

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA  
LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA VETERINÁRIA**

**ANÁLISE GENÔMICA E PERFIL DE VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA  
COLI* ENDOMETRIAL PATOGÊNICA (EnPEC)**

**Autora: Cassiane Elisabete Lopes**

**PORTO ALEGRE**

**2019/2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA  
LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA VETERINÁRIA**

**ANÁLISE GENÔMICA E PERFIL DE VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA  
COLI* ENDOMETRIAL PATOGÊNICA (EnPEC)**

**Autora: Cassiane Elisabete Lopes**

**Trabalho apresentado à  
Faculdade de Veterinária como  
requisito parcial para a obtenção  
da graduação em Medicina  
Veterinária**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra.  
Franciele Maboni Siqueira  
Coorientadora: Msc. Silvia de  
Carli**

**PORTO ALEGRE**

**2019/2**

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente à vida por todas as oportunidades que me ofereceu, desde a educação e carinho de minha família, ingresso na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, até a sorte de ter pessoas maravilhosas com quem eu compartilho meu dia-a-dia. Dedico esse trabalho não só às pessoas que me deram subsídios para adquirir conhecimento profissional, mas às que ofereceram exemplo para eu me tornar mais humana, respeitando todo tipo de vida animal.

À minha professora orientadora Franciele Maboni Siqueira por dedicar tempo e disposição para me ensinar não só as técnicas de laboratório, mas a amar a bacteriologia. A ti devo toda a minha vida profissional. À minha coorientadora, doutoranda Silvia de Carli por desprender tempo e paciência na ajuda da realização desse trabalho. Nos conhecemos há pouco tempo, mas já tenho um apreço gigante por ti. Às colegas do Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LaBacVet) por todo o apoio técnico e emocional durante esses quatro anos de trabalho no laboratório. Também a todos os profissionais veterinários envolvidos na realização desse projeto, que não foram poucos.

Às minhas colegas de curso, que desde o primeiro semestre me acompanharam e fizeram com que todo o período de graduação fosse mais leve. Também às minhas amigas de infância que estiveram comigo durante todo esse período e que compreenderam minha ausência em muitos momentos para que eu me dedicasse aos estudos.

Por fim, agradeço aos meus pais, Nair e Renato, por colocarem o sonho de me tornar Médica Veterinária em primeiro lugar e às minhas irmãs, Camila e Carina, por sempre serem exemplo a seguir. A vocês devo tudo o que sou.

## RESUMO

A piometra é uma infecção do trato reprodutivo frequentemente diagnosticada na rotina clínica de animais de companhia. A patogênese da infecção ainda é pouco compreendida, porém fatores hormonais e a virulência bacteriana parecem ser importantes para o desenvolvimento da enfermidade. *Escherichia coli* endometrial patogênica (EnPEC) é o agente bacteriano mais comumente isolado de piometra em cadelas e gatas, no entanto esse patotipo é o menos estudado dentre o grupo de *E. coli* extraintestinais patogênicas (ExPEC). Estudos anteriores apontam que isolados de *E. coli* de piometra originam-se da microbiota intestinal e possuem genes de virulência normalmente encontrados em *E. coli* uropatogênicas (UPEC). Portanto, o objetivo desse trabalho é compreender o perfil de virulência de EnPECs para melhor caracterizar a patogenicidade desse patotipo. Para isso, o primeiro sequenciamento de genoma de um isolado EnPEC (*E. coli*\_LBV005/17) foi realizado e o genoma analisado. A partir disso, genes de virulência foram selecionados e buscados em uma coleção de 45 isolados de EnPEC, sendo os mesmos também atribuídos aos filo-grupos de Clermont empregando-se a técnica de PCR *multiplex*. Ademais, o perfil de susceptibilidade dos isolados foi determinado pela técnica de disco-difusão em ágar. Uma ampla gama de genes de virulência, não apenas relacionados à UPEC, mas também à *E. coli* intestinais, foram identificados no genoma analisado. Interessantemente, a análise de MLST *in silico* classificou o isolado *E. coli*\_LBV005/17 como *E. coli* ST131, um clone pandêmico multirresistente. Tanto o isolado *E. coli*\_LBV005/17, quanto a maioria dos isolados EnPEC (68,8%) foram incluídos no filo-grupo B2 de Clermont. Dentre o perfil de virulência dos isolados testados, podemos destacar o gene *fimA*, como o mais frequente relacionado à adesão (98%); a presença dos genes codificantes de toxinas *artA* e *cdtA*, pela primeira vez relatados em isolados EnPEC; e a ampla distribuição do sistema de captação de ferro por enterobactina. Com relação à resistência antimicrobiana, apenas cinco isolados (11%) exibiram resistência múltipla *in vitro*, embora *E. coli*\_LBV005/17 seja um isolado multirresistente. Por fim, os resultados demonstram o forte potencial patogênico de EnPEC e lançam alguns esclarecimentos e possibilidades para a melhor caracterização da patogenicidade desse patotipo.

**Palavras-chave:** *E. coli*, piometra, perfil de virulência, patogenicidade, sequenciamento genômico, animais de companhia

## **ABSTRACT**

*Pyometra is a reproductive tract infection frequently diagnosed in the clinical routine of pets. The pathogenesis of the infection is still not understood, however hormonal factors and bacterial virulence appears to be important to the development of pyometra. Endometrial pathogenic E. coli (EnPEC) is the most common bacterial agent isolated from pyometra in pets, nevertheless this pathotype is the least studied among the extraintestinal pathogenic E. coli (ExPEC) group. Previous studies point out that E. coli isolates from pyometra originate from intestinal microbiota and have virulence associated genes normally found in uropathogenic E. coli (UPEC). Therefore, the aim of this study is to understand the virulence profile to improve the pathogenic characterization of this patotype. For that, the first EnPEC genome sequenced (strain E. coli\_LBV005/17) was performed and the genome analyzed. From that, virulence genes were select and search in a collection of 45 EnPEC isolates. The same isolates were assigned to Clermont phylo-groups using multiplex PCR. Moreover, the antimicrobial susceptibility profile of 45 isolates was determined by the agar disk-diffusion technique. A wide range of virulence factors, not just related to UPEC, but also to intestinal E. coli, were identified in the analyzed genome. Interestingly, a MLST analysis classified the E. coli\_LBV005/17 isolate as E. coli ST131, a pandemic multiresistant clone. Both the isolate E. coli\_LBV005/17 and the most isolates (68.8%) were assigned as B2 phylo-group. Among the virulence profile of the tested isolates, we could highlight the fimA gene, as the most frequent gene related to adhesion (98%); the presence of encoded genes to the toxins artA and cdtA, described for the first time in EnPEC isolates; and the wide distribution of the enterobactin iron uptake system. Related to the antimicrobial resistance, just five isolates (11%) exhibit multiple resistance in vitro, although E. coli\_LBV005/17 is a multiresistant isolate. Lastly, the results demonstrate the strong pathogenic potential of EnPEC and shed lights and possibilities to better characterized the pathogenicity of this patotype.*

**Key-words:** *E. coli, pyometra, virulence profile, pathogenicity, genomic sequencing, pets*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos .....	9
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Piometra .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2 <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>12</b>
3.2.1 <i>E. coli</i> extraintestinais patogênicas (ExPEC).....	14
3.1.1 <i>E. coli</i> endometrial patogênica .....	14
<b>4 ARTIGO .....</b>	<b>18</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
<b>6 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO C .....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO D .....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO E .....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A piometra é a principal enfermidade infecciosa do trato reprodutivo de animais de companhia, sendo sua ocorrência bastante comum na clínica de pequenos animais (COGGAN *et al.*, 2008). Patologicamente se caracteriza pelo acúmulo de conteúdo purulento intrauterino resultado de infecção bacteriana (FELDMAN, 2014). A ovariosalpingohisterectomia (OSH) emergencial faz parte do tratamento preconizado (FELDMAN, 2014), já que a retirada do útero exclui imediatamente o foco infeccioso, evitando quadros de septicemia e endotoxemia bacteriana.

*Escherichia coli* é o agente mais comumente isolado de quadros de piometra (COGGAN *et al.*, 2008) e sua presença é normalmente associada à quadros graves de infecção (MATEUS *et al.*, 2013). São denominadas *E. coli* endometriais patogênicas (EnPEC) as isoladas a partir do útero e as mesmas fazem parte do grupo de *E. coli* extraintestinais patogênicas (ExPEC).

*E. coli* extraintestinais se diferenciam de *E. coli* intestinais, pois apresentam habilidade de colonizar nichos específicos através da expressão de diversos fatores de virulência (GYLES & FAIRBROTHER, 2010), tais como adesinas, toxinas, sistemas de captação de ferro, evasão do sistema imune do hospedeiro, resistência a antimicrobianos, formação de biofilme e produção de colicinas. Por não apresentarem, muitas vezes, fatores de virulência específicos, isolados de um mesmo grupo patogênico podem apresentar diferenças com relação aos genes de virulência carregados no genoma (GYLES & FAIRBROTHER, 2010) e a diferenciação genotípica dos grupos de ExPEC se torna mais difícil. Técnicas como sequenciamento genômico total, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para busca de genes de virulência, e análises filogenéticas têm sido grandes ferramentas para caracterizar geneticamente os diferentes patótipos de *E. coli*, auxiliando na compreensão de como essa espécie bacteriana consegue causar as diferentes enfermidades.

O perfil de patogenicidade de EnPEC é o menos conhecido dentre os patótipos de *E. coli*. Estudos prévios têm associado o perfil de virulência de EnPEC aos fatores de virulência de UPECs devido a três propostas: *i*) a ocorrência simultânea de cistites e piometra é relativamente comum (GYLES & FAIRBROTHER, 2010); *ii*) isolados de EnPEC e UPEC de um mesmo animal pertenceriam ao mesmo clone (HAGMAN & KÜHN, 2002); e *iii*) a similaridade entre os patótipos EnPEC e UPEC seria devido à ascensão de isolados da microbiota vaginal ou intestinal do hospedeiro em ambos os casos de infecção (SANDHOLM *et al.*, 1975).

Siqueira *et al.* (2009) demonstraram a elevada quantidade de fatores de virulência que UPECs e EnPECs compartilham, em contraste com *E. coli* comensais de trato intestinal. Já os resultados de Mateus *et al.* (2013) sugerem que nenhum perfil de virulência pode ser associado a *E. coli* isoladas de piometra, visto que o perfil de genes de virulência e ilhas de patogenicidade testados não diferenciaram de isolados de *E. coli* de cistite e de fezes de caninos saudáveis. Logo, sugeriram que tanto isolados de cistite quanto comensais podem ser potenciais patógenos do útero de cadelas (MATEUS *et al.*, 2013).

Nesse contexto, observamos que poucos estudos, até o momento, empregaram técnicas moleculares para a caracterização genotípica de *E. coli* isoladas de casos de piometra, levando ao restrito entendimento dos mecanismos de patogenicidade desse patotipo no ambiente uterino. Sendo assim, o objetivo desse estudo é realizar o sequenciamento e análise do primeiro genoma de um isolado EnPEC, e a partir destes dados, realizar a análise genotípica de uma coleção de isolados de EnPECs, através da busca de genes de virulência pela técnica de PCR de 45 isolados de *E. coli* de piometra armazenados no Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LaBacVet) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), aprimorando a caracterização do perfil de virulência desse grupo de *E. coli*.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Compreender o perfil de virulência de EnPECs através de técnicas moleculares para caracterizar a patogenicidade desse patotipo.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Sequenciar e analisar o genoma do isolado de *E. coli*\_LBV005/17 do patotipo EnPEC.
- Descrever os genes de virulência encontrados no genoma de *E. coli*\_LBV005/17.
- Determinar o perfil de virulência para 45 isolados EnPEC.
- Classificar os 45 isolados EnPEC dentro dos filo-grupos de Clermont.
- Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de 45 isolados EnPEC.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Piometra

A piometra é uma enfermidade do trato reprodutivo que comumente afeta fêmeas de animais de companhia, principalmente em países em que a castração eletiva de cadelas e gatas não é uma prática tão frequente (HAGMAN, 2018). Fêmeas caninas apresentam piometra com, em média, sete anos de idade (HAGMAN, 2018) e gatas com, em média, quatro anos (HAGMAN *et al.*, 2014). O desenvolvimento de piometra em gatas não é tão comum, porém a etiologia da doença é similar em ambas as espécies (HAGMAN *et al.*, 2014). No entanto, a taxa de mortalidade de gatas (5,7%) (HAGMAN *et al.*, 2014), comparada com cadelas (3-4%) (EGENVALL *et al.*, 2001), é maior.

*Escherichia coli* é o agente bacteriano mais comumente isolado de piometra em animais de companhia. Em caninos, o percentual de isolamento de *E. coli* de piometra varia de 65% a 90% (GYLES & FAIRBROTHER, 2010; FRANSSON *et al.*, 1997, HAGMAN, 2018), enquanto em felinos, o percentual é de em torno de 71% (HAGMAN, 2018). A presença desse micro-organismo é associada a quadros sistêmicos severos de piometra (MATEUS *et al.*, 2013). Outros gêneros bacterianos também podem estar envolvidos na infecção, tais como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Nocardia* spp., *Pasteurella* spp. e *Klebsiella* spp. (HAGMAN, 2018).

Durante a fase lútea do ciclo estral (diestro) em fêmeas de animais de companhia, a produção de progesterona pelo corpo lúteo estimula o crescimento e atividade secretora de glândulas endometriais e diminui a atividade de contração do miométrio (NELSON & COUTO, 2001). Esses mecanismos mediados pela progesterona favorecem a retenção de líquido intrauterino, propiciando ambiente adequado para multiplicação de bactérias que tenham alcançado o útero pela ascensão a partir da vagina durante a fase de estro, fase em que a cérvix se encontra aberta (HAGMAN & KÜHN, 2002). O uso de progestágenos, para inibir o estro, e de estrógenos, em prenhez indesejada, aumenta significativamente as chances de desenvolvimento de piometra (FELDMAN, 2014).

A patogênese da piometra é complexa e ainda não é totalmente entendida, porém envolve fatores hormonais e o potencial patogênico das bactérias envolvidas (HAGMAN, 2018). A enfermidade é resultado de uma infecção bacteriana que leva à inflamação e acúmulo de conteúdo purulento intrauterino (FELDMAN, 2014). Embora

o desenvolvimento de Hiperplasia Endometrial Cística (HEC) possa predispor à implantação de infecção uterina secundária, a piometra pode ocorrer sem HEC (DE BOSSCHERE *et al.*, 2001; FRANSSON & RAGLE, 2003). Além disso, estudos já demonstraram que há diferença de expressão de receptores de estrogênio e progesterona em casos de HEC e piometra, sugerindo que diferentes fatores estão associados à patogênese dessas duas enfermidades (DE BOSSCHERE *et al.*, 2002).

A piometra pode ser classificada como aberta ou fechada, dependendo da abertura da cérvix. Em casos em que a cérvix se encontra aberta, a descarga de exsudato vaginal é observada (PRESTES *et al.*, 1991). Nos casos mais severos, principalmente quando causados por *E. coli*, o exsudato tem aspecto espesso e viscoso, com coloração de vermelho à marrom; já em infecções causadas por *Streptococcus* sp. ou *Staphylococcus* sp. o exsudato costuma ter aspecto típico supurativo (SCHLAFER & MILLER, 2007).

Outra forma de apresentação é a piometra de coto, que pode ocorrer em cadelas e gatas que tenham sido incompletamente castradas. A patologia normalmente se desenvolve por remanescência de tecido uterino e muitas vezes também ovariano, após OSH (HAGMAN, 2018; FELDMAN, 2014). O desenvolvimento de abscesso no coto uterino pode ocorrer e o diagnóstico, nessa situação, se torna bastante difícil (FELDMAN, 2014).

Os sinais clínicos mais frequentemente identificados em quadros de piometra em cadelas são letargia, anorexia e em alguns casos, descarga vaginal (HAGMAN *et al.*, 2006). Já em gatas, os sinais mais comumente observados são depressão, letargia, hiporexia/anorexia, vômito, perda de peso e descarga hemopurulenta em casos em que a cérvix se encontra aberta (HOLLINSHEAD & KREKELER, 2016).

O desenvolvimento de Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS), anteriormente chamada de sepsis ou choque séptico, é comum durante a infecção uterina, o que coloca a vida do animal em risco (FRANSON & RAGLE, 2003). Essa síndrome está associada a quadros de infecções graves que levam à liberação de mediadores inflamatórios sistemicamente (FRANSON & RAGLE, 2003).

A endotoxemia também pode ocorrer, principalmente quando a infecção é causada por *E. coli*. Os lipopolissacarídeos (LPS), componentes da parede celular de Gram-negativas, são potentes endotoxinas (CRUTCHLEY *et al.*, 1967). Essas endotoxinas podem ser liberadas massivamente após morte ou crescimento exacerbado de bactérias no sítio de ação. As mesmas alcançam a circulação sanguínea e ativam a formação de imunocomplexos que levam à depressão cardiovascular e colapso

(FRASSON & RAGLE, 2003). Além disso, os imunocomplexos formados também são responsáveis por desenvolver glomerulonefrite, o que explica os sinais clínicos de poliúria e polidipsia (FRASSON & RAGLE, 2003; SCHLAFER & MILLER, 2007) mesmo após tratamento do paciente.

O diagnóstico preliminar de piometra é baseado em histórico, sinais clínicos, achados de exame ginecológico, análise hematológica e bioquímica de sangue, e ultrassonografia e/ou radiografia de abdômen (HAGMAN, 2018). O diagnóstico diferencial de piometra deve levar em consideração o acúmulo de líquido intrauterino sem infecção bacteriana, como a mucometra e hidrometra. Embora as manifestações clínicas possam ser similares, na piometra a letargia e depressão dos animais são mais acentuadas e a resposta inflamatória é maior (HAGMAN, 2018).

Como tratamento, a OSH de emergência é a alternativa mais preconizada (FELDMAN, 2014; LYLE, 2015), visto que a retirada do útero exclui imediatamente o foco infeccioso, evitando quadros de endotoxemia e sepse. O tratamento clínico, com uso de antimicrobianos e prostaglandina, não é preconizado, exceto em casos de pacientes gravemente enfermos e que corram risco de vida durante o procedimento cirúrgico (FELDMAN, 2014).

O prognóstico do paciente, utilizando-se técnica cirúrgica para remoção uterina é bom e a taxa de mortalidade é relativamente baixa (3-20%) (HAGMAN, 2018), no entanto se complicações como ruptura uterina e desenvolvimento de SRIS ocorrerem, a taxa de mortalidade se torna alta (HAGMAN, 2018). As complicações mais comumente desenvolvidas após OSH são: peritonite, infecções de trato urinário, infecções de pele, uveíte e arritmia cardíaca (JITPEAN *et al.*, 2014). A OSH eletiva é uma importante forma de prevenção de piometra, visto que é feita em animais saudáveis (HAGMAN, 2018). O uso de estrógenos e progestágenos devem ser evitados, visto que aumentam as chances de desenvolvimento dessa enfermidade.

### **3.2 *Escherichia coli***

*E. coli* é caracterizada morfolologicamente como bacilo Gram-negativo, anaeróbicos facultativos, móveis ou não, que fazem parte da família das *Enterobacteriaceae* (QUINN *et al.*, 2005). A mesma cresce facilmente em ágar MacConkey, onde formam colônias fermentadoras de lactose (GYLES & FAIRBROTHER, 2010), já a produção de hemólise por algumas linhagens de *E. coli* pode ser visualizada em ágar sangue (QUINN *et al.*, 2005). As características bioquímicas clássicas da espécie incluem: reação de indol positiva, não utilização de

citrato como única fonte de carbono e negatividade nos testes de urease e sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) (GYLES & FAIRBROTHER, 2010). A maioria das cepas de *E. coli* são comensais do sistema digestório, porém uma série de cepas são patógenos oportunistas ou primários envolvidos em diversas enfermidades em animais (MOXLEY, 2013).

Há dois grandes grupos de *E. coli* patogênicas, divididas conforme o local de infecção: *E. coli* intestinais patogênicas (InPEC) e *E. coli* extraintestinais patogênicas (ExPEC) (ROJAS-LOPEZ *et al.*, 2018). Dentro desses grupos as cepas dessa espécie bacteriana ainda são classificadas em patotipos, conforme a expressão de fatores de virulência importantes nos mecanismos de patogenicidade (GYLES & FAIRBROTHER, 2010). Dentro do grupo InPEC estão os patotipos: EAEC (*E. coli* enteroagregativa), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EPEC (*E. coli* enteropatogênica) e STEC (*E. coli* shigatoxigênica), subdividido em EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) e VTEC (*E. coli* verotoxigênica). Já dentro do grupo ExPEC se encontram os patotipos: SEPEC (*E. coli* causadoras de septismias), APEC (*E. coli* aviária patogênica), UPEC (*E. coli* urinária patogênica), EnPEC (*E. coli* endometrial patogênica) e MPEC (*E. coli* causadora de mastite). Os fatores de virulência de *E. coli* patogênicas incluem cápsula, endotoxinas, adesinas, enterotoxinas e outros produtos secretados (QUINN *et al.*, 2005).

Segundo Clermont *et al.* (2013), isolados de *E. coli* podem ser divididos em sete grupos filogenéticos pertencentes a *E. coli sensu stricto* (A, B1, B2, C, D, E e F) e um filo-grupo pertencente à linhagem críptica *Escherichia* clado I. Os isolados são classificados levando em consideração a presença ou ausência dos genes *arpA*, *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*. Isolados responsáveis por causar infecções extraintestinais normalmente são classificadas dentro do filo-grupo B2, enquanto *E. coli* comensais, na sua maioria, estão dentro dos filo-grupos A e B1 (PICARD *et al.*, 1999). Os filo-grupos B2 e F têm sido filogeneticamente correlacionados por derivarem de um mesmo ancestral e divergem do restante dos grupos, que abrangem a maioria das cepas de *E. coli* intestinais patogênicas; enquanto o filo-grupo C têm sido relacionado ao filo-grupo B1 (CLERMONT *et al.*, 2011). Uma nova linhagem de *Escherichia* que são geneticamente similares, porém fenotipicamente indistinguível de *E. coli*, são classificadas como pertencentes os clados crípticos, com o clado I (WALK *et al.*, 2009). No entanto, o potencial patogênico dos membros dessa linhagem ainda não está bem definido (CLERMONT *et al.*, 2011).

### 3.2.1 *E. coli* extraintestinais patogênicas (ExPEC)

Cepas de *E. coli* extraintestinais (ExPEC) são responsáveis pela maioria das infecções extraintestinais em animais e humanos (MANGES *et al.*, 2019). Dentre essas infecções em animais estão: septicemias, infecções urinárias e de trato reprodutivo, infecções mamárias e meningites (GYLES & FAIRBROTHER, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2016). Embora façam parte da microbiota intestinal de animais e humanos, as ExPECs são filogeneticamente distintas de *E. coli* intestinais e comensais (RIBEIRO *et al.*, 2016). Diferentemente de ETEC, EPEC e STEC, que possuem fatores de virulência específicos e que são empregados para diferenciar os diferentes patótipos intestinais, as ExPECs possuem uma grande quantidade de fatores de virulência e os mesmos podem variar dentro de cepas de cada patótipo, sendo que poucos fatores podem ser ditos exclusivos de um dado patótipo de ExPEC (GYLES & FAIRBROTHER, 2010). Dentre essa gama de fatores de virulência se destacam proteínas associadas à adesão, toxicidade, evasão do sistema imune do hospedeiro, sistemas de captação de ferro, resistência antimicrobiana e formação de biofilme.

Embora historicamente as espécies bacterianas Gram-positivas tenham sido vinculadas à multirresistência, na última década a aquisição de genes de resistência em Gram-negativas têm se difundido mundialmente. Algumas linhagens de ExPEC têm se destacado por apresentarem genes que conferem multirresistência a antimicrobianos, como o clone pandêmico ST131 (*sequence type* 131). Essa linhagem de *E. coli* está envolvida mundialmente em infecções urinárias e septicemias, especialmente em humanos (TOTSIKA *et al.*, 2011) e infecções urinárias em cães e gatos (POMBA *et al.*, 2013). Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO) publicou um relatório demonstrando a distribuição mundial de clones de *E. coli* resistentes à terceira geração de cefalosporinas (conferida pela produção da enzima ESBLs (*extended spectrum beta-lactamases*) e à fluoroquinolonas (conferida por mutações genéticas) (ANTIMICROBIAL..., 2014). Destaca-se que ambas as drogas antimicrobianas são amplamente utilizadas na medicina humana e animal.

#### 3.1.1 *E. coli* endometrial patogênica

O patótipo EnPEC faz parte do grupo das ExPECs e se caracteriza por cepas de *E. coli* com capacidade de causar enfermidades uterinas, como a piometra em animais de companhia. A caracterização da patogenia, ou seja, os mecanismos utilizados por esse patótipo para causar infecções endometriais ainda são pouco descritos. *E. coli* é um habitante natural da microbiota vaginal de animais de companhia e pode ascender ao útero durante a fase de estro (WATTS *et al.*, 1996), fase esta em que a cérvix se

encontra aberta. Visto que o trato reprodutivo das fêmeas é anatomicamente muito próximo do trato urinário e trato intestinal, estudos anteriores propõem que a ascensão de *E. coli* pode ocorrer de infecções urinárias ou então de *E. coli* comensais habitantes do intestino (FRANSSON & RAGLE, 2003; HAGMAN & KÜHN, 2002).

Isolados de EnPECs de piometra canina têm sido filogeneticamente classificados dentro do filo-grupo B2 (MATEUS *et al.*, 2013). Neste estudo, Mateus *et al.* (2013) demonstraram que cepas pertencentes ao filo-grupo B2 foram as que obtinham maior número de fatores de virulência. Visto que o filo-grupo B2 abrange a maioria dos isolados de *E. coli* extraintestinais patogênicas (PICARD *et al.*, 1999), esses dados ressaltam a proximidade de EnPECs com a maioria das ExPEC.

Através de ensaios de PFGE (*Pulsed-field Gel Electrophoresis*), é sugerido que *E. coli* isoladas de piometra não são clones epidêmicos, ou seja, não apresentam parentesco genético entre si (HAGMAN & KÜHN, 2002; MALUTA *et al.*, 2014). No entanto, levando em conta a baixa robustez dos resultados por PFGE, espera-se que estes dados ainda sejam confirmados ou refutados por métodos mais fidedignos, como análises filogenéticas, filogenômicas e MLST (*Multilocus Sequence Typing*).

A ocorrência simultânea de cistite e piometra em animais de companhia é descrita como frequente (GYLES & FAIRBROTHER, 2010). Isolados de EnPEC e UPEC de animais com coinfeção pertencem ao mesmo clone, evidenciado pelo uso de enzima de restrição e PPGE (HAGMAN & KÜHN, 2002). A similaridade entre os patotipos EnPEC e UPEC se deve à ascensão de isolados da microbiota vaginal ou intestinal do hospedeiro em ambos os casos de infecção (SANDHOLM *et al.*, 1975). Por esses motivos, a virulência de EnPECs foi por alguns anos associada a fatores de virulência de UPECs. No entanto, com o advento do sequenciamento de DNA em ampla escala, espera-se que análises mais detalhadas a nível genômico elucidem a verdadeira relação (se existente) entre os fatores de virulência de EnPEC e UPEC.

O uso da técnica de PCR tem sido empregado para a busca de genes de virulência em EnPECs. Fatores de virulência característicos de UPECs são encontrados com maior prevalência em isolados de piometra em comparação com isolados de fezes de animais saudáveis (CHEN *et al.*, 2003; SIQUEIRA *et al.*, 2009; MATEUS *et al.*, 2013). Dentre os fatores de virulência associados à UPECs, e identificados em isolados de EnPEC, estão descritos genes codificantes para: i) fímbrias, como *fim* (*Type 1 fimbriae*), *pap* (*P fimbriae*) e *sfa* (*S fimbriae*); ii) citotoxinas, como *cnfI* (*cytotoxic necrotizing fator*) e *hlyA* (*alfa hemolysin*); e iii) sistemas de captação de ferro (aerobactina, enterobactina, salmochelina e yersiniabactina) (CHEN *et al.*, 2003;

COGGAN *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2009; MATEUS *et al.*, 2013; MALUTA *et al.*, 2014).

A adesão ao tecido-alvo é o primeiro mecanismo utilizado por enterobactérias para causar infecção. Para tanto, genes codificantes para fímbrias e adesinas são fatores de virulência cruciais para o desenvolvimento de enfermidades. *E. coli* é capaz de se aderir a receptores no endométrio sob efeito de progesterona (SANDHOLM *et al.*, 1975), e três fímbrias características de UPECs têm sido relacionadas ao mecanismo de adesão dessa espécie bacteriana no ambiente uterino: *fim*, *pap* e *sfa* (KREKELER *et al.*, 2013). EnPECs isoladas de piometra são capazes de compensar a perda de dois dos três genes fimbriais (*fim*, *pap* e *sfa*), sendo necessária a ausência dos três genes, ao mesmo tempo, para diminuir a adesão de *E. coli* no endométrio (KREKELER *et al.*, 2013).

Estudos anteriores demonstram que genes da família *fim* são os mais prevalentes em EnPECs (CHEN *et al.*, 2003; MATEUS *et al.*, 2013; MALUTA *et al.*, 2014). Curiosamente, as fímbrias do tipo I são também um dos principais fatores de virulência do clone pandêmico ST131 (TOTSIKA *et al.*, 2011). Além disso, os genes *pap* e *sfa* têm sido descritos em EnPEC com uma frequência entre 30 e 57%; e 35 e 58% dos isolados respectivamente (CHEN *et al.*, 2003; COGGAN *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2009; MATEUS *et al.*, 2013; MALUTA *et al.*, 2014). Os genes *pap* são muito frequentes em ExPECs, cujos produtos além de contribuírem na adesão, auxiliam na evasão do sistema imune do hospedeiro e produção de resposta inflamatória severa (JOHNSON *et al.*, 2001). As fímbrias S (*sfa*) além de estarem envolvidas na adesão em infecções de trato urinário, têm sido descritas em *E. coli* causadoras de meningites (NMEC) (PARKKINEN *et al.*, 1988; HACKER *et al.*, 1993).

A produção de toxinas citotóxicas permite a invasão de *E. coli* no útero. Embora estudos *in vitro* ainda não tenham sido realizados, genes codificantes para a toxina CNF1 foram encontrados em isolados de *E. coli* de piometra com frequência de 40 a 57% (CHEN *et al.*, 2003; COGGAN *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2009; MATEUS *et al.*, 2013). As toxinas CNF, além de causarem dano tecidual, estão vinculadas à inibição de fagocitose por células polimorfonucleadas e também à capacidade hemolítica da bactéria (GYLES & FAIRBROTHER, 2010). Hemolisinas, tal como a HlyA, também parecem ter papel importante na patogenicidade de EnPEC, sendo seu gene codificante detectado em torno de 30 a 48% dos isolados (CHEN *et al.*, 2003; COGGAN *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2009; MATEUS *et al.*, 2013; MALUTA *et al.*, 2014).

A aquisição de ferro é vital para a manutenção do metabolismo de *E. coli* durante a infecção, especialmente extraintestinal. Sistemas de captação de ferro por



sideróforos, tais como aerobactina, enterobactina, salmochelina e yersiniabactina são amplamente difundidos em ExPECs. Estudos anteriores demonstram a ampla distribuição de genes associados ao sistema yersiniabactina (MATEUS *et al.*, 2013; MALUTA *et al.*, 2014), enquanto os associados ao sistema aerobactina parecem ter pouca importância dentre os isolados EnPEC (CHEN *et al.*, 2003; COGGAN *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2009).

Além desses acima citados, outros fatores de virulência também já foram descritos em EnPEC. O gene *usp*, identificado em 39% (MALUTA *et al.*, 2014) e 55% (MATEUS *et al.*, 2013) dos isolados EnPEC, codifica uma colicina (PARRET & DE MOT, 2002) e é mais comumente encontrado em isolados UPEC do que em isolados de *E. coli* fecais (YAMAMOTO *et al.*, 2001). As colicinas são bacteriocinas produzidas em situações de estresse por *E. coli* e outros gêneros das *Enterobacteriaceae* a fim de impedir o crescimento de bactérias vizinhas (CURSINO *et al.*, 2002). Além do gene *usp*, o gene *cvaC*, precursor da Colicina V, foi encontrado na frequência de 17,4% de isolados EnPEC (MALUTA *et al.*, 2014).

Os genes de virulência de UPECs normalmente se encontram em ilhas de patogenicidade, denominadas PAIs (*pathogenic islands*) (GYLES & FAIRBROTHER, 2010). Algumas PAIs, tais como IV<sub>536</sub> e ICFT073, são mais prevalentes em isolados de EnPEC em comparação com isolados de UPEC e *E. coli* de origem fecal (MATEUS *et al.*, 2013). A ilha PAI IV<sub>536</sub> contém genes pertencentes ao sistema de captação de ferro pelo sistema yersiniabactina. Já a ilha PAI ICFT073 contém genes que codificam fímbria P (gene *pap*), alfa hemolisina (gene *hlyA*) e sideróforo aerobactina (MATEUS *et al.*, 2013).

#### **4 ARTIGO**

Neste item são apresentados os resultados obtidos no presente estudo.

## **Características genéticas de *Escherichia coli* endometrial patogênica: ampliando o conhecimento sobre a patogênese deste patotipo**

### **Resumo**

*Escherichia coli* endometrial patogênica (EnPEC), agente bacteriano mais comumente isolado de piometra em animais de companhia, é o patotipo menos estudado dentre o grupo de *E. coli* extraintestinais patogênicas (ExPEC). Sendo assim, o objetivo desse estudo é caracterizar compreensivamente o perfil de virulência de isolados EnPEC, aumentando os conhecimentos sobre esse patotipo. Para isso, o primeiro genoma de EnPEC (*E. coli*\_LBV005/17) foi sequenciado e a técnica de PCR foi empregada para a busca de genes de virulência em 45 isolados EnPEC. Além disso, o perfil de susceptibilidade dos 45 isolados foi determinado usando a técnica de disco-difusão em ágar. Interessantemente, o isolado *E. coli*\_LBV005/17 foi classificado como *E. coli* ST131. Tanto o isolado *E. coli*\_LBV005/17, quanto a maioria dos isolados EnPEC foram incluídos no filo-grupo B2 de Clermont. Dentre os resultados do perfil de virulência dos 45 isolados testados, podemos destacar o gene *fimA*, como o mais frequente relacionado à adesão (98%); a presença dos genes codificantes de toxinas *artA* e *cdtA*, nunca relatados em isolados EnPEC anteriormente; e a ampla distribuição do sistema de captação de ferro por enterobactina. Apenas cinco dos 45 isolados (11%) exibiram resistência antimicrobiana múltipla *in vitro*. Por fim, o perfil de virulência dos 45 isolados EnPEC e a análise do genoma lançam alguns esclarecimentos e destacam o potencial patogênico do patotipo EnPEC.

**Palavras-chave:** EnPEC, piometra, pequenos animais, fatores de virulência, sequenciamento genômico

### **Introdução**

Patotipos pertencentes às *E. coli* extraintestinais patogênicas (ExPEC) são geneticamente distintos (SMITH *et al.*, 2007), sendo alguns fatores de virulência mais específicos de certos grupos de ExPEC, como os plasmídeos Tsh e ColV em APECs (*Avian Pathogenic E. coli*), cápsula K1 em NMEC (*Neonatal meningitis-causing E. coli*), e Sat e Usp em UPECs (*Uropathogenic E. coli*). Isolados ExPEC carregam genes de virulência específicos que conferem seu potencial patogênico (CYOIA *et al.*, 2015) e estão envolvidos nos principais mecanismos de patogenicidade desses grupos. Nesse

contexto, as adesinas são pré-requisitos para adesão e sucesso da colonização bacteriana, as toxinas são responsáveis pelo dano tecidual das células hospedeiras, e os sistemas de captação de ferro permitem a colonização, ajudando as bactérias a persistirem no local de infecção (ALIZADE *et al.*, 2014).

Isolados de *E. coli* endometrial patogênica (EnPEC) estão envolvidos em infecções endometriais de animais e humanos, sendo o agente bacteriano mais frequentemente isolado de piometra canina e felina. No entanto, o patotipo EnPEC, que pertence ao grupo ExPEC, é o menos estudado dentre os patotipos desse grupo. A piometra em animais de companhia evolui rapidamente e em alguns casos leva o animal à morte por choque séptico. Portanto, a remoção cirúrgica imediata do útero, afim de sessar o foco de infecção, é o tratamento preconizado.

Embora *E. coli* seja um agente infeccioso muito agressivo em infecções endometriais, evidenciado por ensaios de imunohistoquímica (dados não publicados), a patogenicidade dos isolados de EnPEC ainda é pouco compreendida. De acordo com as principais teorias, *E. coli* isoladas de piometra originam-se da microbiota intestinal e possuem genes normalmente encontrados em isolados de UPEC (MATEUS *et al.*, 2013). No entanto, outros fatores de virulência ainda não investigados em ExPECs podem ter papel significativo na patogênese desse patotipo. Tendo em vista esses aspectos, o objetivo desse estudo é caracterizar o perfil virulento de isolados EnPEC provenientes de piometra de animais de companhia, aprimorando os conhecimentos desse patotipo.

## **Materiais e métodos**

### **I. Obtenção dos isolados EnPEC**

Cepas EnPEC previamente isoladas de conteúdo purulento intrauterino de animais de companhia (cadelas e gatas) diagnosticados com piometra foram analisadas nesse estudo. Os isolados foram reinoculados em ágar sangue ovino 5% e incubados a 37°C por 24h, sendo 46 isolados recuperados. Três a quatro colônias desses isolados foram coletadas e armazenadas em água ultrapura, e em seguida submetidas à termoextração de DNA.

## II. Sequenciamento e análise do genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17

O DNA total de um dos isolados EnPEC (*E. coli*\_LBV005/17) foi extraído utilizando brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) com adição de fenol:clorofórmio. O DNA extraído foi analisado qualitativamente e quantitativamente utilizando os equipamentos NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, MA) e Qubit™ (Life Technologies, Grand Island, NY), respectivamente. A biblioteca de DNA foi preparada utilizando o Sistema Illumina® MiSeq System (2 × 250 *paired-end* com o kit Illumina v2 (Illumina®, San Diego, CA, USA) para gerar *reads* finais com 150 pb de acordo com o protocolo do fabricante.

As *reads* geradas foram importadas para o *software* Geneious (versão 9.1.5) e trimadas. A montagem *de novo* do genoma foi então realizada utilizando SPAdes 3.9.0 (NURK *et al.*, 2013). Já a identificação das sequências codificadoras (CDS) foi com base no conjunto de proteínas de referência depositadas no banco de dados do NCBI (*Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAAP)). Os *contigs* gerados foram submetidos à análise de MLST (*Multilocus Sequence Typing*) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>).

A análise de sorotipos e subtipos *fimH* foram realizadas usando SerotypeFinder 1.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>) e FimTyper 1.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/FimTyper/>), respectivamente. Os genes de virulência foram detectados utilizando o VirulenceFinder 1.5 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>), enquanto os genes de resistência a antimicrobianos foram buscados usando ResFinder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). O PlasmidFinder 1.3 (<https://cge.cbs.dtu.dk//services/PlasmidFinder/>) foi utilizado para detecção *in silico* de plasmídeos dentre as sequências geradas. Os dados detalhados do genoma montado foram analisados usando o *software* Geneious v 9.1.8 (<https://www.geneious.com>).

## III. Caracterização molecular dos isolados de EnPEC

A atribuição dos grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F e *Escherichia* clado I) aos 45 isolados de EnPEC foi realizada empregando o método de PCR *multiplex* descrito por Clermont *et al.* (2013). Para caracterizar o perfil de virulência dos 45 isolados, 21 genes de virulência foram selecionados levando em conta o perfil de virulência do genoma analisado (isolado *E. coli*\_LBV005/17). Dentre esses genes, cinco codificantes para adesinas (*papC*, *F17*, *fimA*, *sfa* e *iha*); seis codificantes para sistemas

de captação de ferro (*irp1*, *entB*, *iutA*, *iucD*, *iucC* e *iroN*); cinco codificantes para toxinas (*artA*, *cdtA*, *cnf1*, *hlyA* e *hlyE*); um codificante para evasão do sistema imune (*iss*); um codificante para bacteriocina (*usp*); e três relacionados à formação de biofilme (*bssS*, *bssR* e *hmsP*). As sequências dos *primers* (Tabela Suplementar 1 – Anexo A) para esses genes de virulência foram desenhadas usando o *software* Vector NTI Express Designer (Invitrogen®).

A técnica de PCR convencional foi então empregada para a busca dos 21 genes de virulência nos 46 isolados EnPEC. A reação de PCR incluiu: 1 U de Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen®), 10X do Buffer Taq DNA Recombinante, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 10 pmol de cada *primer* e 10 ng de DNA previamente extraído por ebulição. As condições de ciclo das PCRs foram padronizadas conforme a especificidade de cada *primer*. Em resumo, as fases dos ciclos foram: 1 ciclo a 94°C por 5 minutos seguido por 35 ciclos de 94°C por 35 segundos; temperatura de anelamento conforme Tabela Suplementar 1 - Anexo A por 35 segundos; e extensão final a 72°C por 40 segundos. O DNA do isolado *E. coli*\_LBV005/17 foi utilizado como controle positivo das reações.

#### **IV. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos**

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinado nos 45 isolados, usando a técnica de disco-difusão em ágar de acordo com as recomendações do CLSI (2018). Os antimicrobianos testados pertencem às seguintes classes: aminoglicosídeos (amicacina 30 µg, gentamicina 10 µg e tobramicina 10 µg); beta-lactâmicos (amoxicilina + ácido clavulânico 30 µg, ampicilina 10 µg, cefalexina 30 µg e cefoxitina 30 µg); cefalosporinas (ceftazidima 30 µg); fluoroquinolonas (norfloxacina 10 µg e ofloxacina 05 µg); macrolídeos (azitromicina 15 µg e eritromicina 15 µg); nitrofuranos (nitrofurantoína 300 µg); quinolonas (ciprofloxacina 05 µg); tetraciclina (tetraciclina 30 µg e doxiciclina 30 µg); além dos antimicrobianos: ácido nalidíxico 30 µg, rifampicina 05 µg, e sulfametoxazol + trimetoprima 25 µg. Os valores de diâmetro dos halos para a interpretação de susceptibilidade e resistência dos isolados foram de acordo com as referências do CLSI – VET08 (2018) e BrCAST (2019). Os isolados *E. coli* ATCC 25922 e ATCC 35218 foram usados como controle.

## Resultados e discussão

### I. Características do genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17

O isolado *E. coli*\_LBV005/17 foi aleatoriamente selecionado para o sequenciamento do genoma, sendo a montagem das *reads* realizada posteriormente. O genoma completo da cepa *E. coli*\_LBV005/17 gerou 278 *contigs* e um plasmídeo circular (pR005), os quais foram depositados no banco de dados do GenBank (DDBJ/ENA/GenBank) com o número de acesso QLNJ000000000. A versão descrita nesse artigo é a primeira versão do genoma. A sequência cromossomal do isolado *E. coli*\_LBV005/17 possui 4.950.472 pb de comprimento e um total de conteúdo C+G igual a 50,7%. Os *contigs* montados apresentaram uma média de 17.808 pb de comprimento e foram anotados e refinados pelo NCBI *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAAP), seguido de uma anotação manual para o refinamento dos dados gerados automaticamente.

Um total de 5.151 genes foram identificados, 18 deles codificantes de RNA ribossomal (rRNA) 5S, 16S e 23S; 78 genes codificantes de RNA transportador (tRNA) e 300 pseudo-genes. Dentre os 5.050 potenciais genes codificantes de proteínas, 87,6% codificam proteínas com função atribuída e 12,4% deles codificam proteínas hipotéticas. Além disso, 20 cópias gênicas de transposases, a maioria delas truncadas e inativadas, com múltiplas mutações por mudança de fase de leitura, foram mapeadas no genoma. O plasmídeo pR005, montado e anotado, possui 51,9% de conteúdo C+G e 139.415 pb de tamanho, com 175 genes codificantes de proteínas e 102 proteínas hipotéticas anotadas.

Os *contigs* gerados foram submetidos à análise *in silico*. Em suma, de acordo com a análise *in silico* do MLST, o isolado EnPEC *E. coli*\_LBV005/17 pertence ao ST131, um clone ExPEC pandêmico considerado um importante veiculador do aumento de resistência antimicrobiana em *E. coli*. Além disso, com base na classificação *in silico* do *software* ClermonTyping, a cepa *E. coli*\_LBV005/17 foi incluída no filo-grupo patogênico B2. A análise de sorotipo e subtipo *fimH* revelou o perfil 025:H4-*fimH*298. Os genes de virulência *cnf1* (*cytotoxic necrotizing factor*), *gad* (*glutamate decarboxylase*) e *iss* (*increased serum survival*) foram detectados no cromossomo pela busca no VirulenceFinder. Enquanto no plasmídeo, a mesma ferramenta de busca detectou o gene codificante da enterotoxina *senB* (*subtilase cytotoxin subunit B*).

A existência de genes de resistência a antimicrobianos (Tabela 1) foi prevista pelo ResFinder com identidade de 95% para identificação desses genes. O gene *mdfA*,

responsável por conferir ampla gama de resistência a macrolídeos, lincosamida e estreptogramina B, foi identificado no cromossomo. Ademais, o *software* identificou mutações gênicas que conferem resistência à quinolonas e fluoroquinolonas - *parE* p.I529L e *gyrA* p.S83L, respectivamente. No plasmídeo pR005, o ResFinder encontrou, com 100% de identidade, genes relacionados a resistência a sulfas (*sul1* e *sul2*), tetraciclina (*tet(A)*), aminoglicosídeos (*aac(3)-IId*, *aadA5*, *aph(3'')-Ib*, e *aph(6)-Id*), trimetoprim (*dfrA17*), macrolídeos (*mph(A)*) e betalactâmicos (*blaTEM-198*).

Adicionalmente, na análise manual do genoma de *E. coli*\_LBV005/17 uma ampla gama de sistemas e famílias gênicas sabidamente envolvidas na habilidade de resistência antimicrobiana foram identificadas (Tabela 1), como o *operon* *mdt* (*mdtA*, *mdtB*, *mdtC*, *mdtE*, *mdtG*, *mdtH*, *mdtJ*, *mdtK*, *mdtL*, *mdtN*, *mdtO* e *mdtQ*); sistema *mar* (*marB* e *marR*); *mdfA*; *emrD*; *emrA*; *acrZ* e *bla<sub>EC</sub>*. Muitos genes associados a transportadores de efluxo de diversos antimicrobianos também foram encontrados (transportadores MFS, RND, ABC e SMR). Essa variedade de genes confere resistência a muitos antibióticos, como fluoroquinolonas, tetraciclina, penicilinas, aminoglicosídeos, cefalosporinas, fosfomicina, novobiocina, rifampicina, cloranfenicol, ácido nalidíxico e trimetoprim. Além disso, genes relacionados à resistência à amônia quaternária (*qacE*), tunicamicina (DPC53\_00240), trimetoprim (*dfrA*), aminoglicosídeos (*aph(6)-I* / DPC53\_00305), betalactâmicos (DPC53\_00200), tetraciclina (DPC53\_00285) e sulfonamida (DPC53\_00310) foram encontrados no plasmídeo pR005.

Os sistemas toxina-antitoxina (TA) são carregados por espécies bacterianas a fim de manter o controle do crescimento celular e morte em condições de estresse. O genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17 carrega 12 sistemas TA, nomeados de acordo com o BLASTn em: BrnT/BrnA, GhoT/OrtT, HigB/HigA, HipA/HipB, Hok/Sok, Ibs-Sib, Ldr/Rdl, PrlF/YhaV, RelE/ParE, Txe/YoeB, YeeU-CbtA e Ykfl-YafW (Tabela Suplementar 2 – Anexo B). Apenas um sistema TA-plasmidial (CcdA/CcdB) foi encontrado no genoma do isolado estudado. Interessantemente, dentre os 13 sistemas citados, três (HipA/HipB, RelE/ParE e YeeU-CbtA) chamam a atenção pela ampla quantidade de cópias gênicas.

O sistema HipA/HipB possui quatro cópias gênicas no genoma de *E. coli*\_LBV005/17. Estudos demonstram que o gene *hipA* codifica uma serina kinase que tem importante papel na modulação de formação de biofilme (LI *et al.*, 2013) e tolerância a múltiplos antimicrobianos em isolados UPEC (SCHUMACKER *et al.*,



2015). A presença desse sistema TA pode ser associada aos mecanismos de resistência antimicrobiana do isolado *E. coli*\_LBV005/17, que é classificado como *E. coli* ST131, um clone multirresistente.

O genoma estudado também possui seis cópias gênicas do sistema RelE/ParE. A toxina ParE funciona como inibidora da ação da enzima girase de *E. coli* e consequentemente interrompe o crescimento celular (JIANG *et al.*, 2002), além de conferir resistência às quinolonas (ELLINGTON & WOODFORD, 2006). Igualmente, seis cópias gênicas do sistema YeeU–CbtA foram identificadas. A função tóxica desse sistema é relacionada à inibição de proteínas do citoesqueleto de *E. coli* (TAN *et al.*, 2011).

Os principais mecanismos relacionados à habilidade patogênica de ExPECs foram identificados no genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17 (Tabela 1). O genoma exibe um perfil de virulência de grande potencial, com genes relacionados aos mecanismos de: *i*) adesão às superfícies; *ii*) produção de toxinas; *iii*) sistemas de captação de ferro; *iv*) evasão das defesas imunológicas do hospedeiro; *v*) produção de bacteriocina; *vi*) produção de biofilme; e *vii*) invasão às células do hospedeiro.

O aparato de adesão de *E. coli*\_LBV005/17 inclui um grande número de genes codificantes de proteínas fimbriais, como: fímbria do tipo I (*fimA* e *fimH*), fímbria P (*papE*, *papH*, *papC*, *papD*, *papG* e *papJ*), fímbria Yad (*yadN*), fímbria F17, StaD, StaF, StaE, SteE, StfD, *yfcV*, *intimin-like adhesin* FdeC, *minor fimbrial protein* prsF, e as famílias fimbriais: *papC/fimD*, *TcfC*, *Cb1D* e *C1*. Os genes codificantes de fímbrias e adesinas identificadas em *E. coli*\_LBV005/17, são também observados em InPECs e ExPECs.

Muitos patotipos de *E. coli* empregam mecanismos de inibição de crescimento de bactérias vizinhas. Um mecanismo amplamente difundido é o *contact-dependent growth inhibition* (CDI). O isolado *E. coli*\_LBV005/17 possui o gene *cdiA* (*contact-dependent inhibitor A*), pertencente ao sistema CDI. A proteína CdiA, também nomeada hemolisina ShlA, é uma subunidade da proteína CdiB/CdiA *two-partner secretion* (TPS), que exporta e projeta a região C terminal de CdiA (CdiA-CT) para dentro do periplasma de células vizinhas (RUHE *et al.*, 2018). A estrutura de CdiA-CT é muito variável, o que explica distintas atividades tóxicas entre as bactérias (BARTELLI *et al.*, 2019). Além disso, o genoma estudado contém um gene relacionado à codificação da colicina V. A colicina V é uma bacteriocina produzida por isolados de *E. coli* que inibe o crescimento bacteriano pela ruptura do potencial de membrana de bactérias próximas (MCCORMICK *et al.*, 1999) e consequentemente permite a manutenção de *E. coli* no

meio ou ambiente. O gene codificante para essa colicina (*cvaC*) já foi descrito na frequência de 17,4% em isolados EnPEC (MALUTA *et al.*, 2014).

O genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17 carrega genes cromossomais que codificam as toxinas *cytotoxic necrotizing factor 1* (*cnf1*) e a *cytolethal distending toxin* (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*). A CNF1 é amplamente conhecida como uma toxina típica secretada por um terço dos isolados de UPEC (TOTSIKA *et al.*, 2012) e anteriormente descrita em isolados EnPEC (CHEN *et al.*, 2003; MALUTA *et al.*, 2014). Já a toxina CDT, encontrada em isolados de *E. coli* provenientes de humanos com infecções intestinais, sepse e infecção urinária (HINENOYA *et al.*, 2017), tem atividade de DNase e leva as células epiteliais à morte por distensão nuclear e citoplasmática, e parada do ciclo celular (MEZA-SEGURA *et al.*, 2017).

Além disso, o genoma estudado carrega um gene plasmidial codificante da toxina ArtA, uma ADP-ribosiltransferase homóloga à toxina pertussis (Ptx), identificada em *Salmonella* Typhimurium (MILLER & WIEDMANN, 2016). O mecanismo tóxico do sistema ArtA/ArtB ainda é pouco conhecido. Estudos preliminares indicam que a subunidade A da toxina, como a subunidade S1 da Ptx, tem habilidade de induzir modificação das proteínas G no ovário de hamsters chineses (UCHIDA *et al.*, 2009), enquanto a subunidade B se conecta a glicanas com terminações de ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), que é expresso em células de mamíferos não-humanos (GAO *et al.*, 2017). Ademais, os genes *artA* e *artB* têm sido detectados no genoma da maioria dos sorotipos não tifoides de *Salmonella* (MILLER & WIEDMANN, 2016).

Embora não tenha sido identificado pelo *screening* manual do genoma, a busca pelo VirulenceFinder revelou a presença do gene *senB* no plasmídeo pR005. O gene *sen* está presente em plasmídeos de isolados UPEC (DEBROY *et al.*, 2010), EIEC e *Shigella* sp. (NATARO *et al.*, 1995). A função da enterotoxina TieB codificada por esse gene ainda não é bem esclarecida, porém a deleção do gene *sen* diminui a atividade enterotóxica *in vitro* de isolados EIEC, demonstrando possível importância dessa toxina na patogenicidade desse patótipo (NATARO *et al.*, 1995).

O isolado EnPEC estudado tem três diferentes famílias de hemolisinas (Tabela 1). Contrário ao descrito por Hunt *et al.* (2010) que sugeriram que isolados de *E. coli* que possuem hemolisina A (HlyA) não possuem hemolisina E (HlyE), e vice-versa, o genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17 carrega ambos os genes (*hlyA* e *hlyE*). A hemolisina E, também conhecida como citolisina A (ClyA), induz lise de eritrócitos além de demonstrar habilidade citotóxica e apoptótica em macrófagos de humanos e roedores (LAI *et al.*, 2000). Ludwig *et al.* (2004) identificaram hemolisina E em

isolados STEC, EIEC, EAEC e ETEC. Em contrapartida, os mesmos autores demonstraram que isolados UPEC, NMEC e EPEC são incapazes de produzir hemolisina E funcional (LUDWIG *et al.*, 2004).

O gene *shlA*, codificante da hemolisina ShlA também foi identificado. A família ShlB/FhaC/HecB é um complexo que ativa a hemolisina ShlA (nomeada no genoma estudado como *contact-dependent inhibitor A – CdiA*), uma toxina formadora de poros, que além de atividade hemolítica, promove efluxo de potássio e esgotamento de ATP em células epiteliais e fibroblastos (HERTLE *et al.*, 1999). Estudos prévios demonstram que a proteína ShlA promove atividade invasiva de *Serratia marcescens*, induzindo processo autofágico e vacuolização de células epiteliais (DI VENANZIO *et al.*, 2014). Levando em consideração a presença desse gene no genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17 e o potencial invasivo dos isolados EnPEC, observado por ensaios de imunohistoquímica (dados não publicados), podemos inferir que a invasão às células do hospedeiro é um importante fator de virulência de isolados EnPEC.

Finalmente, a presença da família de hemolisina III (*hly-III*) foi observada no genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17. A hemolisina *hlyIII* é também uma hemolisina formadora de poros que faz parte do aparato de virulência de *Bacillus cereus* (BAIDA & KUZMIN, 1995), no entanto não há estudos elucidando seu mecanismo de ação.

A presença de dois sistemas de captação de ferro por sideróforos (enterobactina e yersiniabactina) no genoma analisado sugere que diferentes mecanismos para a captação de ferro são necessários para o crescimento e desenvolvimento de *E. coli* durante a infecção uterina. Ambos os sistemas são amplamente difundidos em isolados UPEC e têm papel importante na manutenção de *E. coli* na bexiga (WILES *et al.*, 2008). Os genes requeridos para a montagem do sistema yersiniabactina (PERRY & FETHERSON, 2011) estão presentes no genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17, conferindo as seguintes funções: *i*) síntese de yersiniabactina (*ybtA*, *ybtS*, *ybtE*, *ybtT*, *ybtU*, *irp1* e *irp2*); *ii*) transporte e captura (*ybtP* e *ybtQ*); e *iii*) regulação da transcrição gênica deste aparato (*ybtA*). Além da função de captação de ferro, resultados recentes descrevem que isolados UPEC podem utilizar o sistema yersiniabactina para a aquisição de cobre (KOH *et al.*, 2017) e níquel (ROBINSON *et al.*, 2018). Finalmente, os componentes para a síntese (*entB*, *entC*, *entD*, *entF* e *entH*), transporte (*entS*) e utilização de ferro (*fes*) do sistema enterobactina também foram encontrados no genoma de *E. coli*\_LBV005/17.

Avaliando os genes relacionados à sobrevivência da bactéria contra o sistema imune do hospedeiro, o gene *brkB*, do qual o produto codificado é uma proteína

formadora de poros associada à evasão do sistema imune de *Bordetella pertussis* (FERNANDEZ & WEISS, 1994), foi identificado no genoma analisado. Outro importante gene presente é o *increase serum survival (iss)*, que é associado com atividade anti-complemento de *E. coli*. Alguns isolados ExPEC (UPEC, NMEC e APEC) comumente carregam o gene *iss* no genoma, sendo a proteína codificada importante na virulência desses patótipos (JOHNSON *et al.*, 2008). Portanto, podemos sugerir que as proteínas BrkA e Iss podem executar atividade principal na manutenção de *E. coli* após a invasão tecidual, auxiliando na evasão das defesas humorais do hospedeiro.

O sequenciamento do genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17 também demonstrou a presença de genes que sugerem potencial para a formação de biofilme (*bssR*, *bssS*, and *hmsP*). Em relação à função predita para os produtos gênicos, BssR e BssS estão envolvidos na regulação de biofilme por influenciar na sinalização celular e regulação de motilidade em isolados de *E. coli* K-12 (DOMKA, 2006). Já o domínio HmsP parece estar envolvido na regulação do desenvolvimento de biofilme e resistência a antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* (DIEGEMANS *et al.*, 2018). Associado à identificação de *hipA* (sistema TA HipA/HipB) envolvida na regulação da formação de biofilme, podemos inferir um alto potencial de formação de biofilme para este isolado bacteriano.

Embora *E. coli* tenha condições ótimas de crescimento em ambientes com pH neutro, o genoma dessa espécie bacteriana pode carrear genes, dos quais os produtos gênicos conferem resistência em condições ácidas. O isolado EnPEC analisado nesse estudo possui o mais efetivo sistema de resistência a ácidos (AR), nomeado como *glutamic acid-dependent system (AR2)* (CASTANIE-CORNET *et al.*, 2007). Esse sistema tem um papel muito importante em isolados STEC, como nos sorotipos *E. coli* O157:H7 (GYLES & FAIRBROTHER, 2010). Em suma, o mecanismo de neutralização de pH depende dos genes codificantes de glutamato descarboxilase (*gad*), *cAMP-activated global transcriptional regulator CRP*, *DNA-binding protein H-NS*, ativador de transcrição GadX e o regulador da transcrição gênica GadE (Tabela 1).

Finalmente, um fator de virulência identificado no genoma EnPEC chama atenção - o sistema de secreção do tipo 6 (T6SS). Os genes relacionados à função estrutural do aparato de secreção bacteriana estão presentes no genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17 (Tabela Suplementar 3 – Anexo C). O sistema T6SS é o sistema de secreção mais recentemente descrito em bactérias (MOUGOUS *et al.*, 2006). O mecanismo de ação do T6SS é vinculado à translocação de proteínas para outras células,

incluindo células eucarióticas ou outras células bacterianas (RUSSEL *et al.*, 2011), contribuindo com a virulência de algumas bactérias patogênicas e manutenção no meio ou ambiente.

**Tabela 1** – Genes associados à virulência do genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17

Genoma	
Fator de virulência	Gene/locus tag*
Adesão às superfícies	<i>fimA</i> /DPC53_22525, DPC53_01185, DPC53_25400, DPC53_01205, DPC53_01180, DPC53_26520, DPC53_01195, DPC53_01215, DPC53_26655, DPC53_18860, DPC53_11760, DPC53_11750, DPC53_24485, DPC53_24495, DPC53_24475, DPC53_22790, DPC53_01210, DPC53_26515, DPC53_26555, DPC53_26525, DPC53_11755
Produção de toxinas	<i>cdtA</i> /DPC53_14520, <i>cdtB</i> /DPC53_14525, <i>cdtC</i> /DPC53_14530, <i>shlA</i> /DPC53_25910, DPC53_25830, DPC53_15795, DPC53_02320, DPC53_25915, DPC53_01050
Resistência no soro	<i>iss</i> /DPC53_14565, DPC53_09810
Produção de biofilme	<i>bssR</i> /DPC53_16170, DPC53_20560, DPC53_05775
Sistemas de captação de ferro	<i>ybtA</i> /DPC53_23080, <i>ybtS</i> /DPC53_20770, <i>ybtE</i> /DPC53_18810, <i>ybtT</i> /DPC53_18805, <i>ybtU</i> /DPC53_18800, <i>irp1</i> /DPC53_23070, <i>irp2</i> /DPC53_23075, <i>ybtP</i> /DPC53_23085, <i>ybtQ</i> /DPC53_20760, <i>ybtA</i> /DPC53_23080, <i>entB</i> /DPC53_05270, <i>entC</i> /DPC53_05260, <i>entD</i> /DPC53_05195, <i>entF</i> /DPC53_05215, <i>entH</i> /DPC53_05280, <i>entS</i> /DPC53_05250, <i>fes</i> /DPC53_05205
Bacteriocinas	DPC53_10040, <i>cdiA</i> /DPC53_25910
Resistência antimicrobiana	<i>mdtK</i> /DPC53_08775, <i>parE</i> /DPC53_23640, <i>mdtA</i> /DPC53_11125, <i>mdtB</i> /DPC53_11130, <i>mdtC</i> /DPC53_11135, <i>mdtE</i> /DPC53_24640, <i>mdtG</i> /DPC53_20595, <i>mdtH</i> /DPC53_07475, <i>mdtJ</i> /DPC53_08080, <i>mdtL</i> /DPC53_20195, <i>mdtN</i> /DPC53_11450, <i>mdtO</i> /DPC53_11445, <i>mdtQ</i> /DPC53_15590, <i>marB</i> /DPC53_19550, <i>marR</i> /DPC53_19560, <i>mdfA</i> /DPC53_16200, <i>emrD</i> /DPC53_13605, <i>emrA</i> /DPC53_17170, <i>acrZ</i> /DPC53_04390, <i>blaEC</i> /DPC53_01360, DPC53_18060, DPC53_09270, DPC53_21290, DPC53_08760, <i>gyrA</i>
Resistência a ácidos	<i>gad</i> /DPC53_01560, <i>gadE</i> /DPC53_24630, <i>gadX</i> /DPC53_26500, DPC53_05445, DPC53_13360
Plasmídeo	
Fator de virulência	Gene (locus tag)*
Produção de toxinas	<i>artA</i> /DPC53_00045, <i>senB</i>
Resistência antimicrobiana	<i>qacE</i> /DPC53_00400, <i>dfrA</i> /DPC53_00410, <i>aph(6)-I</i> /DPC53_00300, <i>aac(3)</i> /DPC53_00215, <i>aadA</i> /DPC53_00405, <i>mph(A)</i> /DPC53_00340, <i>sul1</i> /DPC53_00395, DPC53_00285, DPC53_00240, DPC53_00340, DPC53_00305, DPC53_00310, DPC53_00320, <i>blaTEM198</i>

\* Locus tag de acordo com NCBI. Número de acesso QLNJ00000000

Fonte: Próprio autor.

## II. Caracterização molecular dos isolados EnPEC

De acordo com o método de classificação de filo-grupos de Clermont (CLERMONT *et al.*, 2013), 31 (68,8%) dos isolados foram atribuídos ao filo-grupo B2, seis (13,3%) ao clado I, quatro (8,8%) ao filo-grupo F, e quatro isolados (8,8%) foram classificados como desconhecidos. Resultados anteriores demonstram que isolados EnPEC são classificados, em sua maioria, como membros do filo-grupo B2 (MATEUS *et al.*, 2013), o que vai ao encontro dos nossos resultados. O filo-grupo B2 inclui a maior parte das ExPECs (PICARD *et al.*, 1999), incluindo o clone ST131. Por esse motivo os isolados EnPEC pertencentes a esse filo-grupo normalmente possuem uma ampla gama de genes de virulência (MATEUS *et al.*, 2013).

Os filo-grupos B2 e F são geneticamente relacionados por derivarem de um ancestral comum (CLERMONT *et al.*, 2011) e divergem dos outros filo-grupos que incluem as InPECs. Já o filo-grupo clado críptico I é normalmente encontrado em ExPECs, com prevalência em isolados UPEC em torno de 5 a 6% (IRANPOUR *et al.*, 2015; YAHIAOUI *et al.*, 2015). Esses resultados reforçam a relação filogenética entre isolados EnPEC e ExPEC.

O perfil de potencial virulento dos 45 isolados EnPEC analisados nesse estudo está representado na Figura 1. De acordo com os resultados da técnica de PCR, as frequências dos genes envolvidos na adesão foram: *fimA* (97,7%), *papC* (95,5%), *sfa* (71,1%), *iha* (66,7%) e *f17* (48,8%); genes relacionados à produção de toxinas: *hlyE* (93,3%), *hlyA* (86,7%), *cnf1* (68,8%), *artA* (40%) e *cdtA* (26,7%); genes envolvidos na captação de ferro: *entB* (100%), *irp1* (88,9%), *iroN* (82,2%), *iutA* (57,7%), *iucC* (22,2%) e *iucD* (20%); potencial para evasão do sistema imune: *iss* (88,9%); produção de bacteriocina: *usp* (66,6%); e genes envolvidos na formação de biofilme: *hmsP* (100%), *bssS* (100%) e *bssR* (93,3%).

No geral, o perfil de adesão demonstrou que uma ampla quantidade de adesinas de ExPECs parecem ser importantes para os isolados EnPEC. O gene *fimA* foi o gene associado a adesão mais frequente nesse estudo, seguido por *papC* e *sfa*. A elevada frequência de identificação de *fimA* está de acordo com a análise genômica do isolado *E. coli*\_LBV005/17 (um clone ST131), que apresenta um grande número de cópias do gene *fim*. As fímbrias do tipo I (Fim) representam o fator de virulência melhor caracterizado de *E. coli* ST131, sendo necessário para a colonização desse clone (TOTSIKA *et al.*, 2011). Outros estudos também já demonstraram que *fim* é o gene

relacionado à adesão mais frequentemente identificado em *E. coli* isoladas de piometra (MATEUS *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2003; MALUTA *et al.*, 2014).

A família de fímbrias Pap (*pyelonephritis associated pili*), frequentemente identificada em isolados UPEC (GYLES & FAIRBROTHER, 2010), também apresentou grande ocorrência de identificação dentre os isolados testados. No entanto, a frequência de identificação do gene *papC* foi mais elevada se comparada com estudos prévios em isolados EnPEC (MATEUS *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2003; MALUTA *et al.*, 2014; SIQUEIRA *et al.*, 2009; COGGAN *et al.*, 2008). Além disso, ressaltamos a observação de que 49% dos isolados (Figura 1) carregam genes codificantes da adesina F17, uma proteína importante para a adesão de ETEC e SEPEC causadoras de infecções intestinais e sepses, respectivamente. Em isolados UPEC, a pili F17-like foi descrita, no entanto aparentemente esta fímbria não é capaz de mediar adesão às células uroepiteliais (MARTIN *et al.*, 1997).

A elevada frequência de isolados positivos para os genes codificantes de hemolisinas (87% para *hlyA* e 93% para *hlyE* – Figura 1), indica a importância dessas na patogênese de EnPECs. Esses resultados divergem de outros estudos, que demonstram baixa frequência de identificação de genes *hly* em isolados EnPEC (COGGAN *et al.*, 2008; MATEUS *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2003; MALUTA *et al.*, 2014). No total, 36 (80%) isolados possuem os dois genes (*hlyA* e *hlyE*), sugerindo que a combinação da função dessas duas hemolisinas tem um papel importante na toxicidade EnPEC.

A toxina CNF1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*) também possui ampla e elevada frequência de identificação em isolados EnPEC de estudos realizados anteriormente (COGGAN *et al.*, 2008; MATEUS *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2003). Interessantemente, os genes *artA* e *cdtA*, pela primeira vez descritos em isolados EnPEC, tiveram boa representatividade nos isolados testados do nosso estudo (40% e 27%, respectivamente). O gene *artA* é carregado pelo plasmídeo pR005 do isolado *E. coli*\_LBV005/17, sendo assim, destacamos que o percentual de identificação desse gene pode ser influenciado por possíveis perdas plasmidiais dos isolados testados.

A toxina CDT (*cytotoxic distending toxin*), codificada no operon *cdt*, é associada às bactérias causadoras de infecções intestinais (JOHNSON *et al.*, 2000), sendo infrequente em isolados ExPECs (MIRZARAZI *et al.*, 2015; MOSTAFAVI *et al.* 2019; JOHNSON & STELL, 2000). Nossos resultados (identificação em 27% dos isolados) fornecem uma relação entre o potencial de produção de toxinas citotéticas e necrotizantes e o perfil de invasividade celular de isolados EnPEC no endométrio de animais de

companhia (dados não publicados), além da forte reação exsudativa característica da doença (HAGMAN, 2018).

Embora não tenha sido identificado durante a análise do genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17, o gene *usp* (*uropathogenic specific protein*), codificante da colicina Usp (PARRET & DE MOT, 2002), foi screenado entre os nossos isolados por ser um fator de virulência já descrito anteriormente em isolados EnPEC de piometra (SIQUEIRA *et al.*, 2009; MATEUS *et al.*, 2013; MALUTA *et al.*, 2014). Interessantemente, similar aos resultados de Siqueira *et al.* (2009), o gene *usp* foi identificado em 67% dos isolados testados. No entanto esses resultados superam os de Maluta *et al.* (2014), que identificaram 39% dos isolados como carreadores do gene *usp*. Destacamos também que, quando testado por PCR, nós identificamos o gene *usp* no isolado *E. coli*\_LBV005/17. Portanto, em função da elevada identificação no presente estudo, acreditamos serem necessárias maiores investigações quanto a função de *usp* na patogenicidade de EnPECs.

A captura de ferro é uma das atividades mais importantes na virulência de isolados ExPEC. Quatro sistemas de sideróforos foram buscados nos isolados EnPEC. Os sistemas enterobactina e yersiniabactina estão presentes na maioria dos isolados (100% e 89%, respectivamente – Figura 1). Por outro lado, como pode ser observado na Figura 1, os genes associados ao sistema aerobactina (*iucD*, *iucC* e *iutA*) foram detectados em baixa frequência. Surpreendentemente, o sistema aerobactina não foi identificado no genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17, porém por PCR o gene *iutA* foi identificado. Da mesma forma, embora sem evidências de sistema salmochelina no genoma *E. coli*\_LBV005/17, 82% dos isolados EnPECs foram positivos para a presença do gene *iroN*. Comparativamente, a mesma porcentagem de detecção de *iroN* foi encontrada por Mateus *et al.* (2013). Finalmente, ressaltamos que todos os isolados analisados obtiveram amplificação para, pelo menos, um gene relacionado à captação de ferro. Esses resultados sugerem que muitos sistemas de captação por sideróforos podem estar associados à patogenicidade dos isolados EnPEC, embora o sistema enterobactina seja o mais distribuído entre os isolados de piometra.

Para escapar das defesas do hospedeiro, *E. coli* pode empregar uma série de mecanismos de virulência. Analisamos a presença do gene codificante da proteína *increase serum survive* (Iss). Dentre os isolados estudados, um grande número foi positivo para a presença do gene *iss* (89% - Figura 1). Até o momento, um único estudo havia realizado a pesquisa desse gene em isolados de *E. coli* de piometra, cujos resultados determinaram uma frequência de 21% de positividade para o gene *iss*



(MALUTA *et al.*, 2014). Nossos resultados ressaltam a possível importância da proteína Iss na manutenção de *E. coli* no hospedeiro. Levando em consideração a ampla distribuição dos genes *iss* nos isolados associado à identificação do sistema T6SS no genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17, pode-se hipotetizar que o transporte do efector virulento Iss às células do hospedeiro é feito através do sistema T6SS. No entanto, estudos experimentais são necessários para confirmar esse mecanismo.

Os genes codificantes de proteínas relacionadas à formação de biofilme foram identificados na maioria dos isolados EnPEC (*bssS* - 100%; *bssR* - 93,5%; e *hmsP* - 100%). Acreditamos que a formação de biofilme pode ser correlacionada ao potencial virulento dos isolados EnPEC, e ainda à inefetividade do tratamento antimicrobiano em animais com quadros clínicos de piometra.

**Figura 1.** Resultados do rastreamento de genes de virulência nos isolados EnPEC

Isolado EnPEC	Adesinas				Toxinas					Captação de ferro				Biofilme			Outros					
	<i>fimA</i>	<i>fli7</i>	<i>iha</i>	<i>papC</i>	<i>sfa</i>	<i>artA</i>	<i>cdtA</i>	<i>cnfI</i>	<i>hlyA</i>	<i>hlyE</i>	<i>entB</i>	<i>Iron</i>	<i>irpI</i>	<i>iucC</i>	<i>iucD</i>	<i>iutA</i>	<i>bssS</i>	<i>bssR</i>	<i>hmsP</i>	<i>iss</i>	<i>usp</i>	
B2	LBV013/16																					
	LBV016/16																					
	LBV018/16																					
	LBV005/17																					
	LBV066/17																					
	LBV070/17																					
	LBV074/17																					
	LBV036/18																					
	LBV037/18																					
	LBV045/18																					
	LBV071/18																					
	LBV072/18																					
	LBV077/18																					
	LBV084/18																					
	LBV090/18																					
	LBV114/18																					
	LBV126/18																					
	LBV183/18																					
	LBV188/18																					
	LBV201/18																					
	LBV202/18																					
	LBV219/18																					
	LBV246/18																					
	LBV247/18																					
	LBV010/19																					
	LBV018/19																					
	LBV022/19																					
	LBV029/19																					
LBV035/19																						
LBV059/19																						
LBV081/19																						
LBV083/19																						
F	LBV023/18																					
	LBV029/18																					
	LBV142/18																					
	LBV171/18																					
Clado I	LBV015/16																					
	LBV025/17																					
	LBV040/17																					
	LBV073/17																					
	LBV105/18																					
	LBV163/18																					
Desconhecido	LBV039/17																					
	LBV041/17																					
	LBV064/17																					
	LBV194/18																					

Quadrados cinzas: presença do gene; quadrados brancos: ausência do gene. Os resultados do isolado *E. coli*\_LBV005/17 são provenientes da análise genômica e reações de PCR.

Fonte: Próprio autor

### III. Perfil de susceptibilidade dos isolados EnPEC

Conforme os resultados de disco-difusão, a resistência antimicrobiana *in vitro* mais frequente entre os isolados EnPEC foi à rifampicina (73% dos isolados), seguido por eritromicina (60%) e ampicilina (11%) (Tabela Suplementar 4 – anexo D). Esse perfil de resistência é compatível com os dados genômicos do isolado sequenciado (Tabela 1) – genes de resistência a macrolídeos (*mph(A)*), beta-lactâmicos (*blaTEM-198*) e rifampicina (*mdfA* e *marB*). De acordo com os dados de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*, cinco isolados (11%) exibiram resistência antimicrobiana múltipla (RAM). Dentre esses cinco isolados, três demonstraram resistência fenotípica para, pelo menos, oito fármacos antimicrobianos. Além disso, 100% dos isolados EnPEC foram resistentes ou moderadamente susceptíveis para, no mínimo, uma droga antimicrobiana.

O principal perfil de resistência observado nesse estudo foi diferente ao perfil de resistência de EnPEC em estudos anteriores, dos quais o perfil de resistência mais prevalente foi contra os antimicrobianos: cefalotina (68%), ácido nalidíxico (56%) e ampicilina (AGOSTINHO *et al.*, 2014); e cefalotina (86%), ampicilina (69%) e cefoxitina (46,4%) (COGGAN *et al.*, 2008). Em comparação com os resultados de Coggan *et al.* (2008) (52% de RAM), o número de isolados com perfil RAM no nosso estudo foi menor, embora um grande número de genes relacionados à resistência antimicrobiana tenha sido identificado no genoma de *E. coli*\_LBV005/17, sendo esse isolado classificado como um isolado RAM pandêmico (ST131). Portanto, acreditamos que a diferença entre o perfil de resistência genômica e o perfil fenotípico das análises *in vitro* pode ser explicada pela baixa exposição dos isolados EnPEC às drogas antimicrobianas durante a infecção uterina, não havendo pressão seletiva para a expressão desses genes.

Podemos assumir duas possíveis hipóteses que explicam o baixo contato de isolados de EnPEC a antimicrobianos durante os quadros de piometra: *i*) a administração sistêmica de antimicrobianos pode não ser eficiente em alcançar o útero, portanto não há pressão para a expressão gênica nas bactérias; e *ii*) o tratamento cirúrgico é a alternativa terapêutica mais empregada em casos de piometra, sendo assim os protocolos antimicrobianos prévios à remoção uterina são raramente utilizados, o que suporta o baixo contato das bactérias envolvidas na infecção com as drogas

antimicrobianas. Conseqüentemente, novamente, essas bactérias não sofrem pressão seletiva para exibir um perfil de resistência antimicrobiana.

## Conclusão

Em suma, o perfil de virulência dos 45 isolados de EnPEC e a análise do primeiro genoma de um isolado EnPEC trazem muitos esclarecimentos para a caracterização de *E. coli* endometriais. Nossos resultados revelaram que não apenas fatores de virulência relacionados à UPECs estão presentes em EnPECs, como também fatores relacionados a cepas de origem intestinal. A ampla distribuição de genes de virulência de ExPECs nos isolados EnPEC (sendo a maioria deles pertencentes ao filogruppo B2), somado à classificação do isolado *E. coli*\_LBV005/17 como *E. coli* ST131 reforçam o elevado potencial patogênico desse patotipo. Por fim, outros estudos são necessários para comprovar a capacidade *in vitro* das adesinas e toxinas descritas nesse estudo em promover adesão e toxicidade ao endométrio, elucidando assim a função desses fatores de virulência no desencadeamento da piometra.

## Referências

- AGOSTINHO, J. *et al.* *Escherichia coli* strains isolated from the uteri horn, mouth, and rectum of bitches suffering from pyometra: virulence factors, antimicrobial susceptibilities, and clonal relationships among strains. **International journal of microbiology**, Nasr City, v. 2014, 2014.
- ALIZADE, H. *et al.* Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from diarrheic and urinary tract infections in relation to phylogeny in southeast of Iran. **Tropical biomedicine**, Kuala Lumpur, v. 31, n. 1, p. 174-82, 2014.
- BAIDA, G. E.; KUZMIN, N. P. Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, Amsterdam, v. 1264, n. 2, p. 151-154, 1995.
- BARTELLI, N. L. *et al.* The Cytoplasm-Entry Domain of Antibacterial CdiA Is a Dynamic  $\alpha$ -Helical Bundle with Disulfide-Dependent Structural Features. **Journal of molecular biology**, London, v. 431, n. 17, p. 3203-3216, 2019.
- BEGHAIN, J. *et al.* ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. **Microbial genomics**, London, v. 4, n. 7, 2018.
- BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (BrCAST). Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos,

versão 9.0, 2019. Disponível em: <<http://brcast.org.br/documentos/>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

CASTANIE-CORNET, M. P. *et al.* The glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*: essential and dual role of the His–Asp phosphorelay RcsCDB/AF. **Microbiology**, Reading, v. 153, n. 1, p. 238-246, 2007.

CLERMONT, O. *et al.* Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infection, genetics and evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 3, p. 654-662, 2011.

CLERMONT, O. *et al.* The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental microbiology reports**, Hoboken, v. 5, n. 1, p. 58-65, 2013.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28. ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. Disponível em: < <http://www.iaclid.org/DL/public/CLSI-2018-M100-S28.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

CYOIA, P. S. *et al.* Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, v. 9, n. 10, p. 1068-1075, 2015.

DE BIASE, D. *et al.* The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. **Molecular microbiology**, Boston, v. 32, n. 6, p. 1198-1211, 1999.

DEBROY, C. *et al.* Complete sequence of pEC14\_114, a highly conserved IncFIB/FIIA plasmid associated with uropathogenic *Escherichia coli* cystitis strains. **Plasmid**, New York, v. 63, n. 1, p. 53-60, 2010.

DI VENANZIO, G., STEPANENKO, T. M.; VESCOVI, E. G. *Serratia marcescens* ShlA pore-forming toxin is responsible for early induction of autophagy in host cells and is transcriptionally regulated by RcsB. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 82, n. 9, p. 3542-3554, 2014.

DINGEMANS, J. *et al.* The Yin and Yang of SagS: distinct residues in the HmsP domain of SagS independently regulate biofilm formation and biofilm drug tolerance. **mSphere**, Washington, v. 3, n. 3, p. e00192-18, 2018.

DOMKA, J.; LEE, J.; WOOD, T. K. YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 72, n. 4, p. 2449-2459, 2006.

- ELLINGTON, M. J.; WOODFORD, N. Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 57, n. 6, p. 1026-1029, 2006.
- FERNANDEZ, R. C.; WEISS, A. A. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 62, n. 11, p. 4727-4738, 1994.
- GAO, X. *et al.* Evolution of host adaptation in the *Salmonella* typhoid toxin. **Nature microbiology**, London, v. 2, n. 12, p. 1592, 2017.
- GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, C. L. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G. THOEN, C. O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. cap. 15, p. 268-308.
- HERTLE, R. *et al.* Cytotoxic action of *Serratia marcescens* hemolysin on human epithelial cells. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 67, n. 2, p. 817-825, 1999.
- HINENOYA, A. *et al.* Association of cytolethal distending toxin-II gene-positive *Escherichia coli* with *Escherichia albertii*, an emerging enteropathogen. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 307, n. 8, p. 564-571, 2017.
- HUNT, S. *et al.* Hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA) and related proteins. In: ANDERLUH, G. & LAKEY, J. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York: Landes Bioscience, 2010. 667 v. cap. 10, p. 116.
- IRANPOUR, D. *et al.* Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, 2015.
- JIANG, Y. ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. **Molecular microbiology**, Boston, v. 44, n. 4, p. 971-979, 2002.
- JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **The Journal of infectious diseases**, London, v. 181, n. 1, p. 261-272, 2000.
- JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y. M.; NOLAN, L. K. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 74, n. 8, p. 2360-2369, 2008.
- KOH, E. I. *et al.* Copper import in *Escherichia coli* by the yersiniabactin metallophore system. **Nature chemical biology**, New York, v. 13, n. 9, p. 1016, 2017.

LAI, X. H. *et al.* Cytocidal and apoptotic effects of the ClyA protein from *Escherichia coli* on primary and cultured monocytes and macrophages. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 68, n. 7, p. 4363-4367, 2000.

LI, C. *et al.* Interaction investigations of HipA binding to HipB dimer and HipB dimer + DNA complex: a molecular dynamics simulation study. **Journal of Molecular Recognition**, London, v. 26, n. 11, p. 556-567, 2013.

LUDWIG, A. *et al.* Molecular analysis of cytolysin A (ClyA) in pathogenic *Escherichia coli* strains. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 186, n. 16, p. 5311-5320, 2004.

MARTIN, C.; ROUSSET, E.; DE GREVE, H. Human uropathogenic and bovine septicaemic *Escherichia coli* strains carry an identical F17-related adhesion. **Research in microbiology**, Amsterdam, v. 148, n. 1, p. 55-64, 1997.

MCCORMICK, J. K.; KLAENHAMMER, T. R.; STILLES, M. E. Colicin V can be produced by lactic acid bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 37-41, 1999.

MEZA-SEGURA, M. *et al.* Cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* strains causing severe diarrhoea in young Mexican children. **JMM case reports**, London, v. 4, n. 2, 2017.

MILLER, R.; WIEDMANN, M. Dynamic duo—the *Salmonella* cytolethal distending toxin combines ADP-ribosyltransferase and nuclease activities in a novel form of the cytolethal distending toxin. **Toxins**, Basel, v. 8, n. 5, p. 121, 2016.

MIRZARAZI, M. *et al.* Occurrence of genes encoding enterotoxins in uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 1, p. 155-159, 2015.

MOSTAFAVI, S. K. S. *et al.* Serogroup distribution, diversity of exotoxin gene profiles, and phylogenetic grouping of CTX-M-1-producing uropathogenic *Escherichia coli*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, New York, v. 65, p. 148-153, 2019.

MOUGOUS J. D. *et al.* A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. **Science**, New York, v. 312, n. 5779, p. 1526-1530, 2006.

NATARO, J. P. *et al.* Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 63, n. 12, p. 4721-4728, 1995.

NURK, S. *et al.* **Assembling genomes and mini-metagenomes from highly chimeric reads.** *In: Annual International Conference on Research in Computational Molecular Biology.* Springer, Berlin, Heidelberg, p. 158-170, 2013.

PARRET, A. H. A; DE MOT, R. *Escherichia coli's* uropathogenic-specific protein: a bacteriocin promoting infectivity? **Microbiology**, Reading, v. 148, n. 6, p. 1604-1606, 2002.

PERRY, R. D.; FETHERSON, J. D. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. **Microbes and infection**, New York, v. 13, n. 10, p. 808-817, 2011.

PICARD, B. *et al.* The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 67, n. 2, p. 546-553, 1999.

ROBINSON, A. E. *et al.* Uropathogenic enterobacteria use the yersiniabactin metallophore system to acquire nickel. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 293, n. 39, p. 14953-14961, 2018.

RUHE, Z. C. *et al.* Programmed secretion arrest and receptor-triggered toxin export during antibacterial contact-dependent growth inhibition. **Cell**, Cambridge, v. 175, n. 4, p. 921-933, e14, 2018.

RUSSELL, A. B. *et al.* Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. **Nature**, London, v. 475, n. 7356, p. 343, 2011.

SCHUMACKER, M. *et al.* HipBA–promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance. **Nature**, London, v. 524, n. 7563, p. 59, 2015.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 4, n. 2, p. 134-163, 2007.

TAMURA, K. *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, New York, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TAN, Q.; AWANO, N.; INOUE, M. YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. **Molecular microbiology**, Boston, v. 79, n. 1, p. 109-118, 2011.

TOTSIKA, M. *et al.* Insights into a multidrug resistant *Escherichia coli* pathogen of the globally disseminated ST131 lineage: genome analysis and virulence mechanisms. **PLoS one**, San Francisco, v. 6, n. 10, p. e26578, 2011.



TOTSIKA, M. *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* mediated urinary tract infection. **Current drug targets**, Hilversum, v. 13, n. 11, p. 1386-1399, 2012.

UCHIDA, I. *et al.* *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 ArtA-dependent modification of pertussis toxin-sensitive G proteins in the presence of [32P] NAD. **Microbiology**, Reading, v. 155, n. 11, p. 3710-3718, 2009.

WILES, T. J., KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and molecular pathology**, New York, v. 85, n. 1, p. 11-19, 2008.

YAHIAOUI, M. *et al.* Antibiotic resistance, virulence, and genetic background of community-acquired uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 21, n. 5, p. 516-526, 2015.

YAMAMOTO, S. *et al.* The presence of the virulence island containing the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. **The Journal of urology**, Baltimore, v. 165, n. 4, p. 1347-1351, 2001.

## 5 CONCLUSÕES

- O primeiro genoma de um isolado EnPEC foi sequenciado e analisado nesse trabalho.
- Tanto a análise do genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17 (classificado como *E. coli* ST131), quanto o perfil de virulência dos 45 isolados EnPEC (a maioria deles classificados como phylo-grupo B2) revelaram forte potencial patogênico desse patotipo.
- Os resultados das análises genéticas dos isolados EnPEC demonstram não apenas fatores de virulência relacionados a UPECs, porém uma série de genes relacionados aos principais mecanismos de patogenicidade de ExPEC, demonstrando a forte correlação desse patotipo ao grupo de *E. coli* extraintestinais. Interessantemente, alguns fatores de virulência relacionados às InPECs também foram identificados.
- Quanto ao perfil de susceptibilidade dos isolados testados aos antimicrobianos, os isolados do patotipo EnPEC não demonstraram grande perfil de resistência *in vitro*, embora um grande número de genes que conferem resistência a esses fármacos tenha sido identificado no genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17. Com isso, sugerimos que esses resultados podem ser explicados pela baixa exposição dos isolados EnPEC às drogas antimicrobianas durante a infecção uterina, não havendo pressão seletiva para a expressão desses genes.
- Os resultados desse estudo contribuem para o esclarecimento da caracterização do patotipo EnPEC. Outros estudos são necessários para visualizar e determinar a função de cada fator de virulência no desenvolvimento da piometra.

## 6 PERSPECTIVAS

- Realizar ensaios de formação de biofilme para observar o perfil de formação de biofilme nos isolados EnPEC.
- Realizar testes de adesão, invasividade e toxicidade celular em células endometriais *in vitro*.
- Relacionar filogeneticamente o isolado *E. coli*\_LBV005/17 a outros isolados de diferentes patotipos de *E. coli*.
- Relacionar filogeneticamente os isolados EnPEC desse estudo a outros isolados de diferentes patotipos de *E. coli*.
- Analisar comparativamente os genomas de cepas UPEC e EnPEC isoladas de um mesmo animal.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, J. *et al.* *Escherichia coli* strains isolated from the uteri horn, mouth, and rectum of bitches suffering from pyometra: virulence factors, antimicrobial susceptibilities, and clonal relationships among strains. **International journal of microbiology**, Nasr City, v. 2014, 2014.
- ALIZADE, H. *et al.* Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from diarrheic and urinary tract infections in relation to phylogeny in southeast of Iran. **Tropical biomedicine**, Kuala Lumpur, v. 31, n. 1, p. 174-82, 2014.
- ANTIMICROBIAL resistance: global report on surveillance. Geneva: WHO, 2014. 232 p. Disponível em: <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748\\_eng.pdf;jsessionid=3171F7E270AEDDC3221248635C9D755F?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf;jsessionid=3171F7E270AEDDC3221248635C9D755F?sequence=1)>. Acesso em: 18 nov. 2019.
- BAIDA, G. E.; KUZMIN, N. P. Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, Amsterdam, v. 1264, n. 2, p. 151-154, 1995.
- BARTELLI, N. L. *et al.* The Cytoplasm-Entry Domain of Antibacterial CdiA Is a Dynamic  $\alpha$ -Helical Bundle with Disulfide-Dependent Structural Features. **Journal of molecular biology**, London, v. 431, n. 17, p. 3203-3216, 2019.
- BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**. [S.l.]: BrCAST, 2019. Versão 9.0, válida a partir de 4/10/2019. Disponível em: <<http://brcast.org.br/documentos/>>. Acesso em 18 nov. 2019.
- CASTANIE-CORNET, M. P. *et al.* The glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*: essential and dual role of the His-Asp phosphorelay RcsCDB/AF. **Microbiology**, Reading, v. 153, n. 1, p. 238-246, 2007.
- CHEN, Y. M. M. *et al.* Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 1, p. 57-69, 2003.
- CLERMONT, O. *et al.* Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infection, genetics and evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 3, p. 654-662, 2011.
- CLERMONT, O. *et al.* The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental microbiology reports**, Hoboken, v. 5, n. 1, p. 58-65, 2013.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M100**: performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. Wayne: CLSI, 2018. Disponível em: <<http://www.iaclid.org/DL/public/CLSI-2018-M100-S28.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2019.
- COGGAN, J. *et al.* Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 477-483, 2008.

CRUTCHLEY, M. J. MARSH, D. G.; CAMERON, J. Free endotoxin. **Nature**, London, v. 214, n. 5092, p. 1052-1052, 1967.

CURSINO, L. *et al.* Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 3, p. 185-195, 2002.

CYOIA, P. S. *et al.* Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, v. 9, n. 10, p. 1068-1075, 2015.

DE BOSSCHERE, H. *et al.* Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected? **Theriogenology**, New York, v. 55, n. 7, p. 1509-1519, 2001.

DE BOSSCHERE, H. *et al.* Estrogen- $\alpha$  and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 70, n. 3-4, p. 251-259, 2002.

DEBROY, C. *et al.* Complete sequence of pEC14\_114, a highly conserved IncFIB/FIIA plasmid associated with uropathogenic *Escherichia coli* cystitis strains. **Plasmid**, New York, v. 63, n. 1, p. 53-60, 2010.

DI VENANZIO, G., STEPANENKO, T. M.; VESCOVI, E. G. *Serratia marcescens* Sh1A pore-forming toxin is responsible for early induction of autophagy in host cells and is transcriptionally regulated by RcsB. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 82, n. 9, p. 3542-3554, 2014.

DINGEMANS, J. *et al.* The Yin and Yang of SagS: distinct residues in the HmsP domain of SagS independently regulate biofilm formation and biofilm drug tolerance. **mSphere**, Washington, v. 3, n. 3, e00192-18, 2018.

DOMKA, J.; LEE, J.; WOOD, T. K. YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 72, n. 4, p. 2449-2459, 2006.

EGENVALL, A. *et al.* Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. **Journal of veterinary internal medicine**, Philadelphia, v. 15, n. 6, p. 530-538, 2001.

ELLINGTON, M. J.; WOODFORD, N. Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 57, n. 6, p. 1026-1029, 2006.

FELDMAN, E. C. O complexo Hiperplasia Endometrial Cística/Piometra e Infertilidade em Cadelas. In: STEPHEN, J. E.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014, v.2, p. 1632-1636.

FERNANDEZ, R. C.; WEISS, A. A. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 62, n. 11, p. 4727-4738, 1994.

FRANSSON, B. A.; RAGLE, C. A. Canine pyometra: an update on pathogenesis and treatment. **Compendium**, Yardley, v. 25, n. 08, p. 602-612, 2003.

FRANSSON, B. *et al.* Bacteriological findings, blood chemistry profile and plasma endotoxin levels in bitches with pyometra or other uterine diseases. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, Berlin, v. 44, n. 1-10, p. 417-426, 1997.

GAO, X. *et al.* Evolution of host adaptation in the *Salmonella* typhoid toxin. **Nature microbiology**, London, v. 2, n. 12, p. 1592, 2017.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, C. L. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G. THOEN, C. O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. cap. 15, p. 268-308.

HACKER, J. *et al.* Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18: K1 meningitis isolate. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 61, n. 2, p. 544-550, 1993.

HAGMAN, R. *et al.* Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2 $\alpha$  metabolite analysis. **Theriogenology**, New York, v. 66, n. 2, p. 198-206, 2006.

HAGMAN, R. *et al.* Incidence of pyometra in Swedish insured cats. **Theriogenology**, New York, v. 82, n. 1, p. 114-120, 2014.

HAGMAN, R. Pyometra in Small Animals. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 48, p. 639-661, 2018.

HAGMAN, R.; KÜHN, I. *Escherichia coli* strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 84, n. 1-2, p. 143-153, 2002.

HERTLE, R. *et al.* Cytotoxic action of *Serratia marcescens* hemolysin on human epithelial cells. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 67, n. 2, p. 817-825, 1999.

HINENOYA, A. *et al.* Association of cytolethal distending toxin-II gene-positive *Escherichia coli* with *Escherichia albertii*, an emerging enteropathogen. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 307, n. 8, p. 564-571, 2017.

HOLLINSHEAD, F.; KREKELER, N. Pyometra in the queen: to spay or not to spay? **Journal of feline medicine and surgery**, London, v. 18, n. 1, p. 21-33, 2016.

HUNT, S. *et al.* Hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA) and related proteins. In: ANDERLUH, G. & LAKEY, J. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York: Landes Bioscience, 2010. v.667, cap. 10, p. 116.

IRANPOUR, D. *et al.* Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, 2015.

JIANG, Y. ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. **Molecular microbiology**, Boston, v. 44, n. 4, p. 971-979, 2002.

JITPEAN, S. *et al.* Outcome of pyometra in female dogs and predictors of peritonitis and prolonged postoperative hospitalization in surgically treated cases. **BMC Veterinary Research**, London, v. 10, n. 1, p. 6, 2014.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **The Journal of infectious diseases**, London, v. 181, n. 1, p. 261-272, 2000.

- JOHNSON, J. R.; STELL, A. L.; DELAVARI, P. Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 69, n. 3, p. 1306-1314, 2001.
- JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y. M.; NOLAN, L. K. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 74, n. 8, p. 2360-2369, 2008.
- KOH, E. I. *et al.* Copper import in *Escherichia coli* by the yersiniabactin metallophore system. **Nature chemical biology**, New York, v. 13, n. 9, p. 1016, 2017.
- KREKELER, N. *et al.* The role of Type 1, P and S *fimbriae* in binding of *Escherichia coli* to the canine endometrium. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 164, n. 3-4, p. 399-404, 2013.
- LAI, X. H. *et al.* Cytocidal and apoptotic effects of the ClyA protein from *Escherichia coli* on primary and cultured monocytes and macrophages. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 68, n. 7, p. 4363-4367, 2000.
- LI, C. *et al.* Interaction investigations of HipA binding to HipB dimer and HipB dimer + DNA complex: a molecular dynamics simulation study. **Journal of Molecular Recognition**, London, v. 26, n. 11, p. 556-567, 2013.
- LUDWIG, A. *et al.* Molecular analysis of cytolysin A (ClyA) in pathogenic *Escherichia coli* strains. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 186, n. 16, p. 5311-5320, 2004.
- LYLE, S. K. Piometra e hiperplasia endometrial cística. In: TILLEY, L. P.; JUNIOR, F. W. K. S. *Consulta Veterinária em 5 minutos*. 5. ed. Barueri: Manole LTDA, 2015, p. 1042 – 1043.
- MALUTA, R. P. *et al.* Frequencies of virulence genes and pulse field gel electrophoresis fingerprints in *Escherichia coli* isolates from canine pyometra. **The Veterinary Journal**, London, v. 202, n. 2, p. 393-395, 2014.
- MANGES, A. R. *et al.* Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 32, n. 3, p. 135-18, 2019.
- MARTIN, C.; ROUSSET, E.; DE GREVE, H. Human uropathogenic and bovine septicaemic *Escherichia coli* strains carry an identical F17-related adhesion. **Research in microbiology**, Amsterdam, v. 148, n. 1, p. 55-64, 1997.
- MATEUS, L. *et al.* Virulence genotypes of *Escherichia coli* canine isolates from pyometra, cystitis and fecal origin. **Veterinary microbiology**, v. 166, n. 3-4, p. 590-594, 2013.
- MCCORMICK, J. K.; KLAENHAMMER, T. R.; STILLES, M. E. Colicin V can be produced by lactic acid bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 37-41, 1999.
- MEZA-SEGURA, M. *et al.* Cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* strains causing severe diarrhoea in young Mexican children. **JMM case reports**, London, v. 4, n. 2, 2017.
- MILLER, R.; WIEDMANN, M. Dynamic duo—the *Salmonella* cytolethal distending toxin combines ADP-ribosyltransferase and nuclease activities in a novel form of the cytolethal distending toxin. **Toxins**, Basel, v. 8, n. 5, p. 121, 2016.

- MIRZARAZI, M. *et al.* Occurrence of genes encoding enterotoxins in uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 1, p. 155-159, 2015.
- MOSTAFAVI, S. K. S. *et al.* Serogroup distribution, diversity of exotoxin gene profiles, and phylogenetic grouping of CTX-M-1-producing uropathogenic *Escherichia coli*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, New York, v. 65, p. 148-153, 2019.
- MOUGOUS J. D. *et al.* A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. **Science**, New York, v. 312, n. 5779, p. 1526-1530, 2006.
- MOXLEY, R. *Enterobactereacea: Escherichia*. In: MCVEY, D. S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Veterinary Microbiology**. 3. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 2013. cap.7, p.62-74.
- NATARO, J. P. *et al.* Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 63, n. 12, p. 4721-4728, 1995.
- NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Distúrbios reprodutivos. In: \_\_\_\_\_. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001. cap.8, p. 657-674.
- NURK, S. *et al.* Assembling genomes and mini-metagenomes from highly chimeric reads. In: **Annual International Conference on Research in Computational Molecular Biology**. Springer, Berlin, p. 158-170, 2013.
- PARKKINEN, J. *et al.* Binding sites in the rat brain for *Escherichia coli* S fimbriae associated with neonatal meningitis. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 81, n. 3, p. 860-865, 1988.
- PARRET, A. H. A; DE MOT, R. *Escherichia coli*'s uropathogenic-specific protein: a bacteriocin promoting infectivity?. **Microbiology**, Reading, v. 148, n. 6, p. 1604-1606, 2002.
- PERRY, R. D.; FETHERSON, J. D. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. **Microbes and infection**, New York, v. 13, n. 10, p. 808-817, 2011.
- PICARD, B. *et al.* The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 67, n. 2, p. 546-553, 1999.
- POMBA, C. *et al.* Within-lineage variability of ST131 *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the south of Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 69, n. 1, p. 271-273, 2013.
- PRESTES, N. C. *et al.* **Piometra canina: aspectos clínicos, laboratoriais e radiológicos**. Semina, Londrina, v. 12, n. 1, p. 53-56, 1991.
- QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. Família *Enterobactereacea*. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.18, p.115-130.
- RIBEIRO, M. G.; LEITE, D. S.; SIQUEIRA, A. K. Enfermidades por *Escherichia coli*. In: MEGID, J; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. cap. 25, p. 243-273.



ROBINSON, A. E. *et al.* Uropathogenic enterobacteria use the yersiniabactin metallophore system to acquire nickel. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 293, n. 39, p. 14953-14961, 2018.

ROJAS-LOPEZ, M. *et al.* Intestinal pathogenic *Escherichia coli*: Insights for vaccine development. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 440, 2018.

RUHE, Z. C. *et al.* Programmed secretion arrest and receptor-triggered toxin export during antibacterial contact-dependent growth inhibition. **Cell**, Cambridge, v. 175, n. 4, p. 921-933, e14, 2018.

RUSSELL, A. B. *et al.* Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. **Nature**, London, v. 475, n. 7356, p. 343, 2011.

SANDHOLM, M.; VASENIUS, H.; KIVISTÖ, A. K. Pathogenesis of canine pyometra. **Journal of the American veterinary medical association**, Ithaca, v. 167, n. 11, p. 1006-1010, 1975.

SCHLAFER, D., H.; MILLER, R. B. Female genital system. *In*: MAXIE, G. **Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier, 2007, v.3, cap.4, p. 465-473.

SCHUMACKER, M. *et al.* HipBA-promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance. **Nature**, London, v. 524, n. 7563, p. 59, 2015.

SIQUEIRA, A. K. *et al.* Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 2, p. 206-210, 2009.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 4, n. 2, p. 134-163, 2007.

TAN, Q.; AWANO, N.; INOUE, M. YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. **Molecular microbiology**, Boston, v. 79, n. 1, p. 109-118, 2011.

TOTSIKA, M. *et al.* Insights into a multidrug resistant *Escherichia coli* pathogen of the globally disseminated ST131 lineage: genome analysis and virulence mechanisms. **PloS one**, San Francisco, v. 6, n. 10, p. e26578, 2011.

TOTSIKA, M. *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* mediated urinary tract infection. **Current drug targets**, Hilversum, v. 13, n. 11, p. 1386-1399, 2012.

UCHIDA, I. *et al.* *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 ArtA-dependent modification of pertussis toxin-sensitive G proteins in the presence of [32P] NAD. **Microbiology**, Reading, v. 155, n. 11, p. 3710-3718, 2009.

WALK, S. T. *et al.* Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 20, p. 6534-6544, 2009.

WATTS, J. R.; WRIGHT, P. J.; WHITHEAR, K. C. Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle. **Journal of small animal practice**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 54-60, 1996.

WILES, T. J., KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and molecular pathology**, New York, v. 85, n. 1, p. 11-19, 2008.

YAHIAOUI, M. *et al.* Antibiotic resistance, virulence, and genetic background of community-acquired uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 21, n. 5, p. 516-526, 2015.

YAMAMOTO, S. *et al.* The presence of the virulence island containing the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 165, n. 4, p. 1347-1351, 2001.

**ANEXO A - PRIMERS CONSTRUÍDOS PARA A BUSCA DE GENES DE VIRULÊNCIA  
NOS ISOLADOS EnPEC**

**Tabela Suplementar 1** - Primers construídos para a busca de genes de virulência nos isolados EnPEC

<b>Gene</b>	<b>Primer name</b>	<b>Sequence (5' - 3')</b>	<b>TM (°C)</b>	<b>Sequence size (pb)</b>
<i>bssR</i>	BssR-F	CGTTGACAGACAGCGAATCG	57	265
	BssR-R	GCATGGCGTGCTTCTGC		
<i>bssS</i>	BssS-F	GTCATTCAGACTCATCCGCTC	55	232
	BssS-R	GACGCCGATACTCGTTTACC		
<i>cdtA</i>	CdtA-F	GGATCGGAGATTCACCTTCC	55	553
	CdtA-R	GGTGGACTTATTGCCCATAGC		
<i>entB</i>	EntB-F	GAGCAGAGCGATGAAGATCG	57	585
	EntB-R	CCAGGCGTCGATGGTCCG		
<i>f17</i>	F17-F	CAGCCTTGCCAAACCAAG	53	375
	F17-R	CGTAAGCGATGGTATAATTGAC		
<i>fimA</i>	FimA-F	CTCTGGCAATCGTTGTCTG	53	480
	FimA-R	CACCAATGGCATAATAACGC		
<i>hlyE</i>	HlyE-F	CCAGAAAGGCATTCTCATTAAG	52	263
	HlyE-R	CATAATCAACGTAGAATCTGGCT		
<i>hmsP</i>	HmsP-F	CTATCTGGTGCTACAGGCGG	58	520
	HmsP-R	GCGTGGCGACAGTACCG		
<i>irp1</i>	Irp1-F	GGCAGCGAACGTGATTCAC	58	605
	Irp1-R	CAGCAGGATGACGGGCTTC		
<i>iss</i>	iss-F	CGCTCTGGCAATGCTTATTAC	53	204
	iss-R	CCATTTACGAATGTTTGCTGG		
<i>iroN</i>	iroN-F	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	60	667
	iroN-R	GATCGCCGACATTAAGACGCAG		
<i>iucC</i>	iucC-F	CGCCGTGGCTGGGGTAAG	60	541
	iucC-R	CAGCCGGTTCACCAAGTACTG		
<i>iucD</i>	iucD-F	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	58	602
	iucD-R	AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG		
<i>iutA</i>	iutA-F	GGCTGGACATCATGGGAAGTGG	60	302
	iutA-R	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG		
<i>hlyA</i>	hlyA-F	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	59	1117
	hlyA-R	TCCTTAAGCTCCCGCC		
<i>usp</i>	usp-F	ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT	58	440
	usp-R	CATCATGTAGTCGGGCGTAACAAT		
<i>sfa</i>	sfa-F	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	57	410
	sfa-R	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA		
<i>iha</i>	Iha-F	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	53	827
	Iha-R	TCCTTAAGCTCCCGCC		
<i>papC</i>	papC-F	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	59	328
	papC-R	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA		
<i>cnf1</i>	cnf1-F	CGTCAAGATGGAGTTTCTTATG	54	321
	cnf1-R	CATAGTAGATGCCGCTCAGAG		
<i>artA</i>	artA-F	GAGGATAAACCAGACTGCTATC	51	231
	artA-R	CTGGAAATAGTGAGAAACATC		

Fonte: Próprio autor.

**ANEXO B – SISTEMAS TOXINA-ANTITOXINA PRESENTES NO GENOMA DO  
ISOLADO *E. coli*\_LBV005/17**

**Tabela Suplementar 2** – Sistemas toxina-antitoxina (TA) identificados no genoma do  
isolado *E. coli*\_LBV005/17

Contig	Protein ID	System type	Protein name
85	PRJNA476460:DPC53_16360	II	Ykfl toxin
plasmid	PRJNA476460:DPC53_00695	II	Antitoxin CcdA
plasmid	PRJNA476460:DPC53_00700	II	Toxin CcdB
13	PRJNA476460:DPC53_05825	I	Type I toxin-antitoxin system toxin Ldr familyprotein
13	PRJNA476460:DPC53_05835	I	Type I toxin-antitoxin system toxin Ldr family protein
18	PRJNA476460:DPC53_07015	II	Type II toxin-antitoxin system HigA family antitoxin
18	PRJNA476460:DPC53_07025	II	Addiction module toxin RelE
33	PRJNA476460:DPC53_10465	II	Addiction module toxin RelE
27	PRJNA476460:DPC53_09130	II	Type II toxin-antitoxin system RelE/ParE family toxin
30	PRJNA476460:DPC53_09790	II	Type II toxin-antitoxin system RelE/ParE family toxin
159	PRJNA476460:DPC53_24420	II	Type II toxin-antitoxin system RelE/ParE family toxin
66	PRJNA476460:DPC53_16375	II	Type II toxin-antitoxin system RelE/ParE family toxin
36	PRJNA476460:DPC53_11120	I	Type I toxin-antitoxin system Ibs family toxin
71	PRJNA476460:DPC53_17100	I	Type I toxin-antitoxin system Ibs family toxin
43	PRJNA476460:DPC53_12500	II	Type II toxin-antitoxin system HipA family toxinoxin YjjJ
93	PRJNA476460:DPC53_19640	II	Type II toxin-antitoxin system HipA family toxin
213	PRJNA476460:DPC53_26100	II	Type II toxin-antitoxin system HipA family toxin
213	PRJNA476460:DPC53_26095	II	Toxin HipA
64	PRJNA476460:DPC53_16075	IV	Type IV toxin-antitoxin system YeeU family antitoxin
66	PRJNA476460:DPC53_16355	IV	Type IV toxin-antitoxin system YeeU family antitoxin
158	PRJNA476460:DPC53_24330	IV	Type IV toxin-antitoxin system YeeU family antitoxin
76	PRJNA476460:DPC53_17825	IV	Type IV toxin-antitoxin system YeeU family
64	PRJNA476460:DPC53_16080	IV	CbtA toxin
76	PRJNA476460:DPC53_17820	IV	CbtA toxin
158	PRJNA476460:DPC53_24325	IV	CbtA toxin
67	PRJNA476460:DPC53_16555	V	GhoT/OrtT family toxin
76	PRJNA476460:DPC53_17735	II	Txe/YoeB family addiction module toxin
113	PRJNA476460:DPC53_21400	I	Type I toxin-antitoxin system hok family toxin
114	PRJNA476460:DPC53_21530	II	Type II toxin-antitoxin system YhaV family toxin
114	PRJNA476460:DPC53_21535	II	Antitoxin PrIF
87	PRJNA476460:DPC53_19005	II	BrnA antitoxin superfamily

Fonte: Próprio autor.

**ANEXO C – SISTEMA DE SECREÇÃO T6SS PRESENTE NO GENOMA DO ISOLADO**  
*E. coli*\_LBV005/17

**Tabela Suplementar 3** – Proteínas relacionadas ao sistema T6SS no genoma do isolado *E. coli*\_LBV005/17

<b>Gene</b>	<b>Locus tag*</b>	<b>Protein</b>
<i>tssB</i>	DPC53_21875	type VI secretion system contractile sheath small subunit
<i>tssC</i>	DPC53_21870	type VI secretion system contractile sheath large subunit
	DPC53_22555	type VI secretion system tube protein Hcp
	DPC53_25295	type VI secretion system tube protein Hcp
<i>tssE</i>	DPC53_23710	type VI secretion system baseplate subunit TssE
	DPC53_25795	type VI secretion system tip protein VgrG
<i>clpV</i>	DPC53_21845	type VI secretion system ATPase TssH
<i>tssK</i>	DPC53_21865	type VI secretion system baseplate subunit TssK
	DPC53_23705	type VI secretion system protein VasL
<i>tssJ</i>	DPC53_23715	type VI secretion system lipoprotein TssJ
<i>tssG</i>	DPC53_23720	type VI secretion system baseplate subunit TssG
<i>vasA</i>	DPC53_23725	type VI secretion system baseplate subunit TssF
	DPC53_23935	type VI secretion protein ImpA
<i>tssA</i>	DPC53_24450	type VI secretion system protein TssA
	DPC53_24455	type VI secretion protein VasK

\* Locus tag de acordo com NCBI. Número de acesso QLNJ00000000

Fonte: Próprio autor

**ANEXO D – PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DOS 45  
ISOLADOS EnPEC**

**Tabela Suplementar 4 – Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados EnPEC**

Identificação isolado	Antimicrobiano																		
	AMC	AMI	AMP	AZI	CAZ	CIP	CFO	CFX	DOX	ERI	GEN	NAL	NIT	NOR	OFX	RIF	SUT	TET	TOB
LBV013/16	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV015/16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV016/16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV018/16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV025/17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	I
LBV039/17	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S	R	S	S	I
LBV040/17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	I
LBV041/17	S	S	S	I	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	I
LBV064/17	S	S	S	I	I	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	R	S	S	I
LBV066/17	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV070/17	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV073/17	S	S	R	I	I	R	S	S	I	R	S	R	S	R	R	R	R	R	I
LBV074/17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	I
LBV023/18	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S
LBV029/18	R	S	R	S	I	R	S	R	S	I	S	R	S	R	R	R	S	I	S
LBV036/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S
LBV037/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV045/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S
LBV071/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S
LBV072/18	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S
LBV077/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV084/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
LBV090/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
LBV105/18	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S
LBV114/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S
LBV126/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S
LBV142/18	S	S	R	S	S	I	S	S	S	I	S	R	S	I	S	R	S	S	S
LBV163/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S
LBV171/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R	S	I	S	R	S	S	S
LBV183/18	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	R	R	R	S
LBV188/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV194/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV201/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV202/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
LBV219/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV246/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV247/18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV010/19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
LBV018/19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
LBV022/19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV029/19	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV035/19	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	R
LBV059/19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV081/19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
LBV083/19	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S

AMC: amoxicilina + ácido clavulânico; AMI: amicacina; AMP: ampicilina; AZI: azitromicina; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; CFO: cefoxitina; CFX: cefalexina; DOX: doxiciclina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalidíxico; NIT: nitrofurantoína; NOR: norfloxacina; OFX: ofloxacina; RIF: rifampicina; SUT: sulfametoxazol + trimetoprima; TET: tetraciclina; TOB: tobramicina. S: susceptível; I: susceptibilidade intermediária; R: resistente.

Fonte: Próprio autor.