do experimento obedecendo as regras da metodologia citada anteriormente, os halos foram lidos com paquímetro digital e depois comparados com as tabelas de pontos de corte clínicos (BRCAST, 2022).

4.2.6.1 Cálculo da Múltipla resistência a antibióticos das cepas de *Escherichia coli*

A múltipla resistência a antibióticos (MAR) foi avaliada para todos os isolados (n=15) bacterianos que foram testados contra 9 antibióticos comerciais e MAR de uma cepa foi considerado quando houve resistência a pelo menos 2 antibióticos (ODONKOR; ADDO, 2018).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Determinação do uso e ocupação do solo nas diferentes microbacias da área estudada

As classificações atribuídas ao uso e ocupação do solo, consideradas conforme a prévia análise de campo, previram a predominância de agricultura e pastagem (AP), formações florestais (FF) e infraestruturas urbanas (IU). A tabela 1, determina a classificação do uso e ocupação do solo e os percentuais de cada classe por microbacia (A, B, C, D e E).

Tabela 1 – percentual de uso e ocupação do solo em cada microbacia.

CLASSE	A	B	C	D	E
FF	22,87	26,70	19,17	19,99	27,79
AP	74,14	61,66	76,08	76,89	69,50
IA	2,99	11,64	4,74	3,11	2,71

Fonte: Autor (2023)

Em todas as microbacias houve a predominância de áreas de AP (71,18%), seguidas, respectivamente, de pequenos agrupamentos de FF (22,98%) e IA (5,84%), representando médias da área total analisada de 23.565.413,43 Km². Esses dados demonstram uma FF ainda menor do que a tendência global, que, conforme FAO e UNEP (2020), ocupam 31% da área terrestre do planeta. Na microbacia B, foi observado o maior contingente de IU, que apresentou 55,88% do total calculado na microbacia.

Levando em conta a pequena quantidade de FF como mata ciliar, conforme é possível visualizar nos mapas expostos anteriormente (Figuras 1 e 2), é possível que a contaminação dos recursos hídricos seja facilitada, devido à baixa cobertura de barreiras físicas para impedir a entrada de sedimentos, contaminantes químicos e microbiológicos. Nesse sentido, os impactos da supressão de vegetação ciliar, podem ser observados a curto e longo prazo a partir da redução da qualidade da água, oferecendo riscos à saúde ambiental e, conseqüentemente, humana (SILVA et al., 2015; RITTER et al., 2015; CRISIGIOVANNI et al., 2020; SHAHA et al., 2022).

Nesse contexto, os efluentes resultantes de atividades agrícolas, agropecuárias, industriais e domésticas interagem de forma dinâmica com o ambiente, pois não fica retidos de maneira estática nos locais onde são dispostos. Tanto por escoamento, infiltração, dispersão de resíduos provenientes dessas atividades ou efluentes sem tratamento dispostos diretamente nos recursos hídricos, podem resultar na contaminação (CYCON, MROZIK e PIOTROWSKA-SEGET, 2019; USGS, 2019; FAO, 2023).

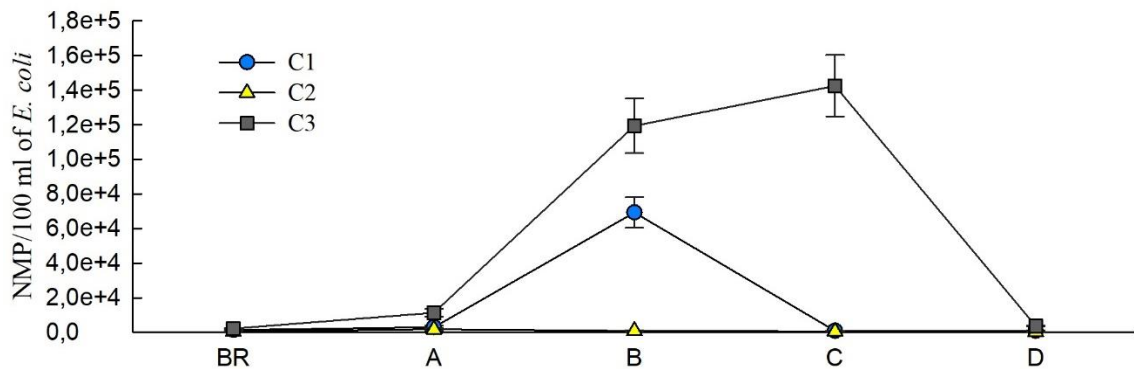
Devido a essa dinâmica entre contaminante/ambiente, o problema da resistência bacteriana como um poluente emergente, têm crescido. Considerando que a maioria dos antibióticos não é completamente metabolizada nos corpos de humanos e animais, parte desses medicamentos entram em contato com bactérias presentes em efluentes, a água e solo. Desse

modo os microrganismos adquirem resistência, devido à pressão ambiental de constante exposição (LARSON e FLACH, 2022).

4.3.2 Análise Microbiológica: Determinação da presença ou ausência e quantificação de *Escherichia coli*

A partir da análise qualitativa e quantitativa, conforme a metodologia Colilert, observou-se a presença de coliformes totais e *Escherichia coli* em todas as amostras analisadas (Figura 3). Os resultados quantificados das amostras analisadas apresentaram grandes quantidades, principalmente de coliformes totais.

Figura 3 – NMP de *Escherichia coli* em 100 ml, nos cinco pontos analisados em três coletas periódicas.



Fonte: Autor (2023).

A legislação CONAMA 357/2005 classifica os corpos da água no Brasil e essa classificação é importante uma vez que enquadra os rios em classes segundo seus usos preponderantes pretendidos ao longo do tempo. O rio em que a presente pesquisa foi realizada, não possui enquadramento. Nesse caso, a legislação atribui classificação 2. A classe dois permite o abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional, recreação de contato primário, conforme Resolução CONAMA nº 274/2000, irrigação de hortaliças, plantas frutíferas, parques, jardins, campos de esporte e lazer com os quais o público possa vir a ter contato direto e à aquicultura.

Em relação à classe de enquadramento do corpo hídrico, a CONAMA 357/2005 sugere que pelo menos 6 (seis) amostras devem ser coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. Por isso, sugere-se o monitoramento contínuo do corpo hídrico, principalmente nos pontos de coleta das microbacias B e C, que ultrapassaram os limites de *E.*

coli para o enquadramento da classe 2 e também da classe 3 na maioria das análises.

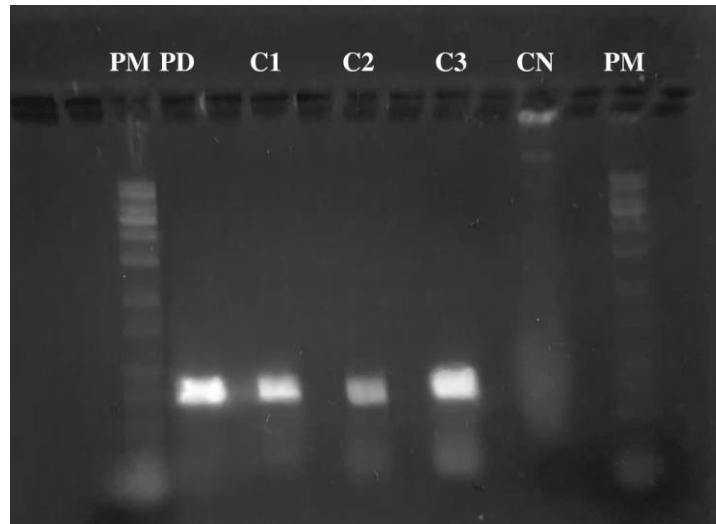
Para balneabilidade, conforme a resolução CONAMA 274/2000, que define os critérios para essa finalidade, pode se considerar que a água analisada está insatisfatória ou imprópria, considerando que de todas as amostras coletadas, apenas 20% tiveram o NMP abaixo de 800 *E. coli* por 100 ml. Na terceira campanha amostral, todos os pontos analisados excederam 2000 *E. coli* por 100 ml, contando com um NMP acima de 100 mil por 100 ml nas microbacias B e C, o que indica um grau elevado de contaminação.

4.3.3 Isolamento e identificação molecular de *Escherichia coli*

O par de primers para amplificação do material genético possui 670 pb (F – ACCTGCGTTGCGTAAATA; R – GGGCGGGAGAAGTTGATG), conforme mcDaniels et al. (1996). De acordo com a análise do software Netprimer, o par de primers não apresentou estruturas secundárias como ligação entre primers ou do primer em si mesmo. As repetições de oligos não ocorreram com mais de 3 bases em sequência, contendo uma quantidade suficiente de CG para a reação. A temperatura para anelamento ficou adequada aos parâmetros desejados e a estabilidade de ligação com a fita molde foi satisfatória (BIOSSOFT, 2022).

A partir do isolamento das cepas e da corrida em gel, com eletroforese, em cinco bateladas, foram identificadas as espécies de acordo com a amplificação. Conforme a figura 4, é possível confirmar a amplificação a partir do padrão de peso molecular (PM) que foi inserido nas duas extremidades e na sequência foram inseridas as amostras de controle positivo para *Escherichia coli* ATCC (PD), Cepa 1 (C1), Cepa 2 (C2), Cepa 3 (C3) e controle negativo (CN).

Figura 4 – Corrida em gel de eletroforese para visualização da amplificação das fitas molde para identificação da espécie.



Fonte: **Autor** (2023).

Todas as bateladas apresentaram resultado positivo para os isolados ambientais nos meios de crescimento bacteriano seletivos, confirmando a presença de *Escherichia coli* em todas as amostras, conforme o resultado observado nos testes de colilert.

4.3.4 Perfil de resistência das cepas isoladas aos antimicrobianos

Os fármacos para testes de susceptibilidade desse estudo foram escolhidos para atender os requisitos de especificidade de aplicação para infecções causadas por *E. coli*. Além disso, verificou-se a importância de escolher os medicamentos que possuem os pontos de corte mais bem definidos, evitando possíveis problemas de interpretação e classificação quanto aos níveis de sensibilidade ou resistência bacteriana. Considerando a importância dos testes de susceptibilidade, é imprescindível uma análise que possa agregar o máximo de classes possíveis, facilitando o entendimento sobre qual mecanismo de resistência está ativo nas cepas.

Conforme o manual da CLSI (2022), são definidos quatro grupos, que sugerem diferentes aplicações. Grupo A: antimicrobianos considerados apropriados para tratamento primário, bem como para relatórios de resultados de rotina para o grupo de organismos específico. Grupo B: antimicrobianos usados quando o organismo é resistente a agentes da mesma classe antimicrobiana no Grupo A. Grupo C: antimicrobianos alternativos ou suplementares contra cepas endêmicas ou epidêmicas resistentes a vários medicamentos primários, para tratamento de pacientes alérgicos a medicamentos primários, para tratamento de organismos incomuns ou para notificação à prevenção de infecções como auxílio epidemiológico. Grupo U: antimicrobianos usados apenas ou

principalmente para o tratamento de ITUs (CLSI, 2022).

A tabela 2 contém informações sobre as classes de cada antibiótico utilizado, bem como seu mecanismo específico de ação e suas indicações clínicas em caso de infecções por *Escherichia coli*.

Tabela 2 – Mecanismos de ação e indicações clínicas por classe de antibióticos.

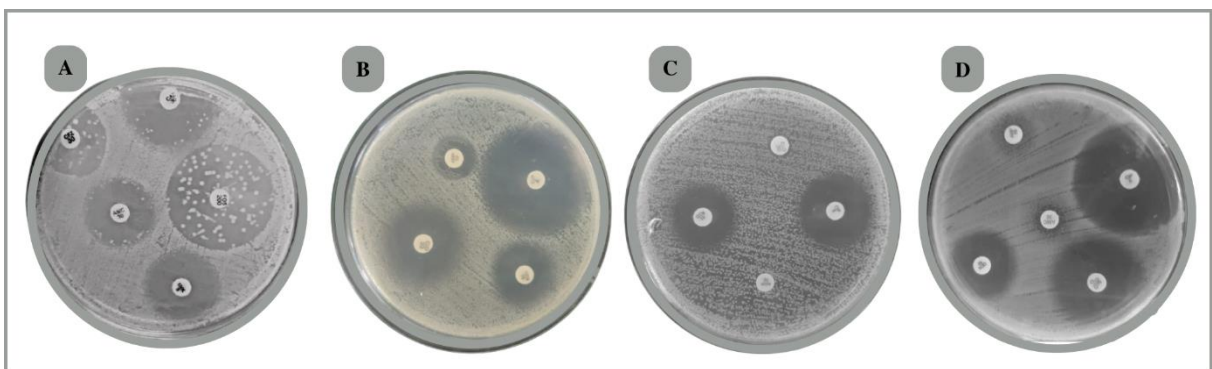
Classe/Grupo	Mecanismo de Ação	Indicações clínicas
Penicilinas: Ampicilina (A);	Inibição da síntese de parede celular bacteriana e causam lise osmótica.	Pneumonias, otites e sinusites, Faringites e epiglotites, infecções cutâneas, meningites bacterianas, infecções do aparelho reprodutor, endocardites bacterianas, profilaxia
Beta-lactâmicos: Amoxicilina clavulanato (B);	Inibição da enzimas beta-lactamases pelo ácido clavulânico, propiciando a ação da amoxicilina que inibe a replicação e causa lise das células.	Pneumonia; bronquite; Sinusite; Otite; Faringite; Amigdalite; Infecções da pele; Erisipela; Doença inflamatória pélvica; Infecção urinária, como cistite, uretrite ou pielonefrite; Infecção nos ossos ou articulações, como osteomielite.
Cefalosporinas: 1ª geração: Cefazolina (A/U);	Interrompem a síntese da camada de peptidoglicano das paredes celulares bacterianas, gerando a lise e morte celular.	1ª geração: infecções de pele, partes moles, faringite estreptocócica, infecções do trato urinário não complicadas e profilaxia de cirurgias.
3ª geração: Ceftazidima (C);		3ª geração: infecções de feridas cirúrgicas, pneumonias, infecções do trato urinário complicadas
Fluoroquinolonas: Ciprofloxacino (B); Levofloxacino (B).	Inibem a atividade da enzima DNA girase que impede a replicação e transcrição do DNA bacteriano, que eventualmente culminam na morte celular.	Trato genito-urinário, trato gastrointestinal trato respiratório, osteomielites infecção em partes moles, ação contra micobactérias, trato genito-urinário
Aminoglicosídeos: Gentamicina (A)	Inibição da síntese proteica. Ligam à subunidade ribossômica 30S da bactéria, o que gera uma má interpretação do código genético e interrupção da tradução.	Septicemias, infecções do trato urinário, endocardites, infecções respiratórias, infecções intra-abdominais, meningites em recém-nascidos, infecções oculares, osteomielites e infecções de articulações
Anfenicóis: Cloranfenicol (C)	Liga à subunidade 50S do ribossomo, inibindo a síntese protéica da bactéria, tendo, assim, ação bacteriostática contra uma gama de bactérias.	Meningite bacteriana e epiglotite, artrite séptica, osteomielite, febre tifóide
Fosfomicinas: Fosfomicina (U)	Atua como bactericida que rompe a síntese da parede celular inibindo a sintetase do fosfoenolpiruvato e, assim, interfere na produção de peptidoglicano	Infecções do trato urinário sem complicações
Referências: (PEECHAKARA, BASIT E GUPTA, 2022; MARTIN E KAYE, 2004; BRUYÈRE, DIHN E SOTTO, 2016; QUINTILIANI, NIGHTINGALE E CHARLES, 1978; CAMPOLI-RICHARDS, 1988; ZHANG et al., 2018; BIENTINESI, MURRI E SACCO, 2020; XUE et al., 2021; CHAVES E TADI, 2020; PONGS, 1979; KAHAN et al., 1979; CANDEL, DAVID E LÓPEZ, 2019).		

Fonte: Autor (2023).

As cepas apresentaram diferentes perfis de resistência. Apesar de pertencerem a mesma espécie, possivelmente foram submetidas a diferentes graus de pressão ambiental, bem como entraram em contato com variados potencializadores. A pressão seletiva do uso, uso excessivo

e uso indevido de antimicrobianos em humanos, animais e a agricultura levam a um aumento gradual na resistência a antibióticos (PAITAN, 2018) que, posteriormente, faz com que bactérias tratáveis agora são intratáveis ou necessitem aplicação de uma última linha de antibióticos (VENTOLA, 2015). Considerando as diferentes características das microbacias estudadas, é possível que haja uma grande influência do tipo de uso e ocupação desses ambientes sobre os perfis dinâmicos de resistência bacteriana. Esse comportamento divergente pode ser observado conforme a figura 3, que varia de acordo com o fármaco testado e a cepa.

Figura 3 – Antibiograma ilustrativo do perfil de resistência de cepas isoladas em diferentes microbacias.



Fonte: Autor (2023).

Como panorama geral, apenas três cepas isoladas apresentaram comportamento igual ao da cepa padrão. Dos isolados da microbacia B, a cepa Ec9 apresentou um perfil semelhante à Ec8 e a cepa Ec7 também demonstrou resistência. Esses microrganismos foram isolados do mesmo setor e isso gera um alerta para que sejam feitas novas coletas e avaliações, principalmente no ponto de coleta da microbacia B, que abrange parte da ocupação urbana do município. Na tabela 3, é apresentado o perfil de resistência das cepas bacterianas aos antibióticos CIP, AMP, CLO, GEN, FOF, LVX, CFZ, AMC e CAZ. As cepas foram nomeadas pela espécie bacteriana (Ec) e enumeradas conforme o local de coleta, sendo BR a barragem de captação e A, B, C e D as microbacias, nas três campanhas de coletas.

Tabela 3 – Perfil de resistência bacteriano das cepas isoladas, caracterizadas como *Escherichia coli*.

CEPA	CIP	AMP	CLO	GEN	FOF	LVX	CFZ	AMC	CAZ
Padrão	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ec1-BR	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ec2-BR	S	R	S	S	S	S	SDA	S	S
Ec3-BR	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Ec1-A	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ec2-A	S	R	S	S	S	S	SDA	S	S
Ec3-A	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Ec1-B	S	R	S	S	S	S	SDA	S	S

Ec2-B	R	R	R	S	R	S	R	AIT	SDA
Ec3-B	SDA	R	R	S	R	S	SDA	S	S
Ec1-C	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Ec2-C	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Ec3-C	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Ec1-D	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Ec2-D	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ec3-D	S	R	S	S	S	S	S	S	S

*R – Resistente; *S – Sensível; *SDA – Sensível com Dose Aumentada; *AIT – Área de Incerteza Técnica.
Fonte: Autor (2023).

Na tabela 4, são apresentados os resultados do TSA, onde o antibiótico testado menos eficaz contra as 15 cepas testadas foi a ampicilina onde 80,0% das cepas foram resistentes a essa droga, seguida da cefazolina (33,3%), ciprofloxacina/ cloranfenicol/ fosfomicina (13,3%), amoxicilina clavulanato/ ceftazidima (6,7%). Nenhuma cepa foi resistente contra gentamicina e levofloxacina.

Tabela 4 – Teste de suscetibilidade a antimicrobianos com isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água bruta

Antibiótico (concentração)	Nº de isolados suscetíveis (%)	Nº de isolados resistentes* (%)
CIP (5 µg)	13 (86,7)	2 (13,3)
AMP (10 µg)	04 (20,0)	11 (80,0)
CLO (30 µg)	13 (86,7)	2 (13,3)
GEN (10 µg)	15 (100,0)	0 (0,0)
FOS (200 µg)	13 (86,7)	2 (13,3)
LVX (5 µg)	15 (100,0)	0 (0,0)
CFZ (30 µg)	10 (66,7)	5 (33,3)
AMC (20/10 µg)	14 (93,3)	1 (6,7)
CAZ (30 µg)	14 (93,3)	1 (6,7)

* Cepas com perfil de SDA ou AIT foram consideradas resistentes.

Fonte: Autor (2023).

Assim como nos estudos realizados em outros países por Rame et al. (2008) e Kadykalo et al. (2020), encontrou-se isolados de *E. coli* que não poderão ser tratadas com doses convencionais dos antibióticos CLO, AMP, AMC e CIP. De acordo com WHO (2020), a taxa de resistência à ciprofloxacina, um antibiótico comumente usado para tratar infecções do trato urinário, variou de 8,4% a 92,9% para *E. coli*. A ampicilina, antibiótico com menor eficiência nesse estudo, é utilizada contra organismos gram-positivos e gram-negativos. Esse medicamento pode ter uma ação sinérgica com os aminoglicosídeos e com os inibidores da β -lactamase, como ácido clavulânico e sulbactam (FOULDS, 1986; BARNHART, 1989). Suas indicações clínicas abrangem infecções dos tratos respiratório e urinário, gonorreia, meningite, septicemia e infecções entéricas.

As drogas mais eficazes encontradas nesse trabalho foram o aminoglicosídeo gentamicina e a fluoroquinolona levofloxacina. A gentamicina é um fármaco não representado

nos relatórios de resistência aos antibióticos pela organização mundial da saúde, conforme a figura 4. No entanto, o medicamento levofloxacino, apesar de aparecer nos relatórios, ainda possui um dos menores índices de resistência. Esse medicamento, de acordo com Bundrick et al. (2003), administrado apenas uma vez ao dia, demonstrou a mesma eficácia de ciprofloxacino administrado duas vezes ao dia em pacientes infectados por *E. coli*, em sua grande maioria. Isso sugere uma maior efetividade como terapia para tratamento de infecções por essa bactéria.

Além da resistência a um antibiótico, as cepas podem desenvolver perfil multirresistente, ou seja, resistente a pelo menos dois antibióticos. A Tabela 5 apresenta esses valores. Das 15 cepas ambientais, 33,33% (n=5) apresentaram perfil de múltipla resistência.

Tabela 5 – Múltipla resistência a antibiótico das cepas ambientais isoladas

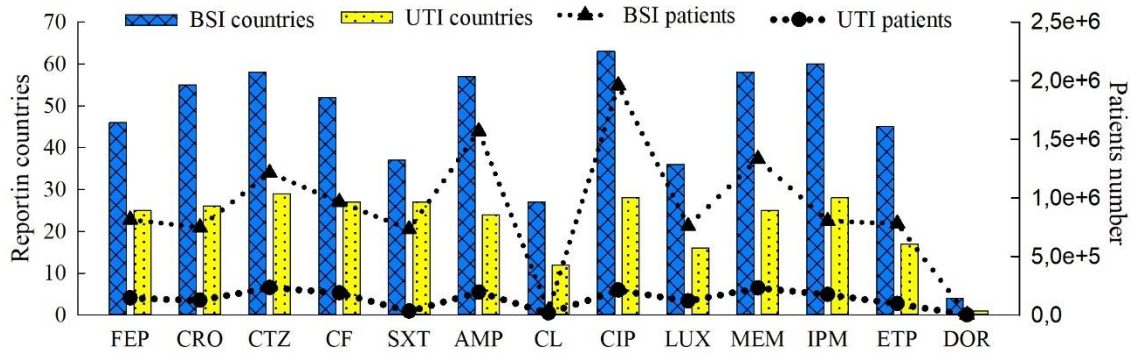
Antibióticos não efetivos	Padrão de multirresistência	Número de isolados resistentes
Dois	AMP, CFZ	3 (60,0)
Cinco	CIP, AMP, CLO, FOS, CFZ	1 (20,0)
Sete	CIP, AMP, CLO, CFZ, AMC, CAZ, FOF	1 (20,0)

Fonte: Autor (2023).

A multirresistência em *E. coli* é uma realidade que vem sendo discutida ao longo de anos e que persiste. Além disso, esse microrganismo com alto potencial de patogenicidade, é notificado em estudos de vários lugares do mundo, independente de do grau de desenvolvimento econômico dos países (WRIGHT E PERINPANAYAGAM, 1987; PHILLIPS et al. 1988; ASTAL et al. 2002; WOODFORD et al. 2007; PORRES-OSANTE et al. 2014; RAMAN et al. 2018). Em função disso, estudos que identificam e caracterizam cepas bacterianas com potencial patogênico precisam seguir norteando as ações das autoridades responsáveis pela segurança da população.

Desse modo, considera-se a necessidade de coletas periódicas para avaliar se há persistência desses microrganismos no ambiente, pois podem apresentar alto risco para diversas espécies, inclusive humana, caso entrem em contato com organismos multirresistentes. Assim como consta na figura 5, alguns dos antibióticos observados como ineficazes nesse trabalho, de acordo com o relatório da organização mundial da saúde WHO (2021), também foram reportados em vários países do mundo. Destacam-se, principalmente a resistência a Ciprofloxacino e Ampicilina que além de estarem entre os mais reportados em diferentes países, também representam maior número em pacientes com infecções no trato urinário (UTI).

Figura 5 – Relação do número de países e pacientes com notificações de Infecções sistêmicas básicas (BSI) e Infecções do trato urinário (UTI) por cepas de *E. coli* resistentes. Dados do relatório WHO, 2021.



FEP= cefepime; CRO= ceftriaxone; CTZ= ceftazidime; CF= cefotaxime; SXT= co-trimoxazole; AMP= ampicillin; CL= colistin; CIP= ciprofloxacin; LUX= levofloxacin; MEM= meropenem; IPM= imipenem; ETP= ertapenem; DOR= doripenem.

Fonte: Autor (2023).

Assim como os resultados encontrados nesse trabalho, muitos outros estudos (HADIFAR et al., 2017; ZHANEL, ZHANEL E KARLOWSKY, 2018; ODKOR E ADDO, 2018; MBELLE et al., 2019; SALLEH et al., 2022) espalhados pelo mundo encontraram *E. coli* resistentes aos mais diversos antibióticos utilizados para tratar infecções causadas pela mesma. Em humanos, segundo Geurtsen et al., (2022) esse microrganismo é capaz de infectar o trato respiratório, vesícula biliar, rins, intestino grosso e delgado, próstata, uretra, pele, corrente sanguínea e o cérebro.

Considerando o amplo espectro de infecções que *E. coli* pode causar, é relevante que se entenda a origem e as causas das mutações sofridas por essa bactéria, bem como maneiras de remediação. As bactérias resistentes não apenas existem nas águas residuais dos hospitais, mas também persistem em águas superficiais, sedimentos de rios e nos próprios organismos presentes nesses ambientes, mesmo após a descontaminação da água (CDC, 2023). O conceito de saúde única (*one health*), conforme o Center For Disease Control And Prevention reafirma a ideia que a saúde dos seres humanos está diretamente ligada a todo o ambiente, pois tudo está conectado. Desse modo, é indispensável a compreensão de que é necessária uma visão abrangente e multissetorial, considerando as interações do homem com o ambiente, para que seja possível mitigar os problemas relativos à resistência antimicrobiana global.

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tendência de cepas de *Escherichia coli* resistentes a múltiplas drogas é global. Essa pesquisa soma com informações para suprir os bancos de dados científicos sobre o comportamento de um microrganismo versátil que está em evidência dentre os problemas de saúde em todo o mundo. Esse estudo demonstrou a efetividade na utilização de metodologias que propiciam a quantificação, isolamento e identificação molecular de *E. coli*, para um delineamento eficiente do perfil de resistência dessa bactéria. Uma alta carga de *E. coli* foi identificada na maioria dos pontos de coleta. Percebeu-se que as microbacias com maior influência urbana propiciaram maior carga microbiológica e o isolamento de cepas com resistência a um maior número de antibióticos.

Nesse sentido, existem sérias lacunas de dados sobre o perfil de resistência de *Escherichia coli* isoladas de pacientes infectados no Brasil. Mais distante dessa realidade está o monitoramento dos corpos hídricos em relação à sua qualidade microbiológica. Apesar de haver informações sobre o tipo de patógeno causador de doenças de transmissão hídrica e alimentar, não existem dados que confirmem a resistência ou susceptibilidade deste aos medicamentos. Portanto, enfatiza-se a necessidade de expandir as pesquisas que monitoram esses patógenos e seu comportamento em diferentes ambientes.

REFERÊNCIAS

- ALAWI, Marwa; TORRIJOS, Trinidad Velasco; WALSH, Fiona. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in drinking water. **Environmental Advances**, 2022, 100191.
- ALLEN, Mary E. MacConkey agar plates protocols. **American Society for Microbiology**, p. 1-4, 2005.
- ASTAL, Z., et al. Multiresistant *Escherichia coli* isolated from women with community-acquired urinary tract infections in the Gaza Strip. **Journal of chemotherapy** (Florence, Italy), 2002, 14.6: 637-638.
- BARNHART, E. (1989) Physicians' Desk Reference, 43rd ed., Oradell, NJ, **Medical Economics**, p. 303.
- BAUER, A. W. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single diffusion method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BIENTINESI, Riccardo; MURRI, Rita; SACCO, Emilio. Efficacy and safety of levofloxacin as a treatment for complicated urinary tract infections and pyelonephritis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, 2020, 21.6: 637-644.
- BIOSOFT, Premier. **NetPrimer. 1.10**. Accessed in Apr. 2022. Available on <https://www.premierbiosoft.com/crm/jsp/com/pbi/crm/clientside/EligibleForDiscountLoginForm.jsp?LoginForFreeTool=true&PID=3>
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Dados surtos de DTSA - 2000 a 2021**. 2023. Disponível em: https://docs.google.com/spreadsheets/d/1XT4iffaWUcMgU_t-Q0mKZhX1UHUJsJxi/edit#gid=1026946243. Acesso em: 10 fev. 2023.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Resolução **CONAMA nº 274**, de 29 de novembro de 2000. Diário Oficial da União, 2000.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Resolução **CONAMA n° 357**, de 15 de junho de 2005. Diário Oficial da união, 2005.

BRCAS, Brazilian Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing. **Método de disco-difusão**. 2022. Disponível em: <https://brcast.org.br/documentos/documentos-3/>. Acesso em: 12 ago. 2022.

BRCAS, Brazilian Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing. Tabela pontos de corte clínicos. 2022. Disponível em: <https://brcast.org.br/documentos/documentos-3/>. Acesso em: 12 ago. 2022.

BRUYÈRE, F.; DIHN, A.; SOTTO, A. Intérêt de l'association amoxicilline-acide clavulanique en urologie: mise au point. **Progrès en urologie**, 2016, 26.8: 437-441.

BUNDRICK, William et al. Levofloxacin versus ciprofloxacin in the treatment of chronic bacterial prostatitis: a randomized double-blind multicenter study. **Urology**, v. 62, n. 3, p. 537-541, 2003.

CAMPOLI-RICHARDS, Deborah M., et al. Ciprofloxacin: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. **Drugs**, 1988, 35: 373-447.

CANDEL, Francisco Javier; DAVID, Mayra Matesanz; LÓPEZ, José Barberán. New perspectives for reassessing fosfomycin: applicability in current clinical practice. **Revista Espanola de Quimioterapia**, 2019, 32. Supl 1: 1.

CAO, Son Truong et al. Impactos dos efluentes de diferentes tipos de fazendas de gado (porcos, vacas e aves) na qualidade da água circundante: uma avaliação abrangente usando o método de avaliação de parâmetros individuais e índices de qualidade da água. **Ciência Ambiental e Pesquisa sobre Poluição**, v. 28, n. 36, pág. 50302-50315, 2021.

CDC, Center For Disease Control And Prevention. **Understanding Antibiotic Resistance in Water: A One Health Approach**. 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/onehealth/in-action/understanding-antibiotic-resistance-in-water.html>. Acesso em: 08 jan. 2023.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, et al. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. US Department of Health and Human Services, **Centres for Disease Control and Prevention**, 2019.

CHAVES, Bruno J.; TADI, Prasanna. **Gentamicin**. 2020.

CLSI, Clinical Laboratory Standard Institute. **CLSI M100-ED32:2022 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 32nd Edition**. 2022. Disponível em: [http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED32:2022&sbssok=CLSI%20M100%20ED32:2022%20SECTION%20REFERENCES%20\[NEXT\]](http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED32:2022&sbssok=CLSI%20M100%20ED32:2022%20SECTION%20REFERENCES%20[NEXT]). Acesso em: 08 set. 2022.

CRISIGIOVANNI, Enzo Luigi, et al. Inadequate riparian zone use directly decreases water quality of a low-order urban stream in southern Brazil. **Revista Ambiente & Água**, 2020, 15.

CYCON, Mariusz; MROZIK, Agnieszka; PIOTROWSKA-SEGET, Zofia. Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. **Frontiers in microbiology**, 2019, 10: 338.

DE ÁGUA, Manual Prático de Análise. Fundação Nacional de Saúde. **Vigilância Ambiental em Saúde**. Brasília, 2013.

FAO and UNEP. 2020. **The State of the World's Forests 2020**. Forests, biodiversity and people. Rome.

FAO, Food And Agriculture Organization Of The United States. **Agriculture: cause and victim of water pollution, but change is possible**. 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/land-water/news-archive/news-detail/en/c/1032702/>. Acesso em: 28 mar. 2023.

FERNÁNDEZ, Javier; VAZQUEZ, Fernando. The importance of cumulative antibiograms in diagnostic stewardship. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 6, p. 1086-1087, 2019.

FOULDS, George. Pharmacokinetics of sulbactam/ampicillin in humans: a review. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 8, n. Supplement_5, p. S503-S511, 1986.

GUPTA, Divya; DUBEY, Jyotirmay; KUMAR, Mukesh. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of some medicinal plants against selected common human pathogenic microorganisms. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 6, n. 1, p. 15-20, 2016.

HADIFAR, Shima, et al. Epidemiology of multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Japanese journal of infectious diseases**, 2017, 70.1: 19-25.

HOLCOMB, David A.; STEWART, Jill R. Microbial indicators of fecal pollution: recent progress and challenges in assessing water quality. **Current environmental health reports**, 2020, 7: 311-324.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades e Estados: frederico wstphalen. Frederico Wstphalen**. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rs/frederico-westphalen.html>. Acesso em: 07 fev. 2023.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Monitoramento da Cobertura e Uso da Terra**. 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/informacoes-ambientais/cobertura-e-uso-da-terra/15831-cobertura-e-uso-da-terra-do-brasil.html>. Acesso em: 05 fev. 2023.

INPE, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Divisão de geração de imagens**. 2022. Disponível em: <http://www2.dgi.inpe.br/catalogo/explore>. Acesso em: 12 jan. 2023.

KADRI, Karim. Polymerase chain reaction (PCR): Principle and applications. **Synthetic Biology-New Interdisciplinary Science**, 2019.

KADYKALO, Stefanie et al. Antimicrobial resistance of Salmonella and generic *Escherichia coli* isolated from surface water samples used for recreation and a source of drinking water in southwestern Ontario, Canada. **Zoonoses and Public Health**, v. 67, n. 5, p. 566-575, 2020.

KAHAN, Frederick M., et al. The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1974, 235.1: 364-386.

KOUADIO-NGBESSO, Nadège et al. Comparative biotypic and phylogenetic profiles of *Escherichia coli* isolated from resident stool and lagoon in Fresco (Côte d'Ivoire). **International Journal of Microbiology**, v. 2019, 2019.

LARSSON, DG Joakim; FLACH, Carl-Fredrik. Antibiotic resistance in the environment. **Nature Reviews Microbiology**, 2022, 20.5: 257-269.

LI, Peiyue; WU, Jianhua. Drinking water quality and public health. **Exposure and Health**, 2019, 11.2: 73-79.

MARTIN, Stanley I.; KAYE, Kenneth M. Beta-lactam antibiotics: newer formulations and newer agents. **Infectious Disease Clinics**, 2004, 18.3: 603-619.

MBELLE, Nontombi Marylucy, et al. The resistome, mobilome, virulome and phylogenomics of multidrug-resistant *Escherichia coli* clinical isolates from Pretoria, South Africa. **Scientific Reports**, 2019, 9.1: 16457.

MCDANIELS, A. E. et al. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3350-3354, 1996.

MEAYS, Cynthia L., et al. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. **Journal of environmental management**, 2004, 73.1: 71-79.

MOYES, Rita B.; REYNOLDS, Jackie; BREAKWELL, Donald P. Differential staining of bacteria: gram stain. **Current Protocols in Microbiology**, v. 15, n. 1, p. A. 3C. 1-A. 3C. 8, 2009.

MURRAY, Christopher JL et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.

ODONKOR, Stephen T.; ADDO, Kennedy K. Prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water sources. **International journal of microbiology**, 2018, 2018.

PAITAN, Yossi. Current trends in antimicrobial resistance of *Escherichia coli*. **Escherichia coli, a versatile pathogen**, 2018, 181-211.

PATEL, Robin; FANG, Ferric C. Diagnostic stewardship: opportunity for a laboratory–infectious diseases partnership. **Clinical infectious diseases**, v. 67, n. 5, p. 799-801, 2018.

PEECHAKARA, Basil V.; BASIT, Hajira; GUPTA, Mohit. Ampicillin. In: StatPearls [Internet]. **StatPearls Publishing**, 2022.

PENG, Xin et al. Comparison of direct boiling method with commercial kits for extracting fecal microbiome DNA by Illumina sequencing of 16S rRNA tags. **Journal of microbiological methods**, v. 95, n. 3, p. 455-462, 2013.

PHILLIPS, Ian, et al. Epidemic multiresistant *Escherichia coli* infection in West Lambeth health district. **The Lancet**, 1988, 331.8593: 1038-1041.

PONGS, O. Chloramphenicol. Mechanism of action of antibacterial agents, 1979, 26-42.

PORRES-OSANTE, Nerea, et al. Emergence of a multiresistant KPC-3 and VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* strain in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2014, 69.7: 1792-1795.

QUINTILIANI, RICHARD; NIGHTINGALE, CHARLES H. Drugs five years later: ceftazidime. **Annals of Internal Medicine**, 1978, 89.5_Part_1: 650-656.

RAM, S. et al. Determination of antimicrobial resistance and virulence gene signatures in surface water isolates of *Escherichia coli*. **Journal of applied microbiology**, v. 105, n. 6, p. 1899-1908, 2008.

RAMAN, Gayathri, et al. Multiresistant *E. coli* urine infections in children: a case-control study. **Archives of disease in childhood**, 2018, 103.4: 336-340.

RASCHLE, Susanne et al. Environmental dissemination of pathogenic *Listeria monocytogenes* in flowing surface waters in Switzerland. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2021.

RICE, Eugene W. et al. (Ed.). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, DC: **American public health association**, 2012.

RITTER, Luciana Gregory, et al. Manejo da Micro Bacia do Lajeado Pardo. **HOLOS**, 2015, 6: 123-130.

SAVIN, Mykhailo et al. Bactérias resistentes a antibióticos, genes de resistência a antibióticos e resíduos de antibióticos em águas residuais de um matadouro de aves após tratamentos convencionais e avançados. **Relatórios Científicos**, v. 11, n. 1, pág. 16622, 2021.

SERWER, Philip. Agarose gels: Properties and use for electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 4, n. 6, p. 375-382, 1983.

SHAH, Nadeem W., et al. The effects of forest management on water quality. **Forest Ecology and Management**, 2022, 522: 120397.

SILVA, Juliana Caroline de Alencar da, et al. Utilização de índices físicos, químicos e biológicos para avaliação da qualidade de corpos d'água em processo de recuperação: Córrego Ibiraporã, SP. **RBRH: Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, 2015, 20.4: 959-969.

STELLWAGEN, Nancy C. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. **Electrophoresis**, v. 30, n. S1, p. S188-S195, 2009.

USGS. **Agricultural Contaminants**. 2019. Disponível em: <https://www.usgs.gov/mission-areas/water-resources/science/agricultural-contaminants#:~:text=Agricultural%20contaminants%20can%20impair%20the,streams%2C%20rives%2C%20and%20groundwater..> Acesso em: 27 mar. 2023.

VENTOLA, C. Lee. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and therapeutics**, 2015, 40.4: 277.

WEN, Xiaotong, et al. Microbial indicators and their use for monitoring drinking water quality—A review. **Sustainability**, 2020, 12.6: 2249.

WHO, World Health Organization. **Record number of countries contribute data revealing disturbing rates of antimicrobial resistance**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/01-06-2020-record-number-of-countries-contribute-data-revealing-disturbing-rates-of-antimicrobial-resistance>. Acesso em: 05 jan. 2023.

WOODFORD, Neil, et al. Molecular epidemiology of multiresistant *Escherichia coli* isolates from community-onset urinary tract infections in Cornwall, England. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, 2007, 59.1: 106-109.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2021**. 2021.

WRIGHT, E. D.; PERINPANAYAGAM, R. M. Multiresistant invasive *Escherichia coli* infection in south London. **The Lancet**, 1987, 329.8532: 556-557.

XUE, Zhisong, et al. A systematic review and meta-analysis of levofloxacin and ciprofloxacin in the treatment of urinary tract infection. **Ann Palliat Med**, 2021, 10: 9765-9771.

YAMAGISHI, Junya et al. Comparison of boiling and robotics automation method in DNA extraction for metagenomic sequencing of human oral microbes. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0154389, 2016.

ZHANEL, George G.; ZHANEL, Michael A.; KARLOWSKY, James A. Oral fosfomicin for the treatment of acute and chronic bacterial prostatitis caused by multidrug-resistant *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, 2018, 2018.

ZHANG, Gui-Fu, et al. Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. **European journal of medicinal chemistry**, 2018, 146: 599-612.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAIS

As relações entre o ser humano e a natureza sempre geram impactos que não podem ser medidos de forma imediata. Algumas consequências são observadas a curto prazo, mas isso não significa que os danos futuros serão menores. Essa relação, que desgasta e pressiona o meio ambiente, conseqüentemente gera uma pressão seletiva dos seres vivos e, nesse sentido, algumas adaptações que ocorrem em nome da sobrevivência, geram altos riscos à espécie humana.

Exemplo disso é a qualidade microbiológica dos recursos hídricos que tem sua qualidade afetada gradativamente pelo despejo de efluentes agrícolas, industriais, domésticos e hospitalares que, por sua vez, propiciam um ambiente típico de seleção dos organismos mais adaptados. Nesse sentido, algumas bactérias possuem tendências intrínsecas, que facilitam sua sobrevivência e infecção de hospedeiros. Exemplo disso é a *Escherichia coli*, uma bactéria que, por muito tempo, foi vista como inofensiva, por estar presente no trato gastrointestinal de seres humanos de forma comensal. Porém, com o passar dos anos, várias infecções causadas por diferentes patótipos dessa bactéria foram notificadas e estudadas, chegando até o momento atual como um dos microrganismos mais capazes de agravar o quadro clínico de pacientes infectados.

Tanto a resistência, quanto a virulência observadas nessa bactéria, gradativamente, elevam o seu potencial patogênico e geram novos patótipos, sendo que até o momento, como já discutido nessa pesquisa, alguns mecanismos de patogenicidade sequer foram elucidados. Desse modo, apesar da grande quantidade de estudos acerca de *E. coli*, ainda há insuficiência para descrever com clareza quais são os principais focos de disseminação de suas cepas patogênicas no ambiente. Considerando o desgaste social e os gastos com saúde pública, as opções que se mostram viáveis são àquelas que trazem as soluções mais simples e menos onerosas. Sendo assim, é necessário que sejam realizados monitoramentos, constantemente aprimorados que sirvam como norteadores aos órgãos públicos.

Nesse contexto, a presente pesquisa observou alta presença de *E. coli* nas amostras de água coletadas na área de estudo. Levando em conta as legislações vigentes que preveem o monitoramento para enquadramento dos corpos hídricos, se esses resultados persistirem, o corpo hídrico deverá ser considerado impróprio para balneabilidade e também será necessária a mudança de classes, considerando a fragilidade observada na qualidade microbiológica da água do lajeado.

Em relação ao perfil de resistência de cepas ambientais de *E. coli* houve variação nas áreas de diferentes uso e ocupação do solo. A persistência das bactérias com resistência a mais antibióticos foi observada nas microbacias com maior influência urbana. Mesmo assim, ao

longo das três campanhas de coleta, todas as microbacias apresentaram cepas resistentes a pelo menos um antibiótico. Além disso, também foram encontrados microrganismos multirresistentes, que podem gerar distúrbios ambientais e, em caso de infecção em humanos, pode dificultar ainda mais o tratamento, em função da indisponibilidade de terapias farmacológicas eficientes.

Ademais, apesar de haverem dezenas de doenças que também necessitam maior atenção por parte de pesquisadores e autoridades, é importante que haja foco nos principais problemas que persistem e crescem no País. Dessa forma, *E. coli* precisa ser monitorada, levando em conta que, atualmente, é o principal microrganismo causador de doenças de transmissão hídrica e alimentar no Brasil.

REFERÊNCIAS GERAIS

- BECEIRO, Alejandro; TOMÁS, María; BOU, Germán. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world?. **Clinical microbiology reviews**, 2013, 26.2: 185-230.
- BENTLEY, Ronald; MEGANATHAN, R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. **Microbiological reviews**, v. 46, n. 3, p. 241-280, 1982.
- BLOUNT, Zachary D. The unexhausted potential of *E. coli*. **Elife**, v. 4, p. e05826, 2015.
- CDC, Center For Disease Control And Prevention. **Understanding Antibiotic Resistance in Water: A One Health Approach**. 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/onehealth/in-action/understanding-antibiotic-resistance-in-water.html>. Acesso em: 08 jan. 2023.
- CDC, Centers For Disease Control And Prevention. **Actions to Fight Antimicrobial Resistance**. 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/actions-to-fight.html>. Acesso em: 05 fev. 2023.
- ECDC, European Centre For Disease Prevention And Control. **Antimicrobial resistance - Escherichia coli**. 2023. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/escherichia-coli-ecoli/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 03 fev. 2023.
- EDOKPAYI, Joshua N. et al. Impact of wastewater on surface water quality in developing countries: a case study of South Africa. **Water quality**, v. 10, p. 66561, 2017.
- FEWTRELL, Lorna; KAY, David. Recreational water and infection: a review of recent findings. **Current environmental health reports**, v. 2, p. 85-94, 2015.
- LAWRENCE, Jeffrey G.; ROTH, John R. Evolution of coenzyme B12 synthesis among enteric bacteria: evidence for loss and reacquisition of a multigene complex. **Genetics**, v. 142, n. 1, p. 11-24, 1996.
- MAGANA-ARACHCHI, D. N.; WANIGATUNGE, R. P. Ubiquitous waterborne pathogens. In: Waterborne pathogens. **Butterworth-Heinemann**, 2020. p. 15-42.
- NAIDOO, Shaline; OLANIRAN, Ademola O. Treated wastewater effluent as a source of microbial pollution of surface water resources. **International journal of environmental research and public health**, v. 11, n. 1, p. 249-270, 2014.
- STEC, Joanna, et al. Opportunistic Pathogens of Recreational Waters with Emphasis on Antimicrobial Resistance—A Possible Subject of Human Health Concern. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2022, 19.12: 7308.
- WATER, Sanitation et al. **Emerging issues in water and infectious disease**. World Health Organization, 2002.
- WHO Recommendations on Scientific, **Analytical and Epidemiological Developments Relevant to the Parameters for Bathing Water Quality in the Bathing Water Directive (2006/7/EC)** 2018. Available online:

<https://circabc.europa.eu/d/d/workspace/SpacesStore/9e89152c-7cfe-4391-9bcf-c173519e8181/WHO%20Recommendations%20on%20EC%20BWD.pdf> (accessed on 14 October 2020).

WHO, World Health Organization. **Antibiotic resistance**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance#:~:text=To%20prevent%20and%20control%20the,worker's%20advice%20when%20using%20antibiotics..> Acesso em: 05 fev. 2023.