

**Caracterização molecular de isolados de *Escherichia coli*
multidroga resistentes obtidos do meio ambiente**

João Pedro Rueda Furlan

**Ribeirão Preto
2022**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização molecular de isolados de *Escherichia coli*
multidroga resistentes obtidos do meio ambiente**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia aplicados à Farmácia

Orientado: João Pedro Rueda Furlan

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia no dia 24/06/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2022

FURLAN, J.P.R.	Caracterização molecular de isolados de <i>Escherichia coli</i> multidroga resistentes obtidos do meio ambiente		DOUTORADO FCFRPUSP 2022
-------------------	---	--	-------------------------------

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Rueda Furlan, João Pedro

Caracterização molecular de isolados de *Escherichia coli* multidroga resistentes obtidos do meio ambiente. Ribeirão Preto, 2022.

139 p. : il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioagentes e Biotecnologia aplicados à Farmácia.

Orientadora: Stehling, Eliana Guedes.

1. *E. coli*. 2. MDR. 3. *mcr-1*. 4. ESBL. 5. PMQR. 6. Solo. 7. Água.

FOLHA DE APROVAÇÃO

João Pedro Rueda Furlan

Caracterização molecular de isolados de *Escherichia coli* multidroga resistentes obtidos do meio ambiente

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia aplicados à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esse estudo à minha **família** e aos meus **amigos** que sempre me incentivaram e apoiaram na busca dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling**, pelas orientações, ensinamentos, oportunidades e incentivos. Pelo carinho e atenção. Pela confiança em mim depositada, possibilitando a minha ida ao exterior e a colaboração nos projetos do LAMAB, nos quais permitiram o meu crescimento profissional. A você querida professora, os meus eternos respeito e admiração.

À **Profa. Dra. Luísa Peixe**, por ter me aceitado no grupo BacT_Drugs da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal, para o estágio de pesquisa no exterior.

À **Dra. Ângela Novais**, pelas orientações, conselhos, incentivos e hospitalidade durante o período de estágio no BacT_Drugs.

À minha **família**, pelo apoio incondicional em busca dos meus objetivos.

À minha noiva **Mariana Salvarani**, pelo amor e incentivo durante todos estes anos.

Aos meus amigos e colegas dos grupos **LAMAB** e **BacT_Drugs**, pelos momentos agradáveis, conhecimentos divididos, experiências compartilhadas e auxílios na execução deste estudo.

À **Inara Fernanda Lage Gallo**, pelo auxílio técnico laboratorial.

As **professoras** e aos **professores** da FCFRP-USP, pelos ensinamentos compartilhados que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Aos **servidores técnico-administrativos** da FCFRP-USP.

Ao gerente **Dr. Eduardo Angelino Savazzi** da divisão de laboratório de Ribeirão Preto da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (**CETESB**), por ceder as amostras de água utilizadas neste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (**CAPES**) pelo auxílio financeiro (88882.180855/2018-01 e Código de Financiamento 001).

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelo auxílio financeiro (2018/01890-3, 2018/19539-0 e 2021/01655-7).

A **todos** que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste estudo.

"Intelligence is the ability to adapt to change."
Stephen Hawking

RESUMO

FURLAN, J. P. R. **Caracterização molecular de isolados de *Escherichia coli* multidroga resistentes obtidos do meio ambiente**. 2022. 139f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A ocorrência de patógenos multidroga resistentes (MDR) se tornou uma ameaça à capacidade de tratar infecções e a rápida disseminação desses patógenos na interface humana, animal e ambiental causa preocupações. *Escherichia coli* permanece como um dos principais patógenos associados com infecções relacionadas à assistência a saúde e possui uma grande capacidade de adquirir e transferir genes de resistência aos antimicrobianos (ARGs). O meio ambiente é constantemente afetado pela poluição decorrente de atividades antrópicas, as quais favorecem a seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos e a transferência horizontal de ARGs. Portanto, este estudo teve como objetivo caracterizar isolados de *E. coli* recuperados de amostras ambientais quanto aos perfis de resistência aos antimicrobianos, de virulência e epidemiológico. Amostras de solo (n=300) e de água (n=200) foram coletadas em diferentes cidades da região Sudeste do Brasil e foram utilizadas no isolamento de *E. coli*. Os isolados obtidos foram submetidos a testes fenotípicos e moleculares para caracterização dos perfis e dos genes de resistência aos antimicrobianos, enquanto que os genes de virulência, os elementos genéticos móveis e a tipagem foram determinados por métodos moleculares. Desta forma, 105 isolados MDR foram obtidos e apresentaram resistência principalmente às cefalosporinas de espectro estendido, às fluorquinolonas e à colistina. A tipagem e a subtipagem dos isolados revelaram uma grande diversidade genética, destacando as sequências tipo (STs) do complexo clonal 10 e os clones de alto risco ST10, ST131, ST354, ST648 e ST744. Diversos ARGs foram detectados, evidenciando a presença dos genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY} e *qnrB* em isolados de solo e de água, e do *mcr-1* (*mcr-1.1*, *mcr-1.26*) e do *qnrS* em isolados de água. Em alguns isolados, os genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-14} e *bla*_{CTX-M-15} foram localizados no cromossomo e estavam associados ao elemento Tn21-like e a *ISEcp1*, enquanto que os genes *bla*_{CMY}, *qnrB*, *qnrS* e *mcr-1* foram localizados nos plasmídeos Inc11-ST12, Col(pHAD28), IncR e IncX4, respectivamente. Os plasmídeos IncX4 foram altamente similares; no entanto, um novo ambiente genético atribuído pela inserção da Δ IS5-like (258 pb) na orientação oposta a montante do gene *mcr-1.1* foi evidenciada. Diferenças nas regiões adjacentes ao gene *mcr-1.26*, bem como a subestimação e a primeira descrição no mundo do gene *mcr-1.26* no meio ambiente foram determinadas neste estudo. Diferentes cassetes gênicos inseridos no integron de classe 1 em isolados de solos e a presença de um módulo de resistência aos antimicrobianos e de tolerância aos metais em isolados de água foram observados. Além disso, mutações nos determinantes de resistência às fluorquinolonas (GyrA, ParC, ParE) e à colistina (PmrAB, PhoPQ, MgrB) também foram identificadas. Genes de virulência relacionados com linhagens de *E. coli* diarreio gênicas (DEC) e *E. coli* patogênica extra-intestinal foram detectados dentre os isolados, destacando a presença de *E. coli* produtora de toxina Shiga e a prevalência de DEC em solos. Adicionalmente, um plasmídeo híbrido e multireplicon IncF [F2:A-B1]- Δ IncQ1 carreando ARGs e genes de virulência foi detectado em uma linhagem ST131-H22 de água que também foi positiva para o gene *mcr-1.26*. Diante disso, esses resultados evidenciam uma alta diversidade genética em linhagens de *E. coli* MDR e potencialmente patogênicas no meio ambiente, as quais são procedentes principalmente de contaminações de origem humana e de animais da cadeia produtora de alimentos. Portanto, a presença dessas linhagens no meio ambiente representa um potencial risco à saúde pública e ambiental, bem como à segurança alimentar.

Palavras-chave: *E. coli*, MDR, *mcr-1*, ESBL, PMQR, solo, água.

ABSTRACT

FURLAN, J. P. R. **Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates obtained from the environment.** 2022. 139f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

The occurrence of multidrug-resistant (MDR) pathogens has become a threat to the ability to treat infections and the rapid spread of these pathogens at the human-animal-environmental interface causes concern. *Escherichia coli* remains one of the main pathogens associated with healthcare-related infections and has a great ability to acquire and transfer antimicrobial resistance genes (ARGs). The environment is commonly affected by pollution resulting from human activities, which favor the selection of antimicrobial-resistant bacteria and the horizontal transfer of ARGs. Thus, this study aimed to characterize *E. coli* isolates recovered from environmental samples regarding antimicrobial resistance, virulence, and epidemiological profiles. Soil (n=300) and water (n=200) samples were collected in different cities in the Southeast region of Brazil and were used to isolate *E. coli*. The isolates obtained were submitted to phenotypic and molecular tests to characterize the profiles and genes of antimicrobial resistance, while virulence genes, mobile genetic elements, and typing were determined by molecular methods. Accordingly, 105 MDR isolates were obtained and showed resistance mainly to extended-spectrum cephalosporins, fluoroquinolones, and colistin. The typing and subtyping of the isolates revealed a great genetic diversity, highlighting the sequence types (STs) of the clonal complex 10 and the high-risk clones ST10, ST131, ST354, ST648, and ST744. Several ARGs were detected, evidencing the presence of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY}, and *qnrB* genes in isolates from soil and water, and *mcr-1* (*mcr-1.1*, *mcr-1.26*) and *qnrS* in isolates from water. In some isolates, the genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-14}, and *bla*_{CTX-M-15} were located on the chromosome and were associated with the Tn21-like element and *ISEcp1*, while the genes *bla*_{CMY}, *qnrB*, *qnrS*, and *mcr-1* were located on plasmids Inc11-ST12, Col(pHAD28), IncR, and IncX4, respectively. IncX4 plasmids were highly similar; however, a new genetic environment attributed by the insertion of the Δ IS5-like (258 bp) in the opposite orientation upstream of the *mcr-1.1* gene was evidenced. Differences in the adjacent regions of the *mcr-1.26* gene, as well as the underestimation and first description in the world of the *mcr-1.26* gene in the environment were determined in this study. Different gene cassettes inserted into the class 1 integron in isolates from soil and the presence of a module of antimicrobial resistance and metal tolerance in isolates from water were observed. In addition, mutations in the resistance determinants to fluoroquinolones (GyrA, ParC, ParE) and to colistin (PmrAB, PhoPQ, MgrB) were also identified. Virulence genes related to diarrheogenic *E. coli* (DEC) and extra-intestinal pathogenic *E. coli* strains were detected among the isolates, spotlighting the presence of Shiga toxin-producing *E. coli* and the prevalence of DEC in soils. Furthermore, a hybrid and multireplicon plasmid IncF [F2:A-B1]- Δ IncQ1 carrying ARGs and virulence genes was detected in a ST131-H22 lineage from water that was also positive for the *mcr-1.26* gene. On that account, these results show a high genetic diversity in lineages of *E. coli* MDR and potentially pathogenic in the environment, which come mainly from contamination of human origin and animals in the food production chain. Therefore, the presence of these lineages in the environment represents a potential risk to public and environmental health, as well as food safety.

Keywords: *E. coli*, MDR, *mcr-1*, ESBL, PMQR, soil, water.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Os eixos “Saúde Única” e “Saúde Global” da AMR.	6
Figura 2. Dispersão de bactérias MDR e seus ARGs no meio ambiente.	8
Figura 3. Vias de transmissão de linhagens de <i>E. coli</i> e ARGs.....	11
Figura 4. Visão geral dos genes <i>mcr</i> no Brasil de acordo com publicações em periódicos indexados no PubMed entre 2016 e março de 2022.	16
Figura 5. Mapa dos pontos de coleta dos ecossistemas aquáticos utilizados neste estudo.	28
Figura 6. Caracterização molecular dos isolados de <i>E. coli</i> obtidos de amostras de solo.....	49
Figura 7. Distribuição dos genes/alvos identificados em solos com culturas (SCC) e solos sem culturas (SSC).....	50
Figura 8. Caracterização molecular dos isolados de <i>E. coli</i> obtidos de amostras de água.....	57
Figura 9. Representação esquemática do módulo com 10.166 pb detectado nos isolados EW92, EW222, EW655 e EW715.....	58
Figura 10. Comparação entre os ambientes genéticos do gene <i>bla</i> _{CTX-M-2}	59
Figura 11. Comparação dos plasmídeos IncF [F2:A-B1]- Δ IncQ1 carreando ARGs, genes de resistência aos biocidas, genes de tolerância ao mercúrio e genes de virulência.	61
Figura 12. Mapa circular do pEW659-QnrB.....	63
Figura 13. Representação da comparação dos plasmídeos IncX4 carreando o gene <i>mcr-1.1</i>	66
Figura 14. Comparação dos plasmídeos IncX4 e dos ambientes genéticos do gene <i>mcr-1.26</i>	68
Figura 15. Distribuição dos genes/alvos identificados em rios, ribeirões/córregos (R/C) e no Lago do córrego da vendinha (LGV).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados das fazendas e das amostras de solo coletadas	26
Tabela 2. Iniciadores utilizados para detecção de ARGs.....	32
Tabela 3. Iniciadores utilizados na identificação de mutações em determinantes de resistência aos antimicrobianos	34
Tabela 4. Iniciadores utilizados na detecção dos genes de virulência	35
Tabela 5. Iniciadores utilizados na tipagem plasmidial e na detecção de integrons.....	36
Tabela 6. Iniciadores utilizados na determinação dos grupos filogenéticos.....	37
Tabela 7. Iniciadores utilizados na tipagem por MLST.....	38
Tabela 8. Fontes de isolamento e perfis de resistência aos antimicrobianos dos isolados de <i>E. coli</i> MDR obtidos de amostras de solo.....	43
Tabela 9. Características dos genomas dos isolados de <i>E. coli</i> MDR obtidos de amostras de solo e de água.....	45
Tabela 10. CIMs e características genéticas dos isolados de <i>E. coli</i> resistentes às fluorquinolonas obtidos de amostras de solo	47
Tabela 11. CIMs e características genéticas dos isolados de <i>E. coli</i> resistentes à colistina obtidos de amostras de solo	48
Tabela 12. Isolados, fontes de isolamento e dados microbiológicos dos ecossistemas aquáticos utilizados neste estudo	52
Tabela 13. Perfis de resistência aos antimicrobianos nos isolados de <i>E. coli</i> MDR obtidos de amostras de água.....	55
Tabela 14. CIMs e características genéticas dos isolados de <i>E. coli</i> resistentes às fluorquinolonas obtidos de amostras de água	62
Tabela 15. CIMs e características genéticas dos isolados de <i>E. coli</i> resistentes à colistina obtidos de amostras de água.....	64
Tabela 16. Características dos plasmídeos IncX4 carreando o gene <i>mcr-1</i>	65
Tabela 17. Dados dos isolados positivos para o gene <i>mcr-1.26</i> distribuídos em todo o mundo	67

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACs – Acetiltransferases
aEAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa atípica
aEPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica atípica
AIEC – *Escherichia coli* aderente-invasiva
AMR – Resistência antimicrobiana
ANTs – Nucleotidiltransferases
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APEC – *Escherichia coli* patogênica aviária
APHs – Fosfotransferases
ARGs – Genes de resistência aos antimicrobianos
BHI – *Brain Heart Infusion Broth*
BrCAST – *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
CAMHB – Caldo Mueller-Hinton cátion ajustado
CC – Complexo clonal
CDEC – *Escherichia coli cell-detaching*
CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*
DAEC – *Escherichia coli* de adesão difusa
DEC – *Escherichia coli* diarreio gênicas
DR – Sequências curtas repetidas
EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa
EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasiva
EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica
ESBL – β -lactamase de espectro estendido
ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica
EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
ExPEC – *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal
HGT – Transferência horizontal genes
Inc – Grupo de incompatibilidade
IRAS – Infecções relacionada à assistência a saúde
IRL – Regiões de repetições invertidas a esquerda
IRR – Regiões de repetições invertidas a direita
IRs – Regiões de repetições invertidas
ISs – Sequências de inserção
LB – *Luria Bertani Broth*
LPS – Lipopolissacarídeo
MDR – Multidroga resistentes
MGEs – Elementos genéticos móveis
MHA – Ágar Mueller-Hinton
MLST – *Multilocus Sequence Typing*
NMEC – *E. coli* associada à meningite neonatal
OMS – Organização Mundial da Saúde
pAmpC – AmpC plasmidial
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PMQR – Resistência às quinolonas mediada por plasmídeos
QRDR – Regiões determinantes de resistência às quinolonas

SEPEC – *E. coli* de septicemia
ST – Sequência tipo
STEC – *E. coli* produtora de toxina Shiga
tEAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa típica
tEPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica típica
UPEC – *E. coli* uropatogênica
VTEC – *E. coli* produtora de verocitotoxina
WGS – Sequenciamento completo de genoma
WT – Linhagem selvagem

LISTA DE SÍMBOLOS

- β** – Beta
- ®** – Marca registrada
- ™** – *Trademark*
- °C** – Graus Celsius
- ±** – Mais ou menos
- %** – Porcento
- ~** – Aproximadamente
- +** – Mais; positivo
- =** – Igual
- >** – Maior
- ≥** – Maior ou igual
- <** – Menor
- μL** – Microlitro
- μM** – Micromolar
- L** – Litro
- kb** – Quilo bases
- M** – Molar
- mM** – Milimolar
- mg** – Miligrama
- mL** – Mililitro
- ng** – Nanograma
- nm** – Nanômetro
- pb** – Pares de base
- U** – Unidade de atividade enzimática

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
LISTA DE SÍMBOLOS	vii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 A emergência da resistência antimicrobiana	2
1.1.1 A importância do meio ambiente na AMR.....	6
1.2 <i>Escherichia coli</i>	8
1.2.1 AMR em <i>E. coli</i>	11
1.3 Mobilização de ARGs	19
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Amostras de solo e obtenção dos isolados.....	26
3.2 Amostras de água e obtenção dos isolados.....	27
3.3 Extração do DNA genômico.....	28
3.4 Identificação molecular dos isolados.....	28
3.4.1 Gene <i>16S rRNA</i>	28
3.4.1.1 Condições das reações em cadeia da polimerase.....	29
3.4.1.2 Eletroforese horizontal em gel de agarose.....	29
3.4.1.3 Sequenciamento dos produtos amplificados por PCR.....	29
3.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	30
3.5.1 Método de disco-difusão	30
3.5.2 Método de microdiluição em caldo	31
3.6 Detecção dos ARGs.....	31
3.7 Identificação de mutações em determinantes de resistência aos antimicrobianos	34
3.8 Detecção dos genes de virulência.....	34
3.9 Tipagem plasmidial e detecção de integrons	36
3.10 Tipagem e subtipagem de <i>E. coli</i>	37
3.10.1 Grupos filogenéticos.....	37
3.10.2 <i>Multilocus Sequence Typing</i>	37
3.10.3 <i>FimH-type</i>	38

3.11 Sequenciamento completo dos genomas	38
3.11.1 Detecção do resistoma e do viruloma.....	39
3.11.2 Análise e montagem dos plasmídeos.....	39
3.11.3 Tipagem e subtipagem de <i>E. coli</i> pelo WGS.....	40
4. RESULTADOS	42
4.1 Isolados obtidos de solo.....	42
4.2 Isolados obtidos de água.....	51
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
APÊNDICE	121

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 A emergência da resistência antimicrobiana

A descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming através da inibição de culturas bacterianas pelo fungo *Penicillium notatum*, atualmente denominado como *Penicillium chrysogenum*, bem como a purificação e a realização de testes clínicos em 1941 por Howard Florey e Ernest Chain trouxeram uma nova perspectiva para o tratamento das doenças infecciosas, as quais eram responsáveis por milhares de mortes em todo o mundo. Posteriormente, a produção em grande escala e a elevada utilização deste antibiótico ocasionaram uma importante redução nas taxas de mortalidade. Diante disso, o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1945 foi atribuído aos pesquisadores Alexander Fleming, Howard Florey e Ernest Chain. Nesta ocasião, Alexander Fleming alertou para o surgimento de bactérias resistentes à penicilina (FLEMING, 1929; AMINOV, 2010; GAYNES, 2017).

Com a utilização de técnicas semelhantes, a penicilina também foi isolada de outras espécies e muitos outros antibióticos, incluindo a estreptomicina, o cloranfenicol, a eritromicina e a vancomicina, foram descobertos nas décadas de 1950 e 1960, sendo este período conhecido como a “era de ouro”. No entanto, os pesquisadores não conseguiram manter o ritmo da descoberta de novos antibióticos devido a emergência de patógenos resistentes, o que ocasionou o fim desta era (ABRAHAM & CHAIN, 1988; NATHAN, 2004; AMINOV, 2010; GAYNES, 2017). Apesar disso, a descoberta dos antibióticos ainda permanece como um dos grandes marcos da medicina moderna; entretanto, o desenvolvimento da resistência antimicrobiana (AMR – do inglês *antimicrobial resistance*) tem sido muito mais rápida do que a descoberta e a produção de novos antimicrobianos, comprometendo grandemente o tratamento de infecções bacterianas e alertando para o início de uma “era pós-antibiótico” (CIMA, 2014; ASLAM et al., 2018).

Muitas espécies bacterianas desenvolveram a capacidade de resistir aos antimicrobianos muito antes dos seres humanos começarem a produzi-los em larga escala para prevenir e tratar doenças infecciosas. Estudos descreveram a presença de mecanismos de resistência em cavernas isoladas, ambientes e espécimes que foram preservados da contaminação bacteriana por atividades antropogênicas, reforçando a presença da AMR durante a “era pré-antibiótico” (D’COSTA et al., 2011; BHULLAR et al., 2012; PERRY et al., 2016; LUGLI et al., 2017). A introdução dos antimicrobianos nos sistemas de saúde

proporcionou pressões seletivas sem precedentes, especialmente nas microbiotas de seres humanos e de animais, bem como nos ambientes poluídos com antimicrobianos. Essa pressão promoveu a transferência horizontal de genes (HGT – do inglês *horizontal gene transfer*), incluindo os ARGs, para muitas espécies bacterianas, particularmente para aquelas consideradas patogênicas (ALLEN, 2010; DAVIES & DAVIES, 2010).

A AMR é definida como a capacidade de um micro-organismo de resistir aos efeitos dos antimicrobianos, que são substâncias químicas que possuem a capacidade de inibir o crescimento ou causar a morte dos micro-organismos. O surgimento e a rápida disseminação de patógenos multidroga resistentes (MDR – do inglês *multidrug-resistant*) ameaçam a capacidade de tratar infecções, uma vez que as opções terapêuticas disponíveis são significativamente reduzidas (PRESTINACI et al., 2015; ASLAM et al., 2018). Neste sentido, a problemática da AMR se sobressalta quando patógenos pan-resistentes, que também são conhecidos como superbactérias, emergem causando infecções que não são tratáveis com os antimicrobianos existentes. Em vista disso, a AMR emergiu como uma das principais ameaças à saúde e ao desenvolvimento do século XXI e está listada como uma das dez maiores ameaças à saúde pública pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (JINDAL et al., 2015; WHO, 2019b, 2021).

De acordo com um estudo encomendado pelo governo do Reino Unido, estima-se que aproximadamente 10 milhões de mortes irão ocorrer anualmente a partir de 2050, caso não sejam tomadas medidas restritivas. Além disso, os prejuízos econômicos estão estimados em aproximadamente 100 trilhões de dólares, no qual estão incluídos os valores associados às internações hospitalares mais longas e a necessidade de medicamentos mais caros (O'NEILL, 2016). Em 2019, a estimativa de mortes associadas a AMR em todo o mundo foi de ~ 5 milhões, enquanto que de mortes atribuídas foi de 1,3 milhão, mais do que HIV/aids e malária (ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2022). Diante disso, a OMS e diversos pesquisadores apoiaram que a disseminação da AMR é uma questão urgente que requer um plano de ação global e coordenado, como descrito no documento denominado “*Global action plan on antimicrobial resistance*”. Em consequência, se a AMR não for controlada, a sua disseminação pode tornar os patógenos bacterianos mais letais do que nos dias atuais (WHO, 2015; ASLAM et al., 2018; CDC, 2019; WHO, 2021; ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2022).

Os antimicrobianos utilizados nas medicinas humana e veterinária são categorizados como criticamente importantes, altamente importantes e importantes. Dentre os criticamente

importantes de maior prioridade se encontram as cefalosporinas de espectro estendido, os carbapenêmicos e as polimixinas. Estes antimicrobianos estão dentre os mais utilizados no tratamento de infecções causadas por patógenos MDR, com destaque para as polimixinas, mais especificamente a colistina, a qual é utilizada no tratamento de infecções causadas por patógenos resistentes aos carbapenêmicos (DOI, 2019; SHEU et al., 2019; WHO, 2019a). Perante o exposto, a OMS forneceu um alerta sobre a importância e o impacto da resistência a esses antimicrobianos para as autoridades envolvidas no gerenciamento da AMR, a fim de garantir que esses agentes sejam utilizados com prudência tanto na medicina humana quanto na veterinária (WHO, 2019a).

A OMS publicou uma lista de patógenos para os quais novos antimicrobianos são urgentemente necessários. Esta lista é dividida em três categorias de acordo com o grau de urgência: prioridade crítica, alta e média. A lista contém diversas espécies Gram-negativas e Gram-positivas, as quais representam uma grande ameaça à saúde humana devido à gravidade das infecções causadas por essas bactérias associada à falta de antimicrobianos eficazes (WHO, 2017; LERMINIAUX & CAMERON, 2019). Dentre esses patógenos, a maioria é listada como resistentes aos antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas de espectro estendido e os carbapenêmicos, e as fluorquinolonas. O grupo mais crítico de todos inclui as espécies MDR da família *Enterobacteriaceae*, destacando *Escherichia coli* e os gêneros *Klebsiella*, *Serratia* e *Proteus*, e ainda *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (VAN DUIN & PATERSON, 2016; WHO, 2017).

A AMR não se restringe aos ambientes hospitalares, uma vez que diversos estudos já reportaram que os animais, os alimentos e o meio ambiente contribuem para a disseminação e para a manutenção da AMR, sendo, portanto, um problema de Saúde Única (do inglês *One Health*) (BERENDONK et al., 2015; MCEWEN & COLLIGNON, 2018; TIEDJE et al., 2019). Além disso, a disseminação das bactérias MDR por diferentes áreas geográficas constitui um problema global de saúde pública (**Figura 1**) (HERNANDO-AMADO et al., 2019). Essa problemática está intimamente relacionada com o uso intensivo de antimicrobianos na saúde humana e animal, evidenciando o uso profilático em animais saudáveis e o uso como promotores de crescimento em animais da cadeia produtora de alimentos (GONZÁLEZ-ZORN & ESCUDERO, 2012; ASLAM et al., 2021).

No Brasil, a fim de conter a AMR, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em parceria com a Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública e com a Organização Pan-Americana da Saúde implementaram em 2005 a Rede Nacional de

Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde. Adicionalmente, a ANVISA criou a RDC nº 44 de 2010 que garante a venda de antimicrobianos apenas com prescrição médica, enquanto que, em 2016, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento proibiu o uso do sulfato de colistina como aditivo na composição de rações para os animais da cadeia produtora de alimentos (ANVISA, 2010; MAPA, 2016). Em 2018 foi elaborado o Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única, o qual é coordenado pelo Ministério da Saúde. No geral, as estratégias para a contenção da AMR visam sobretudo o fortalecimento do conhecimento por meio de vigilância e de pesquisa e a garantia da prevenção e o do tratamento de infecções bacterianas de forma recomendada (WHO, 2015; MAPA, 2016; MS, 2018).

O conceito de Saúde Única pode ser definido como uma abordagem interdisciplinar entre a saúde humana, animal e ambiental. Este conceito é antigo e ganhou força quando os estudos se concentraram na relação da saúde humana e animal, com a consequente criação pelo médico alemão Rudolf Virchow do termo “zoonose”, que indica a transmissão de patógenos, incluindo os MDR, entre animais e seres humanos (ATLAS, 2013; GYLES, 2016). Os animais e os seres humanos estão perenemente em contato direto ou indireto com os antimicrobianos, o que contribui para a seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos e para a presença das mesmas nas suas microbiotas. Como consequência ocorrem interações, as quais são normalmente prolongadas devido ao insucesso das terapias antimicrobianas (BERENDONK et al., 2015; MAEUSLI et al., 2020). Nesse sentido, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, a Organização Mundial da Saúde Animal e a OMS desenvolveram estratégias e reforçaram a importância da abordagem interdisciplinar na contenção da AMR (FAO/OIE/WHO, 2017).

Por fim, novas abordagens terapêuticas, redução da pressão seletiva de antimicrobianos, redução da transmissão de bactérias resistentes aos antimicrobianos e dos genes de resistência aos antimicrobianos (ARGs – do inglês *antimicrobial resistance genes*) e a restauração de populações bacterianas suscetíveis aos antimicrobianos podem ajudar a reduzir a AMR dentre os eixos “Saúde Única” e “Saúde Global” (GIL-GIL et al., 2019; HERNANDO-AMADO et al., 2019).

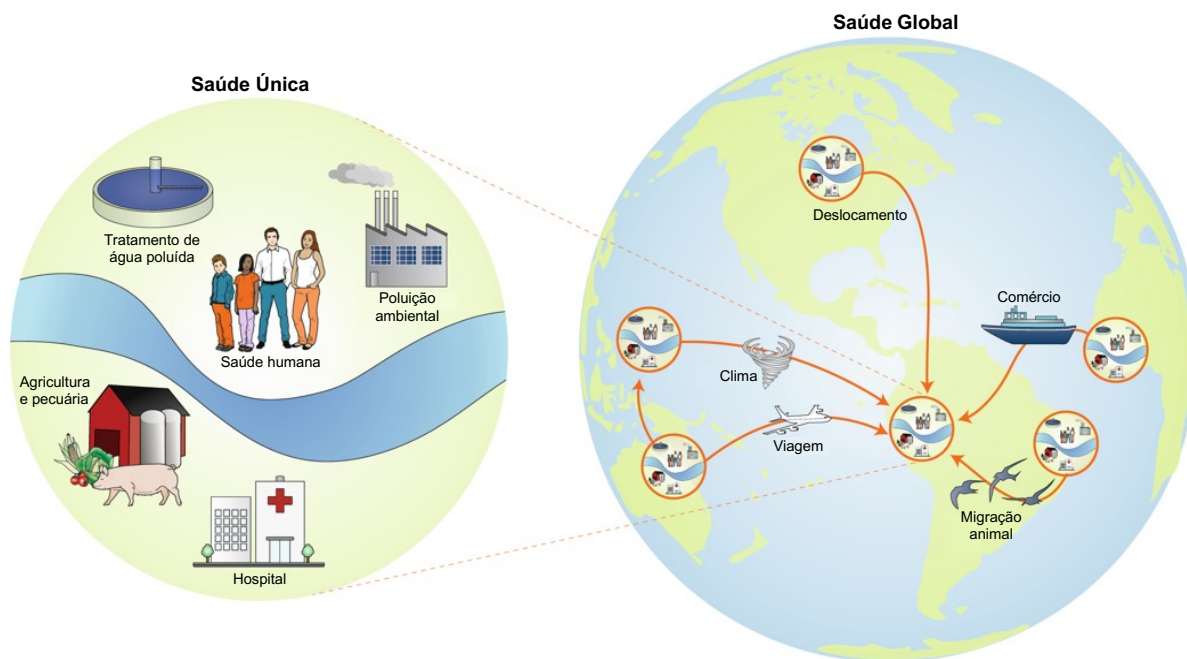


Figura 1. Os eixos “Saúde Única” e “Saúde Global” da AMR.
Adaptado de HERNANDO-AMADO et al. (2019).

1.1.1 A importância do meio ambiente na AMR

O meio ambiente é afetado vigorosamente pela poluição decorrente da presença de antimicrobianos, de biocidas, de metais e de outras substâncias que são capazes de selecionar bactérias resistentes aos antimicrobianos e seus ARGs, ocasionando desequilíbrios na microbiota ambiental com graves consequências para todos os nichos ecológicos. De forma complementar, a imensa diversidade da microbiota ambiental pode fornecer genes que potencialmente podem ser adquiridos e utilizados por patógenos para neutralizar o efeito dos antimicrobianos (MATHER et al., 2013; LEEKITCHAROENPHON et al., 2016; LARSSON & FLACH, 2022). Portanto, o meio ambiente fornece uma diversidade gênica incomparável, a que excede em muito a microbiota dos seres humanos e dos animais (HERNANDO-AMADO et al., 2019). Diante disso, o meio ambiente é considerado um grande reservatório e um importante disseminador da AMR (BERENDONK et al., 2015; HEBß et al., 2018; MCEWEN & COLLIGNON, 2018).

Os ARGs são originados na grande maioria das vezes por bactérias ambientais, especialmente as bactérias do solo, que sabidamente co-evoluíram com os micro-organismos produtores de antibióticos (D’COSTA et al., 2011; NESME et al., 2014). No entanto, normalmente ocorre um grande intervalo de tempo entre o uso clínico de um antimicrobiano e

o aparecimento de ARGs clinicamente relevantes abrigados por elementos genéticos móveis (MGEs – do inglês *mobile genetic elements*) em patógenos bacterianos (LEWIS, 2013). Como exemplo, são conhecidas as espécies dos gêneros *Kluyvera*, *Shewanella* e *Aeromonas*. Algumas espécies do gênero *Kluyvera*, que fazem parte da microbiota ambiental, são as progenitoras do gene *bla*_{CTX-M} que codifica a β -lactamase de espectro estendido (ESBL – do inglês *extended-spectrum β -lactamase*) mais prevalente mundialmente (HUMENIUK et al., 2002; CANTÓN et al., 2012; D'ANDREA et al., 2013). As espécies dos gêneros *Shewanella* e *Aeromonas* foram descritas como progenitoras dos genes *qnrA*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-7*, os quais estão envolvidos na resistência às fluorquinolonas e às polimixinas (POIREL et al., 2005; CARATTOLI et al., 2017; YIN et al., 2017; YANG et al., 2018). Atualmente, o gene *bla*_{CTX-M} está intimamente relacionado com clones potencialmente patogênicos de diversos gêneros bacterianos, destacando os clones de alto risco (MATHERS et al., 2015; WYRES & HOLT, 2018) e está presente em diversos tipos de plasmídeos, resultando em uma ampla disseminação dentre os hospitais, os animais e o meio ambiente (CARATTOLI, 2013; WOERTHER et al., 2013).

BERGLUND et al. (2017) descreveram que diversos novos genes codificadores de metalo- β -lactamases, os quais conferem resistência principalmente aos carbapenêmicos, estão intimamente relacionados aos genes cromossômicos das espécies do gênero *Shewanella* e localizados em contextos genéticos que sugerem que podem ser transferíveis horizontalmente. Em ambientes aquáticos, a presença de integrons de classe 1 contendo o gene *sull*, que confere resistência às sulfonamidas, e a suscetibilidade reduzida para alguns antimicrobianos foram descritas em espécies de cianobactérias do gênero *Planktothrix*, que são frequentemente suscetíveis aos antimicrobianos, indicando o compartilhamento de ARGs com bactérias resistentes aos antimicrobianos oriundas de fontes externas. Esta descoberta chama a atenção para uma possível substituição da comunidade suscetível por uma resistente e para disseminação de ARGs para a microbiota residente (YU et al., 2017; DIAS et al., 2019).

A disseminação de bactérias MDR e seus ARGs do meio ambiente pode ocorrer pelo contato ou pelo consumo de águas e alimentos contaminados. A grande maioria dos ARGs em *Enterobacteriaceae* é transmitida por plasmídeos. Portanto, a capacidade de disseminação desses genes dentre nichos ecológicos está estreitamente ligada a estes elementos (WYRES & HOLT, 2018; ROZWANDOWICZ et al., 2018). Adicionalmente, as comunidades microbianas ambientais são consideradas *hotspots* para HGT (POPA et al., 2011; KLÜMPER et al., 2015). Assim, as *Enterobacteriaceae* MDR, incluindo *E. coli* carregando ARGs e

plasmídeos de resistência, podem se disseminar por diferentes fontes ambientais e hospedeiros, os quais podem capturar materiais genéticos de diversos doadores e retê-los por tempo suficiente para transmiti-los para novos receptores (**Figura 2**) (LÖHR et al., 2015; WYRES & HOLT, 2018; ANJUM et al., 2021).

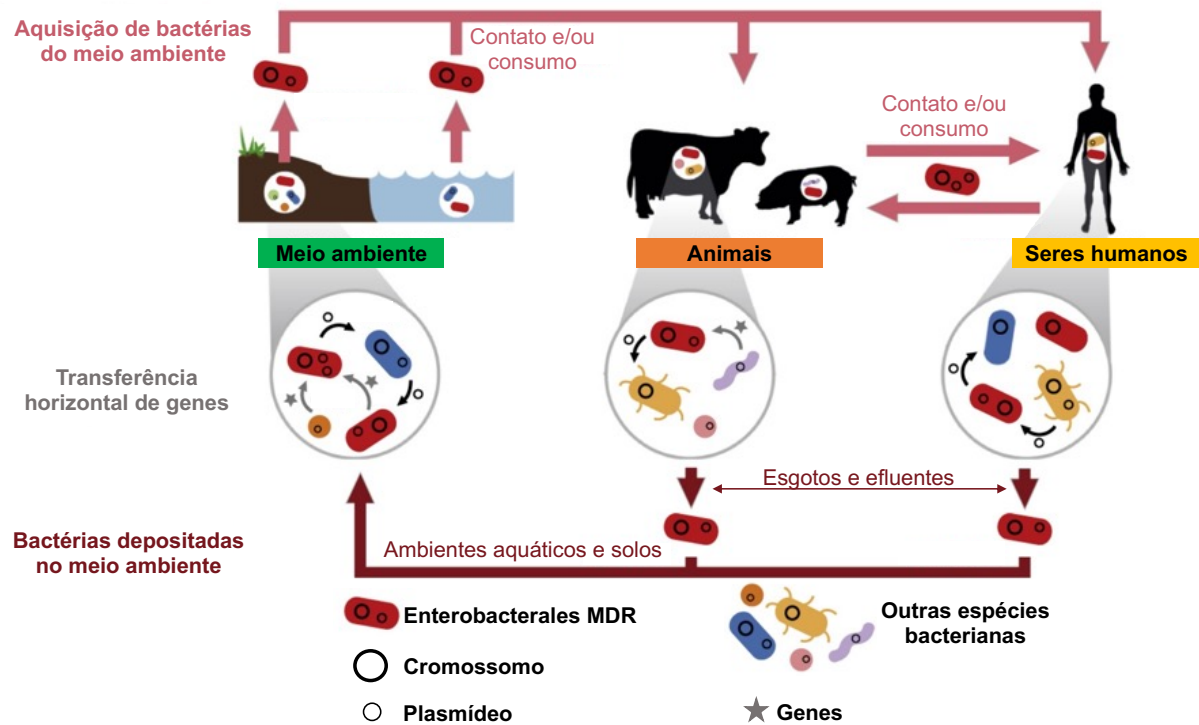


Figura 2. Dispersão de bactérias MDR e seus ARGs no meio ambiente.
Adaptado de WYRES & HOLT (2018).

1.2 *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria versátil pertencente ao filo Proteobacteria, a ordem Enterobacterales e a família *Enterobacteriaceae*. Esta espécie foi descrita pela primeira vez em 1885 pelo médico alemão Theodor Escherich, e foi isolada de uma amostra de fezes de uma criança com diarreia, denominando-a *Bacterium coli commune* (ESCHERICH, 1885; SHULMAN et al., 2007; ADEOLU et al., 2016). Em 1895, *B. coli commune* foi designada como *Bacillus coli* e renomeada em 1919 para *E. coli*, sendo oficialmente reconhecida em 1958, estabelecendo-se *Escherichia* como um gênero e *E. coli* como a primeira espécie deste gênero. Desde sua descoberta, *E. coli* tem sido um dos micro-organismos mais estudados, servindo como um dos modelos fundamentais em microbiologia e biologia molecular (HENRY, 2015; YU et al., 2021).

Tais bactérias são classificadas como bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, mesófilos (temperatura ótima de crescimento em torno de 37 °C), catalase-positivos, oxidase-negativos, não formadores de endósporos, fermentadores de glicose e de lactose com a produção de ácido e gás, capazes de utilizar a D-glicose como única fonte de carbono e energia, não utilizam citrato como fonte de carbono, produzem indol, reduzem nitratos a nitritos, dentre outras (PHE, 2014). Dentre as espécies da família *Enterobacteriaceae*, *E. coli* é a mais predominante no trato gastrointestinal de seres humanos e de animais, desempenhando benefícios aos hospedeiros, tais como a síntese de ácidos graxos e vitaminas K e do complexo B. Além disso, essa espécie também compete com bactérias patogênicas por sítios de colonização no trato gastrointestinal (ASM, 2011; YU et al., 2021).

Por outro lado, algumas linhagens de *E. coli* são classificadas como patogênicas devido à presença de determinantes de virulência, e podem ser classificadas em diversos patotipos. Diante disso, as linhagens patogênicas que causam infecções do trato gastrointestinal são denominadas *E. coli* diarreio gênicas (DEC – do inglês *diarrheagenic E. coli*), enquanto que as linhagens que causam infecções extraintestinais são denominadas *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC – do inglês *extraintestinal pathogenic E. coli*). Assim, as linhagens DEC podem causar infecções com quadros diarreicos leves e graves e as ExPEC podem causar diversos tipos de infecções, destacando as infecções do trato urinário e da corrente sanguínea (NATARO & KAPER, 1998; JOHNSON et al., 2003; KAPER et al., 2004; MAINIL et al., 2013; DALE & WOODFORD, 2015; GOMES et al., 2016; BRAZ et al., 2020).

Os patotipos de DEC diferem principalmente em relação aos seus determinantes de virulência relacionados a aderência e/ou propriedades tóxicas, e pelas suas consequências clínicas, sendo eles: *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), que também pode ser referida como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora de verocitotoxina (VTEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adesão difusa (DAEC), *E. coli* aderente-invasiva (AIEC) e *E. coli cell-detaching* (CDEC) (NATARO & KAPER, 1998; GOMES et al., 2016; BRAZ et al., 2020). Dentre esses patotipos, o EHEC e o VTEC são subcategorias do STEC, enquanto que o EAEC e o EPEC são divididos em típicos (tEAEC/tEPEC) e atípicos (aEAEC/aEPEC). O patotipo STEC é inferido devido à presença dos genes *stx1* e/ou *stx2* (toxina Shiga), enquanto que o EHEC/VTEC, além desses genes, apresentam principalmente o gene *ehxA* (entero-hemolisina), o gene *vt* (verotoxina), o sorotipo O157:H7

e/ou o plasmídeo pO157. Os patótipos EAEC e EPEC são classificados como típicos devido a presença dos genes *aggR* e *bfpA*, respectivamente, os quais também são considerados mais virulentos do que os atípicos (NGUYEN & SPERANDIO, 2012; DUTTA et al., 2013; GOMES et al., 2016; GUERRIERI et al., 2019; SNEHAA et al., 2021).

As linhagens ExPEC compartilham uma grande variedade de genes de virulência associados com as adesinas, as toxinas, as invasinas, os sideróforos, dentre outros, e podem ser classificadas como *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* de septicemia (SEPEC), *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* patogênica aviária (APEC) (JOHNSON et al., 2003, 2008; MANGES et al., 2019; SAROWSKA et al., 2019). Devido às características em comum dentre esses patótipos, JOHNSON et al. (2003) propuseram a classificação das linhagens ExPEC baseada na presença de ≥ 2 dos genes *pap* (fimbrias P), *sfa/foc* (fimbrias S/F1C), *afa/dra* (adesinas Afa/Dr), *iutA* (receptor de aerobactina) e *kpsMT II* (síntese de cápsula polissacarídica). Especialmente em aves, as linhagens APEC causam colibacilose, enteritites e síndrome da cabeça inchada, comprometendo a produção avícola e serem responsáveis por grandes perdas econômicas (AL-KANDARI & WOODWARD, 2019). Além disso, a HGT entre diferentes linhagens de *E. coli* favorece o surgimento de linhagens de *E. coli* patogênica híbrida, incluindo EAEC-STEC, STEC-ExPEC e ExPEC-EAEC, que emergiram como patógenos responsáveis por surtos de diarreia sanguinolenta (BIELASZEWSKA et al., 2011; BRAZ et al., 2020).

Tanto as linhagens comensais quanto as DEC e ExPEC podem ser transmitidas aos seres humanos e aos animais através da ingestão de águas contaminadas. De forma complementar, o consumo de alimentos contaminados, principalmente aqueles de origem animal, verduras e legumes, desempenha um papel importante na contaminação dos seres humanos. Assim, *E. coli* é utilizada como um indicador universal de contaminação fecal em ambientes aquáticos e em alimentos, e a ocorrência dessas linhagens pode ainda indicar a contaminação por outros enteropatógenos (**Figura 3**) (ROCHELLE-NEWALL et al., 2015; VILA et al., 2016). O aumento da identificação de linhagens de DEC e de ExPEC resistentes aos antimicrobianos levanta preocupações. Essas linhagens apresentam resistência normalmente aos β -lactâmicos, exceto aos carbapenêmicos, às tetraciclinas e às sulfonamidas, podendo ocasionar o fenótipo MDR. Ademais, a resistência aos carbapenêmicos e às polimixinas já foi identificada nessas linhagens, o que se torna ainda mais preocupante. Diante de tal heterogeneidade, essa espécie demonstra uma ampla diversidade clonal,

evidenciando os clones de alto risco (CYOIA et al., 2019; MERIDA-VIEYRA et al., 2019; ELTAI et al., 2020; GONG et al., 2020).

1.2.1 AMR em *E. coli*

E. coli é intrinsecamente suscetível a quase todos os antimicrobianos clinicamente relevantes. No entanto, esta espécie possui uma grande capacidade de adquirir e transferir ARGs através da HGT. Os mecanismos mais preocupantes em *E. coli* correspondem à aquisição de ARGs responsáveis pela resistência aos β -lactâmicos, polimixinas, fluorquinolonas e/ou aminoglicosídeos (IREDELL et al., 2016; POIREL et al., 2018). A disseminação dos ARGs relacionados com a resistência aos carbapenêmicos e as polimixinas é reconhecida principalmente nos setores humano e animal, respectivamente, enquanto que para os outros antimicrobianos, a dispersão desses genes ocorre através da transferência cruzada desses setores (**Figura 3**). Adicionalmente, as linhagens de *E. coli* de origem animal normalmente apresentam uma maior prevalência de resistência aos antimicrobianos das classes das tetraciclinas, sulfonamidas e fenicóis (POIREL et al., 2017, 2018; HAMMOUDI HALAT & AYOUB MOUBARECK, 2020; ZHAO et al., 2021).

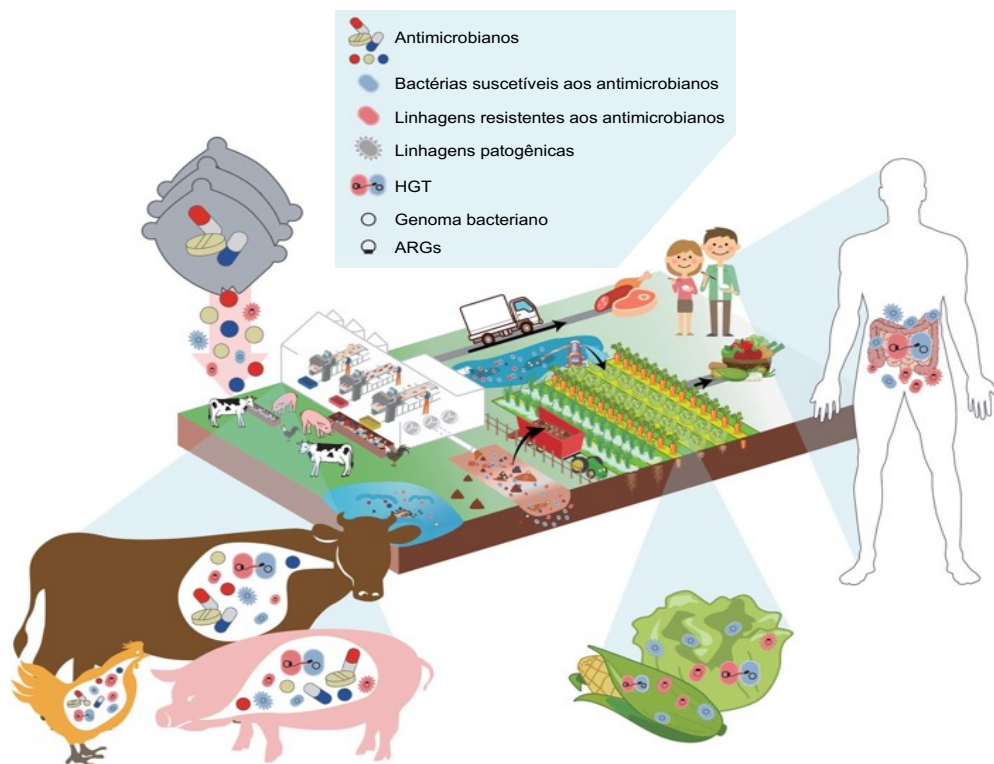


Figura 3. Vias de transmissão de linhagens de *E. coli* e ARGs.
Adaptado de ZHAO et al. (2021).

Os β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos) estão dentre os principais antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções causadas por *E. coli*. Esses antimicrobianos inibem a síntese do peptidoglicano, os quais são responsáveis pelo formato e pela rigidez da parede celular e por proteger contra o choque osmótico (BUSH & BRADFORD, 2016; LIMA et al., 2020). Os β -lactâmicos possuem um anel β -lactâmico em comum, no qual se ligam as transpeptidases responsáveis pela etapa de transpeptidação na síntese do peptidoglicano. Por outro lado, a produção das enzimas β -lactamases é o principal mecanismo de resistência a esses antimicrobianos, os quais hidrolisam o anel β -lactâmico, impedindo que os antimicrobianos se liguem às transpeptidases (SCHNEIDER & SAHL, 2010; BUSH, 2010; BUSH & JACOBY, 2010; EIAMPHUNGORN et al., 2018; TOOKE et al., 2019).

As β -lactamases, codificadas pelos genes *bla*, podem ser classificadas com base na similaridade entre as sequências de aminoácidos e foram divididas dentre as classes A, B, C e D, ou pelas características enzimáticas e pelos perfis de inibição por inibidores de β -lactamases, sendo divididas dentre os grupos 1, 2, 3 e 4 com subdivisões (AMBLER, 1980; BUSH, 1995; BUSH & JACOBY, 2010). As classes A, C e D possuem o aminoácido serina no centro ativo da enzima e são denominadas serina- β -lactamases, enquanto que a classe B utiliza o zinco como cofator para sua atividade e agrupa as metalo- β -lactamases (AMBLER, 1980). A classificação de Bush, Jacoby e Medeiros de 1995 foi atualizada por Bush e Jacoby em 2010, agrupando as β -lactamases nos grupos funcionais 1, 2 e 3 (BUSH et al., 1995; BUSH & JACOBY, 2010).

O grupo 1 é composto pelas β -lactamases do tipo AmpC e é representado principalmente pela enzima AmpC plasmidial (pAmpC) CMY, enquanto que outras são codificadas por genes cromossômicos (*bla*_{AmpC}) com hiperprodução induzível pela exposição aos β -lactâmicos, e são encontradas em diversas espécies da família *Enterobacteriaceae* (JACOBY, 2009; RUBIN & PITOUT, 2014). Em *E. coli*, as β -lactamases do tipo AmpC estão intimamente relacionadas com a resistência às penicilinas, às cefamicinas e às cefalosporinas de espectro restrito e não são inibidas pelo ácido clavulânico. Algumas variantes de CMY, como a CMY-33 e a CMY-37, podem conferir resistência às cefalosporinas de espectro estendido e ao aztreonam, e são denominadas como β -lactamases do tipo AmpC de espectro estendido (do inglês *extended-spectrum AmpC β -lactamases*) (AHMED & SHIMAMOTO, 2008; BUSH & JACOBY, 2010; PIRES et al., 2015; TOOKE et al., 2019). A β -lactamase CMY-2 é comumente reportada em isolados de *E. coli* obtidos de

animais da cadeia produtora de alimentos e seus derivados, representando a pAmpC mais prevalente (PIETSCH et al., 2018; KOGA et al., 2019).

O grupo 2 compõe o maior número de serina- β -lactamases, sendo representado principalmente pelas β -lactamases TEM, SHV, CTX-M, OXA e KPC. As β -lactamases do subgrupo 2b, com destaque para TEM-1 e SHV-1, hidrolisam as penicilinas e as cefalosporinas de espectro restrito e são inibidas pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam. Já os subgrupos 2be, 2br e 2ber são compostos por algumas variantes de TEM e SHV e pelas CTX-M, sendo denominadas de ESBL, uma vez que hidrolisam as cefalosporinas de espectro estendido e o aztreonam, mas não as cefamicinas. As β -lactamases do subgrupo 2be (TEM-3, SHV-2, CTX-M) são inibidas pelo ácido clavulânico, o qual é utilizado como um recurso na detecção laboratorial, enquanto que aquelas pertencentes ao subgrupo 2br (TEM-30, SHV-10) não são inibidas pelo ácido clavulânico. Além disso, a variante TEM-50 pertence ao subgrupo 2ber, que além do potencial de ESBL, possui resistência à inibição do ácido clavulânico (BUSH & JACOBY, 2010; SALVERDA et al., 2010; TOOKE et al., 2019; BUSH & BRADFORD, 2020; CASTANHEIRA et al., 2021).

Dentre as β -lactamases do grupo 2, a TEM-1 já está disseminada mundialmente em isolados de *E. coli* obtidos da interface humana, animal e ambiental, enquanto que as outras variantes de TEM e SHV, incluindo aquelas classificadas como ESBL, são reportadas com menor frequência e estão intimamente relacionadas com isoladas obtidos de animais da cadeia produtora de alimentos (COHEN STUART et al., 2012; KOLA et al., 2012; LIAKOPOULOS et al., 2016; POIREL et al., 2018). As enzimas CTX-M são as ESBLs mais prevalentes em *E. coli*. Devido a sua ampla disseminação e a grande quantidade de variantes, essas enzimas adquiriram um caráter pandêmico. No Brasil, as variantes CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9 já foram prevalentes e, atualmente, a CTX-M-15 tem substituído essas variantes e é considerada a mais importante clinicamente, além de ser detectada em animais e no meio ambiente (SILVA & LINCOPAN, 2012; GUZMÁN-BLANCO et al., 2014; GHAFOURIAN et al., 2015; ROCHA et al., 2016; BUSH & BRADFORD, 2020; CASTANHEIRA et al., 2021).

Os subgrupos 2d, 2de e 2df compõe as β -lactamases do tipo OXA que hidrolisam mais rapidamente a oxaciclina do que as outras penicilinas. Algumas variantes do subgrupo 2de, tais como OXA-11 e OXA-15, possuem um potencial de ESBL, podendo hidrolisar as cefalosporinas de espectro estendido e o aztreonam. As variantes do subgrupo 2df, tais como OXA-23 e OXA-48, podem hidrolisar os carbapenêmicos. Essas β -lactamases possuem a

inibição variável pelo ácido clavulânico (TOOKE et al., 2019; BUSH & JACOBY, 2010; EVANS & AMYES, 2014). No geral, as β -lactamases do tipo OXA são identificadas principalmente em bacilos Gram-negativos não fermentadores. No entanto, a presença dessas β -lactamases em *E. coli* já foi reportada principalmente em isolados clínicos (EVANS & AMYES, 2014; LIVERMORE et al., 2019; BUSH & BRADFORD, 2020; GURUNG et al., 2020).

O subgrupo 2f é representado pelas serina-carbapenemases, realçando a KPC que confere resistência a todos os antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, e podem ser melhor inibidas pelo tazobactam do que pelo ácido clavulânico (TOOKE et al., 2019; BUSH & JACOBY, 2010). Embora a KPC tenha sido detectada pela primeira vez em *K. pneumoniae*, essa β -lactamase se disseminou rapidamente para diversas outras espécies bacterianas, incluindo *E. coli*. A KPC é a serina-carbapenemase mais detectada em todo o mundo e é um grande problema em infecções nosocomiais (QUEENAN & BUSH, 2007; MATHERS et al., 2015; HAMMOUDI HALAT & AYOUB MOUBARECK, 2020). A princípio, a KPC-2 emergiu nos hospitais brasileiros em 2005 e, posteriormente, se tornou recorrente nas infecções relacionada à assistência a saúde (IRAS) (PAVEZ et al., 2009; PEIRANO et al., 2009; PEREIRA et al., 2013; TOLENTINO et al., 2019). Por outro lado, a KPC-2 já foi reportada em *E. coli* causando infecção urinária em um animal de companhia, representando um novo desafio para os clínicos veterinários (SELLERA et al., 2018). Adicionalmente, clones de alto risco foram identificados carreando a KPC-2 em ambientes aquáticos (OLIVEIRA et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2017).

O subgrupo 3 compõe as metalo- β -lactamases que hidrolisam todos os antimicrobianos β -lactâmicos, exceto o aztreonam, e não são inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam (TOOKE et al., 2019; BUSH & JACOBY, 2010). Diante do exposto, do ritmo acelerado em que novas variantes são descritas e da sua disseminação em fontes hospitalares e ambientais, essas enzimas chamam a atenção e levantam preocupações. As principais metalo- β -lactamases são NDM, IMP e VIM, as quais são frequentemente reportadas em bacilos Gram-negativos não fermentadores, destacando a *P. aeruginosa*. No entanto, *E. coli* e *K. pneumoniae* despontam entre as principais *Enterobacteriaceae* que carregam essas enzimas. A NDM é disseminada mundialmente, enquanto que a IMP e a VIM são predominantes no sudeste da Ásia e nos países da Europa banhados pelo Mediterrâneo (TOOKE et al., 2019; BUSH & BRADFORD, 2020; MOJICA et al., 2016, 2022). No Brasil, essas metalo- β -

lactamases já foram identificadas principalmente em isolados clínicos (NEVES et al., 2019; SCAVUZZI et al., 2019; FIRMO et al., 2020; WINK et al., 2021).

As polimixinas são polipeptídeos catiônicos cíclicos e constituem um grupo de cinco agentes (A, B, C, D, E), sendo que devido a alta toxicidade desses agentes, apenas as polimixinas B e E (colistina) são utilizadas para fins terapêuticos. Devido a alta nefrotoxicidade, esses antimicrobianos foram descontinuados entre 1970 e 1980, mas tiveram que ser reintroduzidos nos anos 2000 devido a ocorrência de patógenos MDR, especialmente aqueles resistentes aos carbapenêmicos. Assim, esses antimicrobianos são considerados como último recurso terapêutico no combate de infecções por bactérias produtoras de carbapenemases (FALAGAS & KASIAKOU, 2005; RHOUMA & LETELLIER, A, 2017; ANDRADE et al., 2020). Esses antimicrobianos interagem com o lipídeo A do lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa das bactérias Gram-negativas, desestabilizando os íons de cálcio e magnésio que são necessários para a sua estabilidade. Por consequência, ocorre um aumento da permeabilidade celular com extravasamento do conteúdo celular e, por fim, a morte da bactéria (FALAGAS et al., 2010; EL-SAYED AHMED et al., 2020).

Os mecanismos de resistência a esses antimicrobianos ainda não foram totalmente elucidados, mas sabe-se que existem mecanismos primários e secundários envolvidos nas modificações do LPS, superexpressão de sistemas de efluxo e modificações nas porinas. Em *E. coli*, o principal mecanismo de resistência constitui nas modificações no lipídeo A do LPS que resultam na alteração da carga negativa do LPS, dificultando a interação do antimicrobiano com a bactéria (GRÉGOIRE et al., 2017; POIREL et al., 2017). Os sistemas de dois componentes PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB que regulam positivamente o operon *arn*, responsável pelas modificações no LPS, bem como no regulador negativo MgrB que controla a fosforilação de PhoP e a ativação do sistema PmrA/PmrB, são os principais alvos cromossômicos relacionados com a resistência a esses antimicrobianos (OLAITAN et al., 2014; QUESADA et al., 2015; EL-SAYED AHMED et al., 2020; GOGRY et al., 2021; BINSKER et al., 2022).

Em um estudo publicado em 2016, Liu e colaboradores descreveram o primeiro mecanismo transferível responsável pela resistência às polimixinas, o qual é codificado pelo gene *mcr-1* (LIU et al., 2016). Posteriormente, novos genes *mcr* (*mcr-2* ao *mcr-10*; março de 2022) foram descritos e chamaram a atenção para estudos urgentes de vigilância epidemiológica (DALMOLIN et al., 2018; LEI et al., 2010; LING et al., 2020). Diante disso,

a rápida disseminação de bactérias MDR, incluindo *E. coli*, carregando principalmente o gene *mcr-1* e outros ARGs clinicamente relevantes em diferentes fontes causaram um sério problema de saúde pública (OVEJERO et al., 2017; JIN et al., 2018; WANG et al., 2018). Dentre os genes *mcr*, o *mcr-1* é o mais prevalente e o que mais possui alelos (*mcr-1.1* ao *mcr-1.34*; março de 2022) e vem sendo reportado amplamente em seres humanos e animais em todo o mundo (WISE et al., 2018; PARTRIDGE et al., 2018a; ANYANWU et al., 2020).

No Brasil, o gene *mcr-1* foi descrito pela primeira vez em 2016 em linhagens de *E. coli* recuperadas de animais da cadeia produtora de alimentos entre 2012 e 2013 (FERNANDES et al., 2016a). Posteriormente, esse gene foi detectado em diferentes espécies, incluindo *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Salmonella* sp., obtidas de diferentes fontes (FERNANDES et al., 2016b, 2017; CONCEIÇÃO-NETO et al., 2017; RAU et al., 2018). Os outros genes *mcr* também já foram identificados, mas em uma frequência bem menor quando comparada com a do gene *mcr-1* (**Figura 4A**) (FERNANDES et al., 2018; KIEFFER et al., 2018; LEITE, et al., 2020; MARTINS-SORENSEN et al., 2020). No meio ambiente, os genes *mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* e *mcr-7* já foram detectados a partir de DNA total, enquanto que o gene *mcr-1* foi identificado em linhagens de *E. coli* MDR recuperadas de amostras de água e de solo (**Figura 4B**) (OLIVEIRA et al., 2019; FURLAN et al., 2020a, 2020b; LOPES et al., 2021b; CORDEIRO-MOURA et al., 2022; FURLAN et al., 2022a).

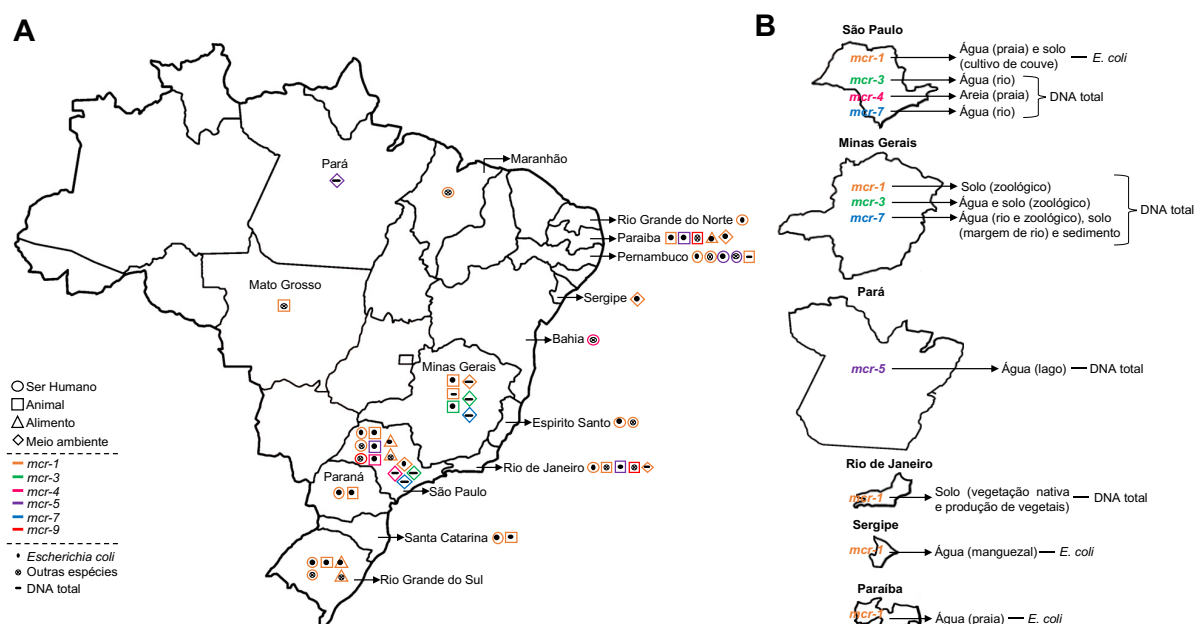


Figura 4. Visão geral dos genes *mcr* no Brasil de acordo com publicações em periódicos indexados no PubMed entre 2016 e março de 2022.

A. Distribuição dos genes *mcr* por estados e suas as fontes de isolamento. **B.** Descrição dos genes *mcr* recuperados de amostras ambientais (FURLAN, 2022; Autoria própria).

As fluorquinolonas e o ácido nalidíxico (quinolona) são importantes antimicrobianos utilizados principalmente no tratamento de infecções do trato urinário causadas por *E. coli*. Esses antimicrobianos atuam inibindo a DNA girase e a topoisomerase IV, as quais estão envolvidas na síntese do DNA bacteriano, mas especificamente no processo de replicação do DNA (BLONDEAU, 2004; FÀBREGA et al., 2009). Em *E. coli*, a resistência a estes antimicrobianos ocorre geralmente por modificações no sítio alvo devido a mutações nas subunidades da DNA girase (GyrA) e da topoisomerase IV (ParC e ParE) que fazem parte das regiões determinantes de resistência às quinolonas (QRDR – do inglês *quinolone resistance-determining regions*). Adicionalmente, mecanismos de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos (PMQR – do inglês *plasmid-mediated quinolone resistance*) também podem estar envolvidos na resistência ou na suscetibilidade reduzida a esses antimicrobianos, tais como: i) as proteínas Qnr que protegem o DNA da ligação desses agentes – as mais prevalentes; ii) a AAC(6')-Ib-cr acetiltransferase que inativa esses agentes; e iii) as bombas de efluxo QepA e OqxAB que diminuem a concentração desses agentes no interior da célula bacteriana (JACOBY, 2005; HOOPER & GEORGE, 2016; POIREL et al., 2018).

Os aminoglicosídeos são constantemente utilizados em combinação com os β -lactâmicos no tratamento de infecções bacterianas. Esses antimicrobianos se ligam ao sítio aminoacil do RNA ribossômico 16S da subunidade ribossômica 30S, ocasionando a leitura incorreta do código genético e, por consequência, a inibição da translocação (BECKER & COOPER, 2013; KRAUSE et al., 2016; GERMOVSEK et al., 2017). A resistência a esses antimicrobianos ocorre principalmente pela inativação através das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (do inglês *aminoglycoside modifying enzymes*) que modificam a estrutura química desses agentes, tornando-os incapazes de se ligarem ao ribossomo e, conseqüentemente, de inibir a síntese proteica. Essas modificações afetam os grupos amina e hidroxila mediante os processos de N-acetilação, O-fosforilação e O-adenilação pelas enzimas acetiltransferases (AACs), fosfotransferases (APHs) e nucleotidiltransferases (ANTs), respectivamente. As subclasses AAC(6')-I, APH(3')-I e ANT(2'') são as mais disseminadas dentre as linhagens de *E. coli* (RAMIREZ & TOLMASKY, 2010; POIREL et al., 2018)

As tetraciclina são amplamente utilizadas na medicina veterinária e, devido a pressão seletiva exercida nesse setor, o desenvolvimento de resistência a esses antimicrobianos é aumentado. Esses antimicrobianos se ligam a subunidade ribossômica 30S em uma posição que bloqueia a ligação do aminoacil-tRNA com o ribossomo bacteriano e, conseqüentemente, a síntese proteica é inibida (CHOPRA & ROBERTS, 2001). Os genes *tet* são responsáveis

pela resistência às tetraciclina, os quais codificam mecanismos de bombas de efluxo (*tetA* a *tetE*, *tetG*, *tetJ*, *tetL*, *tetY*), de proteção ribossômica (*tetM*, *tetW*) e de inativação enzimática (*tetX*). Esses genes estão distribuídos principalmente em linhagens de *E. coli* de origem animal, destacando os genes *tetA*, *tetB* e *tetC*, que já estão disseminados em linhagens de *E. coli* de diferentes fontes (SHIN et al., 2015; MARKLEY & WENCEWICZ, 2018; POIREL et al., 2018).

Os fenicois são representados pelos agentes cloranfenicol e florfenicol, que já foram extensamente utilizados nas medicina humana e veterinária. O uso desses agentes foi restringido devido aos efeitos tóxicos e ao desenvolvimento de novos antimicrobianos mais efetivos e menos tóxicos. Essa classe inibe a síntese proteica se ligando à subunidade ribossômica 50S e, em vista disto, inibindo o alongamento da cadeia peptídica (SCHWARZ et al., 2004; FERNÁNDEZ et al., 2012). Os principais mecanismos de resistência a esses agentes em *E. coli* são: i) inativação enzimática pela cloranfenicol acetiltransferase CatA que impede a ligação do antimicrobiano ao alvo devido a acetilação; e ii) as bombas de efluxo CmlA e FloR. Os genes que codificam esses mecanismos são frequentemente encontrados em MGEs associados com outros ARGs (BISCHOFF et al., 2005; POIREL et al., 2018).

As sulfonamidas e o trimetoprim são agentes antimicrobianos que inibem diferentes etapas da via de síntese do ácido fólico que são necessárias para a síntese de ácidos nucleicos. O sulfametoxazol inibe uma etapa intermediária da via por um mecanismo competitivo, enquanto que o trimetoprim atua no final do processo inibindo a formação do metabólito ativo do ácido tetra-hidrofólico. A combinação desses agentes (sulfametoxazol-trimetoprim – cotrimoxazol) gera em um efeito sinérgico, resultando em uma ação bactericida. As sulfonamidas e o trimetoprim foram muito utilizados nas medicina humana e veterinária e, atualmente, o cotrimoxazol vem sendo mais utilizado no tratamento de diferentes tipos de infecções em seres humanos (ELIOPOULOS & HUOVINEN, 2001; SKÖLD, 2001, 2010). A resistência a esses antimicrobianos em *E. coli* ocorre geralmente pela aquisição dos genes *sul* (*sul1*, *sul2*, *sul3*) e *dfrA*, que codificam enzimas-alvo com baixa afinidade a esses agentes. Esses genes já estão disseminados em linhagens de *E. coli* de origem animal, evidenciando o gene *sul1* que faz parte da estrutura dos integrons de classe 1 e, portanto, também é comumente identificado com outros ARGs clinicamente relevantes (POIREL et al., 2018; JIANG et al., 2019; RUMI et al., 2019).

A fosfomicina atua como uma análoga do fosfoenolpiruvato e se liga à enzima MurA, a qual é responsável pela primeira etapa da síntese do peptidoglicano, inibindo a síntese do

mesmo. O uso da fosfomicina na medicina veterinária é limitado ao tratamento de infecções bacterianas em suínos e frangos de corte, enquanto que na medicina humana esse antimicrobiano emerge como um agente seguro e eficaz no combate de infecções do trato urinário causadas por *E. coli* MDR (FALAGAS et al., 2016; GARDINER et al., 2019; SOJO-DORADO et al., 2022). Os mecanismos de resistência mais prevalentes em *E. coli* estão associados as mutações em GlpT, UhpA e UhpT que estão envolvidas no sistema de transporte da fosfomicina para o citoplasma e a aquisição de enzimas modificadoras de fosfomicina, com destaque para a FosA, que abre o anel epóxido deste agente (SILVER et al., 2017; POIREL et al., 2018).

1.3 Mobilização de ARGs

Os ARGs são mobilizados através de MGEs, tais como os integrons, os transposons, as sequências de inserção (ISs) e os plasmídeos. Esses elementos podem mobilizar os ARGs do cromossomo para um plasmídeo ou entre plasmídeos (mobilidade de DNA intracelular) ou entre linhagens de uma mesma espécie ou espécies diferentes (mobilidade de DNA intercelular) (**Figuras 2 e 3**). Como esses elementos estão frequentemente presentes em múltiplas cópias em diferentes locais de um genoma, eles também podem facilitar a recombinação homóloga. As interações entre esses elementos estão intimamente relacionadas com a disseminação da AMR e a rápida evolução dos patógenos MDR. Os mecanismos intercelulares de troca genética incluem a conjugação, a transdução e a transformação, os quais são mediados por plasmídeos/elementos conjugativos integrativos, por bacteriófagos e pela captação de DNA extracelular, respectivamente (FROST et al., 2005; PARTRIDGE et al., 2018b).

Os integrons possuem duas regiões conservadas (5'-CS e 3'-CS). Na região 5'-CS estão localizados o gene *intI*, um sítio de recombinação *attI* e um promotor. O gene *intI* codifica uma enzima tirosina recombinase sítio-específica que catalisa a recombinação entre os sítios *attI* e o *attC*, inserindo os cassetes gênicos na orientação que permite a expressão dos mesmos. Na região 3'-CS estão localizados os genes de resistência aos compostos de quaternário de amônio (*qacEΔ1*) e as sulfonamidas (*sul*) e regiões de leitura aberta (ORFs – do inglês *open reading frames*). Esses elementos utilizam a recombinação sítio-específica para mover os ARGs. Até o presente momento, cinco classes de integrons já foram descritas, sendo os integrons de classe 1, 2 e 3 os mais prevalentes em *Enterobacteriaceae*, destacando

os integrons de classe 1 que são comumente identificados carreando diversos ARGs em *E. coli* (WHITE et al., 2001; ESCUDERO et al., 2015; KAUSHIK et al., 2018; PARTRIDGE et al., 2009, 2018b).

As ISs são elementos curtos de até ~ 3 kb que normalmente abrigam genes que codificam transposases flanqueados pelas regiões de repetições invertidas (IRs – do inglês *inverted sequences*), que são designadas a esquerda (IRL – do inglês *left inverted repeat*) e a direita (IRR – do inglês *right inverted repeat*), e por sequências curtas repetidas (DR – do inglês *directly repeated sequences*) em relação a direção da transcrição das transposases. As IRs possuem os domínios “a” e “b” que estão envolvidos na clivagem e na ligação das transposases, respectivamente (SEGUIER et al., 2014; VANDECRAEN et al., 2017; PARTRIDGE, 2011; PARTRIDGE et al., 2018b). Diversas famílias de ISs estão envolvidas na disseminação de ARGs em bactérias Gram-negativas, ressaltando os elementos das famílias IS26 (IS6), IS30 (IS*Apl1*) e IS1380 (IS*Ecp1*) que são relacionados com ARGs clinicamente relevantes (ZONG et al., 2010; HARMER et al., 2014; LIU et al., 2016).

Os transposons possuem estruturas heterogêneas e maiores do que as ISs e incluem diferentes conjuntos de genes relacionados à transposição que são específicos para cada família e os genes acessórios. Em bactérias Gram-negativas, os transposons das famílias Tn1, Tn2 e Tn3 foram os primeiros a serem descritos e possuem uma transposase (*tnpA*) e uma resolvase (*tnpR*) transcritas em direções opostas, ARGs e genes acessórios que são flanqueados por IRs. Os transposons compostos, como por exemplo o Tn21-like, são elementos específicos grandes que podem conter > 20 kb e são flanqueados por um par de IS. A transposição desses elementos pode ser replicativa através da inserção de uma mesma cópia em uma nova posição ou não-replicativa através da excisão de um local e a inserção em outro (WILLIAMS et al., 2006; SEGUIER et al., 2014; BABAKHANI & OLOOMI, 2018; PARTRIDGE et al., 2018b; FAN et al., 2019).

Os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossomais que se replicam independentemente devido a uma região de replicação (*ori*) e uma proteína de iniciação Rep. A quantidade de cópias distribuídas para as células filha varia de acordo com o tamanho do plasmídeo, sendo uma quantidade maior para os plasmídeos pequenos do que para os grandes, uma vez que os plasmídeos maiores sobrecarregam os seus hospedeiros. Assim, os plasmídeos maiores normalmente possuem regiões de resolução (*res*), partição (*par*) e sistemas de morte pós-segregacional que contribuem para a manutenção dos mesmos (DIONISIO et al., 2005; SMILLIE et al., 2010; SAN MILLAN et al., 2014; RAMSAY &

FIRTH, 2017). Os plasmídeos conjugativos são complexos e possuem um *backbone* conservado de ~ 20 kb associado com regiões de transferência (*tra*) que inclui os sistemas *Type IV secretion*, *Matting pair formation* e *DNA transfer protein*. Por outro lado, os plasmídeos não-conjugativos podem ser mobilizados através de outros plasmídeos conjugativos presentes na mesma célula. Esses plasmídeos são pequenos (~ 10 kb) e normalmente possuem um conjunto de genes de mobilidade (*mob*) e uma relaxase específica (SCHRÖDER & LANKA, 2005; WALLDEN et al., 2010; GRUBER et al., 2016).

As regiões variáveis dos plasmídeos abrigam principalmente os ARGs, os genes de tolerância aos metais e os genes de virulência que estão frequentemente associados com os outros MGEs. Os principais plasmídeos que circulam dentre as *Enterobacteriaceae* podem ser classificados de acordo com um grupo de incompatibilidade (Inc – do inglês *incompatibility group*), visto que dois plasmídeos que competem pelo mesmo sistema de replicação não podem coexistir dentro de uma mesma linhagem celular (HEDGES & DATTA, 1971; CARATTOLI et al., 2005; CARATTOLI, 2009, 2013; THOMAS, 2014; ORLEK et al., 2017). Mais de 30 grupos de incompatibilidade já foram descritos em *Enterobacteriaceae*, evidenciando aqueles relacionados com os ARGs clinicamente relevantes, tais como IncF, IncI1, IncHI2, IncN e IncX. Em *E. coli*, os plasmídeos IncX4, IncHI2 e IncI1 são os principais responsáveis pela disseminação dos genes *mcr*, *bla_{CTX-M}* e *bla_{CMY}* (BEN SALLEM et al., 2014; YANG et al., 2015; ROZWANDOWICZ et al., 2018; HAENNI et al., 2020).

Alterações genéticas nos genomas de *E. coli* garantem uma alta diversidade devido ao ganho e a perda de genes por eventos de recombinação gênica que facilitam novas rearranjos dentro do genoma. Este fenômeno pode resultar em maior flexibilidade na transição dessa espécie entre os seres humanos, os animais e o meio ambiente. A crescente disseminação de linhagens potencialmente patogênicas de *E. coli* MDR, incluindo os clones de alto risco, carreando ARGs clinicamente relevantes na interface humana, animal e ambiental constitui uma grave ameaça para o controle de infecções em seres humanos e em animais, bem como para a integridade do meio ambiente. A grande maioria dos estudos com foco em AMR é realizada com isolados bacterianos obtidos do âmbito hospitalar. No entanto, os isolados ambientais disparam como importantes disseminadores de AMR, mas poucos estudos são realizados com o objetivo de entender os mecanismos envolvidos nessa problemática. Portanto, uma investigação molecular, que inclui análises genômicas, de isolados obtidos do meio ambiente permite uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na AMR que

circulam em diferentes nichos, o qual contribui para o monitoramento da AMR e de patógenos MDR a nível nacional e internacional e no contexto da Saúde Única.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente projeto de pesquisa teve como objetivo caracterizar isolados de *E. coli* obtidos do meio ambiente quanto aos perfis de resistência aos antimicrobianos, de virulência e epidemiológico.

2.2 Objetivos específicos

- Obter isolados de *E. coli* MDR de amostras ambientais provenientes de diferentes cidades do Brasil.
- Determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos.
- Investigar a presença e a diversidade de ARGs.
- Identificar mutações em determinantes de resistência aos antimicrobianos.
- Detectar genes de virulência associados aos patótipos DEC e ExPEC.
- Analisar a presença de MGEs.
- Realizar a tipagem molecular dos isolados.
- Caracterizar o resistoma, o viruloma e o plasmidoma de alguns isolados através do sequenciamento completo do genoma.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de solo e obtenção dos isolados

Trezentas amostras de solo foram coletadas entre 2017 e 2019 de 13 fazendas localizadas na região metropolitana de Ribeirão Preto, no estado de São Paulo, e na cidade de Montes Claros, no estado de Minas Gerais, que utilizavam a pecuária extensiva. As amostras foram coletadas de solos cultivados com abacate, amendoim, *brachiaria*, café, cana-de-açúcar, goiaba, jaboticaba, limão, manga e milho e solos sem culturas que possuíam animais da cadeia produtora de alimentos e/ou cavalos domésticos em até 300 metros dos pontos de coleta. Dentre as fazendas, seis (A, B, C, D, E, F) possuíam um histórico do uso de dejetos de animais como fertilizante orgânico nas lavouras (**Tabela 1**). Aproximadamente 50 g de cada amostra de solo foram coletadas a uma profundidade de até 15 cm usando espátulas e tubos cônicos tipo falcon estéreis. As amostras provenientes das mesmas fazendas foram coletadas a uma distância de pelo menos 50 metros uma das outras.

Tabela 1. Dados das fazendas e das amostras de solo coletadas

Fazenda	Cidade	Estado ¹	Ano de coleta	Animais (rebanhos)					Amostras de solo (n)		Histórico do uso de dejetos de animais
				Suíno	Bovino	Ovino	Equino	Avícola	Com cultura	Sem cultura	
A	Jardinópolis	SP	2017					×	30	0	Sim
B	Jardinópolis	SP	2018		×	×	×	×	15	15	Sim
C	Jardinópolis	SP	2018					×	30	0	Sim
D	Jardinópolis	SP	2018					×	15	15	Sim
E	Jardinópolis	SP	2018	×	×	×	×	×	15	0	Sim
F	Jardinópolis	SP	2018					×	15	0	Sim
G	Altinópolis	SP	2019	×	×				15	0	Não
H	Sales Oliveira	SP	2019					×	15	0	Não
I	Sales Oliveira	SP	2017	×					0	15	Não
J	Ribeirão Preto	SP	2018		×				0	15	Não
K	Montes Claros	MG	2019		×				0	30	Não
L	Montes Claros	MG	2019		×				0	30	Não
M	Montes Claros	MG	2019				×		0	30	Não

¹ São Paulo, SP; Minas Gerais, MG.

Para o isolamento bacteriano, as amostras de solo foram homogeneizadas e 1 g de cada amostra foi adicionado em 5 mL de caldo *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) (Oxoid, Reino Unido) e incubado a 35 ± 2 °C por 18-24 horas. Em seguida, as culturas foram

semeadas em ágar MacConkey (Oxoid, Reino Unido) e incubadas a 35 ± 2 °C por 18-24 horas e, posteriormente, uma colônia característica de *E. coli* (colônia na cor rosa cercada por uma zona de precipitação biliar) de cada amostra foi selecionada, purificada e estocada a - 80 °C em tubos criogênicos contendo caldo BHI acrescido de 15% de glicerol (Merck, Alemanha).

3.2 Amostras de água e obtenção dos isolados

Duzentas amostras de água (500 a 1500 mL) foram coletadas entre 2018 e 2020 pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) da cidade de Ribeirão Preto no estado de São Paulo. Os ecossistemas aquáticos pertencem às classes 2, 3 e 4 de acordo com a Resolução CONAMA n° 357, de 17 de março de 2005 (CONAMA, 2005) e são utilizados para abastecimento público (após tratamento convencional), recreação de contato primário e secundário, irrigação, aquicultura, atividade pesqueira, navegação marítima e outros usos. No total, 24 ecossistemas aquáticos, sendo 43 pontos de rios, ribeirões, córregos e lagos em diversas cidades do estado de São Paulo foram estudados. Esses pontos estão localizados em áreas agropecuárias e em industrialização e fazem parte da Rede de Monitoramento de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo (**Figura 5**).

As placas de ágar *m-TEC ChromoSelect* (Sigma-Aldrich, Reino Unido) com culturas bacterianas foram cedidas pela CETESB após a realização da quantificação de *E. coli* utilizando a técnica de membrana filtrante de acordo com a Norma Técnica L5.230 (CETESB, 2012). Para o isolamento bacteriano no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, onde este estudo foi realizado, as amostras de água foram filtradas na Bomba de Vácuo TE-058 (Tecnal, Brasil) utilizando membranas filtrantes com um tamanho de poro de 0,45 µm (Unifil, Brasil). Em seguida, as membranas filtrantes foram adicionadas em placas de ágar MacConkey (Oxoid, Reino Unido) e incubadas a 35 ± 2 °C por 18-24 horas. A fim de obter isolados resistentes à colistina, algumas amostras de água foram processadas e 2 mg/L de colistina (Sigma-Aldrich, EUA) foram acrescidos no ágar MacConkey. Por fim, os isolados bacterianos foram selecionados, purificados e estocados como descrito no item 3.1.

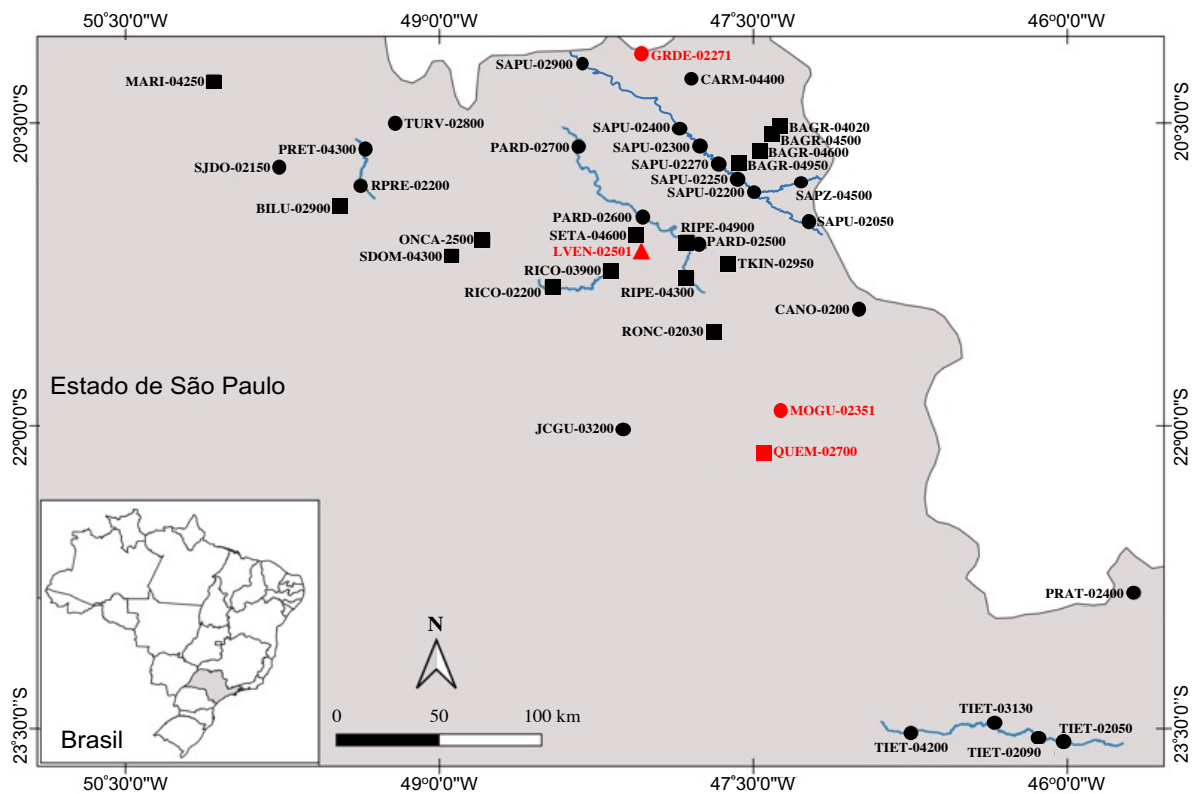


Figura 5. Mapa dos pontos de coleta dos ecossistemas aquáticos utilizados neste estudo.

Círculos, quadrados e triângulos pretos representam os rios, os ribeirões/córregos e os lagos, respectivamente. A cor vermelha representa os ecossistemas aquáticos utilizados para fins recreativos de contato primário. Adaptado de FURLAN et al. (2022c).

3.3 Extração do DNA genômico

O DNA genômico dos isolados foi extraído com o *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração e a pureza do DNA genômico foram determinadas em *DS-11 + Spectrophotometer* (DeNovix, EUA) utilizando os comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

3.4 Identificação molecular dos isolados

3.4.1 Gene *16S rRNA*

Os isolados bacterianos obtidos foram identificados molecularmente através do sequenciamento do gene *16S rRNA* (1.499 pb) utilizando os iniciadores fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (WEISBURG et al., 1991).

3.4.1.1 Condições das reações em cadeia da polimerase

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*) foi realizada no termociclador *ProFlex™ PCR System* (Applied Biosystems, Cingapura) sob as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 94 °C por 15 minutos, seguido de 30 a 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 52 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, finalizando com 10 minutos de extensão a 72 °C. Para cada reação foram utilizados 14,75 µL de água deionizada esterilizada, 1 µL (1,25 U) da enzima *JumpStart™ Taq DNA Polimerase* (Sigma-Aldrich, EUA), 2,5 µL do tampão *PCR buffer minus Mg-10X*, 1,75 µL (25 mM) de MgCl₂, 0,5 µL de solução contendo 10 mM de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Sinapse Inc., EUA), 1 µL (25 µM) de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e 2,5 µL (100 ng) de DNA genômico, obtendo um volume final de 25 µL. Linhagens de referência foram adicionadas em cada reação como controle positivo e reações livres de DNA foram utilizadas como controle negativo.

3.4.1.2 Eletroforese horizontal em gel de agarose

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% utilizando o tampão TAE 1X (solução estoque 50X – Tris 2 mol/L, ácido acético 1 mol/L e EDTA 0,5 mol/L com pH 8,0). Ao término da corrida, as bandas foram visualizadas após coloração em brometo de etídio (0,5 mg/L) no transluminador *E-Gel Imager* (LIFE Technologies, Israel). Os fragmentos de DNA amplificados foram comparados com o marcador de peso molecular de *100 bp Ladder Plus* (Sinapse Inc., EUA) para determinação do tamanho dos mesmos.

3.4.1.3 Sequenciamento dos produtos amplificados por PCR

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o *Illustra™ GFX™ PCR Kit* (GE Healthcare, Reino Unido) e posteriormente sequenciados pelo método de Sanger. Os produtos foram sequenciados com os mesmos iniciadores (diluição 1:10) utilizados na reação de amplificação do respectivo produto gênico. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, de acordo com as recomendações do fabricante, no sequenciador *Applied Biosystems™ 3500xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Lituânia) do Núcleo de Serviços em Biotecnologia da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (<http://lgmb.fmrp.usp.br/nsb/>). As sequências obtidas foram analisadas utilizando os programas *ChromasPro v.1.7.6* (Technelysium Pty.

Ltd.) e/ou *Geneious Prime v.2021* (Biomatters Ltd., Nova Zelândia), e em seguida, utilizando o algoritmo *MegaBLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para pesquisa da identidade com outras sequências disponíveis no *GenBank*® (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Por fim, as sequências foram depositadas publicamente no *GenBank*®.

3.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Os perfis de resistência aos antimicrobianos foram determinados pelos métodos de disco-difusão em ágar e de microdiluição em caldo conforme as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (M100, 28th ed.) e/ou *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCast) (v.9.0, 2019)/*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). As linhagens de *E. coli* ATCC® 25922™ e *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ foram utilizadas como controles de qualidade.

3.5.1 Método de disco-difusão

O método de disco-difusão foi realizado utilizando placas de ágar Mueller-Hinton (MHA; Oxoid, Reino Unido) e 33 antimicrobianos foram testados, incluindo ampicilina (10 µg), ácido clavulânico+amoxicilina (20/10 µg), sulbactam+ampicilina (10/10 µg), piperacilina+tazobactam (100/10 µg), cefazolina (30 µg), cefuroxima (30 µg), cefaclor (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), aztreonam (30 µg), ertapenem (10 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), estreptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), amicacina (30 µg), tetraciclina (30 µg), doxiciclina (30 µg), minociclina (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), levofloxacino (5 µg), ciprofloxacino (5 µg), norfloxacino (10 µg), ofloxacino (5 µg), lomefloxacino (10 µg), sulfametoxazol+trimetoprim (23,75/1,25 µg), sulfonamidas (300 µg), trimetoprim (5 µg), cloranfenicol (30 µg) e nitrofurantoina (300 µg) (CECON, Brasil).

A partir de colônias de crescimentos recentes, incubadas por uma noite (18-24 horas) em MHA, foram realizadas suspensões bacterianas em soluções de NaCl 0,9% estéreis compatíveis com a escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Com auxílio de *swabs*, as suspensões bacterianas foram semeadas nas placas de MHA e os discos de antimicrobianos foram posicionados equidistantes e concomitantemente, permitindo a realização do teste sinérgico do duplo-disco para avaliação da produção de ESBL (DRIEUX et al., 2008). Em seguida, as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 16-18 horas e os halos foram medidos e

interpretados como resistentes ou suscetíveis de acordo com o CLSI e/ou BrCAST/EUCAST. Por fim, os isolados foram classificados como MDR (resistentes a ≥ 1 antimicrobiano em ≥ 3 categorias de antimicrobianos) (MAGIORAKOS et al., 2012) e positivos para ESBL devido a formação da zona fantasma (do inglês *ghost zone*) dos discos de cefotaxima, ceftazidima, cefepima e/ou aztreonam em direção ao disco de ácido clavulânico+amoxicilina (DRIEUX et al., 2008).

3.5.2 Método de microdiluição em caldo

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos isolados resistentes para ceftazidima, ciprofloxacino e colistina (Sigma-Aldrich, EUA) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo utilizando o caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (CAMHB; Oxoid, Reino Unido). As soluções estoques dos antimicrobianos testados foram diluídas de forma seriada em CAMHB e, posteriormente, 190 μ l de cada diluição foram adicionadas em placas de 96 poços (Kasvi, China). A partir de colônias de crescimentos recentes, incubadas a 35 ± 2 °C por uma noite (18-24 horas) em ágar MH, foram realizadas suspensões bacterianas em soluções de NaCl 0,9% estéreis compatíveis com a escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/ml). Em seguida, uma diluição de 1:10 foi utilizada nas soluções e 10 μ l foram adicionados nas placas para obter uma concentração bacteriana final em cada poço em torno de 5×10^5 UFC/ml. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 16-20 horas e, posteriormente, 20 μ l de uma solução de resazurina (0,02%) foram adicionados nas placas. As CIMs foram consideradas como a primeira concentração capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano e foram interpretadas como resistentes ou suscetíveis de acordo com o CLSI e/ou BrCAST/EUCAST.

3.6 Detecção dos ARGs

De acordo com o perfil de resistência aos antimicrobianos de cada isolado estudado, PCRs foram realizadas para detecção dos genes que conferem resistência aos β -lactâmicos (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1-like}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER}, *bla*_{GES}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}), aminoglicosídeos [*aadA*, *aac*(6')-Ib, *aac*(3')-Ia, *aac*(3')-IIa, *aac*(6')-Ih, *aph*(3')-Ia, *aph*(3')-VI, *ant*(2'')-Ia], tetraciclinas (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetM*), sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*), fenicóis (*floR*, *cmlA*, *catA*), fluorquinolonas (*qepA*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*), fosfomicina (*fosA*) e polimixinas (*mcr-1* ao *mcr-9*) (Tabela 2). Os genes *bla*_{KPC},

*bla*_{NDM} e *mcr* foram pesquisados em todos os isolados, independente dos perfis de resistência aos antimicrobianos, a fim de detectar uma possível disseminação silenciosa desses genes no meio ambiente. As PCRs foram realizadas com as condições descritas no item 3.4.1.1 e os produtos amplificados foram visualizados e sequenciados como descritos nos itens 3.4.1.2 e 3.4.1.3, respectivamente.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para detecção de ARGs

Gene ¹	Primer (5'-3') ²	TA (°C) ³	Tamp (pb) ⁴	Referência
<i>bla</i> _{CTX-M-Gp1}	F: TTAGGAARTGTGCCGCTGYA R: CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	60	688	DALLENNE et al., 2010
<i>bla</i> _{CTX-M-Gp2}	F: CGTTAACGGCAGGATGAC R: CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	60	404	DALLENNE et al., 2010
<i>bla</i> _{CTX-M-Gp8}	F: AACRCRCAGACGCTCTAC R: TCGAGCCGGAASGTGYAT	60	326	DALLENNE et al., 2010
<i>bla</i> _{CTX-M-Gp9}	F: TCAAGCCTGCCGATCTGGT R: TGATTCTCGCCGCTGAAG	60	561	DALLENNE et al., 2010
<i>bla</i> _{CMY}	F: CGAAGAGGCAATGACCAGAC R: ACGGACAGGGTTAGGATAGY	60	538	DALLENNE et al., 2010
<i>bla</i> _{TEM}	F: CATTTCGGTGTGCGCCCTTATTC R: CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	60	800	DALLENNE et al., 2010
<i>bla</i> _{SHV}	F: AGCCGCTTGAGCAAATTAAC R: ATCCCGCAGATAAATCACCAC	60	713	DALLENNE et al., 2010
<i>bla</i> _{OXA-1-like}	F: GGCACCAGATTCAACTTCAAG R: GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG	60	564	DALLENNE et al., 2010
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	F: GCTTGATCGCCCTCGATT R: GATTGCTCCGTGGCCGAAA	57	281	DALLENNE et al., 2010
<i>bla</i> _{VEB}	F: CATTCCCGATGCAAAGCGT R: CGAAGTTTCTTTGGACTCTG	60	648	DALLENNE et al., 2010
<i>bla</i> _{PER}	F: GCTCCGATAATGAAAGCGT R: TTCGGCTTGACTCGGCTGA	60	520	DALLENNE et al., 2010
<i>bla</i> _{GES}	F: AGTCGGCTAGACCGGAAAG R: TTTGTCCGTGCTCAGGAT	57	399	DALLENNE et al., 2010
<i>bla</i> _{KPC}	F: CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC R: ACGACGGCATAGTCATTTGC	57	538	DALLENNE et al., 2010
<i>bla</i> _{NDM}	F: GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC R: GGTCGCGAAGCTGAGCACC GCAT	60	782	PEIRANO et al., 2011
<i>aadA</i>	F: TGATTTGCTGGTTACGGTGAC R: CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG	60	284	CLARK et al., 1999
<i>aac</i> (6')-Ib	F: TATGAGTGGCTAAATCGAT R: CCCGCTTTCTCGTAGCA	55	395	PLOY et al., 1994
<i>aac</i> (3)-Ia	F: GACATAAGCCTGTTCGGTT R: CCCGCTTTCTCGTAGCA	58	372	NOPPE-LECLERCQ et al., 1999
<i>aac</i> (3)-IIa	F: ATGCATACGCGGAAGGC R: TGCTGGCACGATCGGAG	58	822	NOPPE-LECLERCQ et al., 1999
<i>aac</i> (6')-Ih	F: TGCCGATATCTGAATC R: ACACCACACGTTTCAG	58	407	NOPPE-LECLERCQ et al., 1999
<i>aph</i> (3')-Ia	F: CGAGCATCAAATGAAACTGC R: GCGTTGCCAATGATGTTACAG	55	623	NOPPE-LECLERCQ et al., 1999
<i>aph</i> (3')-VI	F: CGGAAACAGCGTTTTAGA R: TTCCTTTGTCAGGTC	49	716	NOPPE-LECLERCQ et al., 1999
<i>ant</i> (2'')-Ia	F: ATCTGCCGCTCTGGAT R: CGAGCCTGTAGGACT	49	404	NOPPE-LECLERCQ et al., 1999
<i>tetA</i>	F: GCTACATCCTGCTTGCCCTTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	55	210	NG et al., 2001
<i>tetB</i>	F: TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG R: GTAATGGCCAATAACACCG	55	659	NG et al., 2001

<i>tetC</i>	F: CTTGAGAGCCTTCAACCCAG R: ATGGTCGTCATCTACCTGCC	55	418	NG et al., 2001
<i>tetD</i>	F: AAACCATTACGGCATTCTGC R: GACCGGATACACCATCCATC	55	787	NG et al., 2001
<i>tetE</i>	F: AAACCACATCCTCCATACGC R: AAATAGGCCACAACCGTCAG	55	278	NG et al., 2001
<i>tetG</i>	F: GCTCGGTGGTATCTCTGCTC R: AGCAACAGAATCGGGAACAC	55	468	NG et al., 2001
<i>tetM</i>	F: GTGGACAAAAGGTACAACGAG R: CGGTAAAGTTCGTACACACAC	55	1137	NG et al., 2001
<i>sul1</i>	F: CGGCGTGGGCTACCTGAACG R: GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	69	433	KERRN et al., 2002
<i>sul2</i>	F: GCGCTCAAGGCAGATGGCATT R: GCGTTTGATAACCGGCACCCGT	69	293	KERRN et al., 2002
<i>sul3</i>	F: GAGCAAGATTTTTGGAATCG R: ATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	51	789	PERRETTEN & BOERLIN, 2003
<i>floR</i>	F: CCCGCTATGATCCAACCTCAC R: ACCCACATCGGTAGGATGAA	55	803	GORDON et al., 2008
<i>cmlA</i>	F: CCGCCACGGTGTGTTGTTATC R: CACCTTGCCTGCCATCATTAG	55	698	KEYES et al., 2000
<i>catA</i>	F: CCTGCCACTCATCGCAGT R: CCACCGTTGATATATCCC	60	623	GUERRA et al., 2001
<i>qepA</i>	F: TGGTCTACGCCATGGACCTCA R: TGAATTCGGACACCGTCTCCG	53	1137	KARCZMARCZYK et al. 2011
<i>oqxA</i>	F: GACAGCGTCGCACAGAATG R: GGAGACGAGGTTGGTATGGA	62	339	CHEN et al., 2012
<i>oqxB</i>	F: CGAAGAAAGACCTCCCTACCC R: CGCCGCCAATGAGATACA	62	240	CHEN et al., 2012
<i>qnrA</i>	F: AGAGGATTTCTCACGCCAGG R: TGCCAGGCACAGATCTTGAC	55	580	CATTOIR et al., 2007
<i>qnrB</i>	F: GGMATHGAAAATTCGCCACTG R: TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA	55	264	CATTOIR et al., 2007
<i>qnrS</i>	F: GCAAGTTCATTGAACAGGGT R: TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	55	428	CATTOIR et al., 2007
<i>fosA</i>	F: ATCTGTGGGTCTGCCTGTCGT R: ATGCCCCGATAGGGCTTCT	59	271	HOU et al., 2012
<i>mcr-1</i>	F: CGGTACAGTCCGTTTGTTT R: CTGGTTCGGTCTGTAGGG	58	309	LIU et al., 2016
<i>mcr-2</i>	F: TGTTGCTTGTGCCGATTGGA R: AGATGGTATTGTTGGTTGCTG	65	567	XAVIER et al., 2016
<i>mcr-3</i>	F: TTGGCACTGTATTTTGCATT R: TTAACGAAAATTGGCTGGAACA	50	542	YIN et al., 2017
<i>mcr-4</i>	F: ATTGGGATAGTCGCCTTTTT R: TTACAGCCAGAATCATTATCA	51	487	CARATTOLI et al., 2017
<i>mcr-5</i>	F: ATGCGGTTGTCTGCATTTATC R: TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG	50	1644	BOROWIAK et al., 2017
<i>mcr-6</i>	F: GTCCGGTCAATCCCTATCTGT R: ATCACGGGATTGACATAGCTAC	55	566	YANG et al., 2019
<i>mcr-7.1</i>	F: AGGGGATAAACCGACCCTGA R: TGATCTCGATGTTGGGCACC	55	335	YANG et al., 2018
<i>mcr-8</i>	F: AACCGCCAGAGCACAGAATT R: TTCCCCAGCGATTCTCCAT	60	667	YANG et al., 2019
<i>mcr-9</i>	F: TTCCCTTTGTTCTGGTTG R: GCAGGTAATAAGTCGGTC	55	1011	BOROWIAK et al., 2020

¹ *bla*_{CTX-M} (Grupo 1 inclui o gene *bla*_{CTX-M-15}; Grupo 2 inclui o gene *bla*_{CTX-M-2}; Grupo 8 inclui o gene *bla*_{CTX-M-8}; Grupo 9 inclui o gene *bla*_{CTX-M-14}). ² Forward, F; Reverse, R. ³ Temperatura de anelamento, TA. ⁴ Tamanho do amplicon, Tamp.

3.7 Identificação de mutações em determinantes de resistência aos antimicrobianos

Mutações nas QRDR dos genes *gyrA*, *parC* e *parE*, nos sistemas de dois componentes PmrAB e PhoPQ dos genes *pmrA*, *pmrB*, *phoP* e *phoQ* e no regulador negativo *mgrB* foram determinadas através do sequenciamento pelo método de Sanger (**Tabela 3**). As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências de referência da linhagem *E. coli* str. K-12 substr. MG1655 (*GenBank accession number* U00096) utilizando o *Clustal Omega Multiple Sequence Alignment Program* (SIEVERS & HIGGINS, 2018). O impacto das mutações em PmrAB, PhoPQ e MgrB foi determinado através do *Protein Variation Effect Analyzer* (PROVEAN) (CHOI & CHAN, 2015). As PCRs foram realizadas com as condições descritas no item 3.4.1.1 e os produtos amplificados foram visualizados e sequenciados como descritos nos itens 3.4.1.2 e 3.4.1.3, respectivamente.

Tabela 3. Iniciadores utilizados na identificação de mutações em determinantes de resistência aos antimicrobianos

Gene	Primer (5'-3') ¹	TA (°C) ²	Tamp (pb) ³	Referência
<i>gyrA</i>	F: CATGAACGTATTGGGCAATG R: CCGTACCGTCATAGTTATCC	52	305	JEONG et al., 2011
<i>parC</i>	F: ATCGGCGACGGCCTGAAGCC R: CGGGATTCCGGTATAACGCAT	55	273	JIA et al., 2015
<i>parE</i>	F: GCCCAGCGCCGTATGCGTGC R: GTTCGGATCAAGCGTGGTTT	58	621	KOMP LINDGREN et al., 2003
<i>pmrA</i>	F: ACGAAGTATTACCAGGCTGCGGA R: GCAGCGATATTGGTCGGCGC	60	765	SATO et al., 2018
<i>pmrB</i>	F: ACCAACACCCTGGAAGTGCATATCC R: TCCTCCAGGTTAACGGAGGAGAGTG	60	1304	SATO et al., 2018
<i>phoP</i>	F: GCCAGTACCGCCAGCTTAA R: CTCGCCACGTAACAGCCGAA	60	1798	LUO et al., 2017
<i>phoQ</i>	F: GGCACAATATCCCCAAGAAGT R: ATCCACAGGCTGGTATCTGCA	60	1595	LUO et al., 2017
<i>mgrB</i>	F: CACGAATATCGACATAGTTAG R: TATTCTACCACTGCTGGAGAG	60	275	LUO et al., 2017

¹ Forward, F; Reverse, R. ² Temperatura de anelamento, TA. ³ Tamanho do amplicon, Tamp.

3.8 Detecção dos genes de virulência

A detecção dos genes marcadores de virulência para DEC (*aap*, *aggR*, *AA probe*, *ipaH*, *aatA*, *aaiC*, *bfpA*, *est*, *elt*, *ehxA*, *eaeA*, *stx1*, *stx2*), ExPEC (*kpsMT II*, *papA*, *papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA*) e outros (*iucA*, *hlyF*, *iroN*, *gad*, *iss*, *ompT*, *lpfA*) foram pesquisados por PCRs de acordo com itens 3.4.1.1, 3.4.1.2 e 3.4.1.3 (**Tabela 4**).

Tabela 4. Iniciadores utilizados na detecção dos genes de virulência

Gene	Primer (5'-3') ¹	TA (°C) ²	Tamp (pb) ³	Referência
<i>aap</i>	F: CTTGGGTATCAGCCTGAATG R: AACCCATTCGGTTAGAGCAC	55	310	CERNA et al., 2003
<i>aggR</i>	F: CTAATTGTACAATCGATGTA R: AGAGTCCATCTCTTTGATAAG	55	457	CERNA et al., 2003
<i>AA probe</i>	F: CTGGCGAAAGACTGTATCAT R: CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	55	629	CERNA et al., 2003
<i>ipaH</i>	F: GTTCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC R: GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	50	600	ARANDA et al., 2007
<i>aatA</i>	F: CTGGCGAAAGACTGTATCATC R: AATGTATAGAAATCCGCTGTT	57	630	SCHMIDT et al., 1995
<i>aaiC</i>	F: ATTGTCCTCAGGCATTTACACAG R: ACACCCCTGATAAACA	57	215	LIMA et al., 2013
<i>bfpA</i>	F: AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC R: GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	50	326	ARANDA et al., 2007
<i>est</i>	F: ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT R: CACCCGGTACARGCAGGATT	50	190	ARANDA et al., 2007
<i>elt</i>	F: GGCAGACAGATTATACCGTGC R: CGGTCTCTATATCCCTGTT	50	450	ARANDA et al., 2007
<i>ehxA</i>	F: GCATCATCAAGCGTAGCTTCC R: AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	65	534	PATON and PATON, 1998
<i>eaeA</i>	F: GACCCGGCACAAGCATAAGC R: CCACCTGCAGCAACAAGAGG	65	384	PATON and PATON, 1998
<i>stx1</i>	F: ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC R: AGAACGCCCACTGAGATCATC	65	180	PATON and PATON, 1998
<i>stx2</i>	F: GGCAGTGTCTGAACTGCTCC R: TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	65	255	PATON and PATON, 1998
<i>kpsMT II</i>	F: GCGCATTTGCTGATACTGTTG R: CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	63	272	JOHNSON and STELL, 2000
<i>papA</i>	F: ATGGCAGTGGTGTGTTTGGTG R: CGTCCCACCATAACGTGCTCTTC	65	717	JOHNSON and STELL, 2000
<i>papC</i>	F: GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA R: ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	65	205	JOHNSON and STELL, 2000
<i>sfa/foc</i>	F: GTGGATACGACGATTACTGTG R: CCGCCAGCATTCCCTGTATTC	63	244	JOHNSON and STELL, 2000
<i>afa/dra</i>	F: GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC R: CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	63	594	JOHNSON and STELL, 2000
<i>iutA</i>	F: GGCTGGACATCATGGAACTGG R: CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	63	302	JOHNSON and STELL, 2000
<i>iucA</i>	F: AGTCTGCATCTTAACCTTCA R: CTCGTTATGATCGTTCAGAT	52	1100	OKEKE et al., 2004
<i>hlyF</i>	F: GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC R: GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	63	450	JOHNSON et al., 2008
<i>iroN</i>	F: AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT R: GTTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	63	553	JOHNSON et al., 2008
<i>gad</i>	F: ACCTGCGTTGCGTAAATA R: GGGCGGGAGAAGTTGATG	58	670	MCDANIELS et al., 1996
<i>iss</i>	F: CAGCAACCCGAACCACTTGATG R: AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	63	323	RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005
<i>ompT</i>	F: TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT R: TAGCGTTTGTCTGACTGGCTTCTGATAC	63	496	JOHNSON et al., 2008
<i>lpfA</i>	F: CTTTCGCTGCTGAATCTGGT R: CAGTGTTAACAGAAACCAGT	56	250	BÄUMLER and HEFFRON, 1995

¹ Forward, F; Reverse, R. ² Temperatura de anelamento, TA. ³ Tamanho do amplicon, Tamp.

3.9 Tipagem plasmidial e detecção de integrons

A detecção das famílias de plasmídeos – grupos de incompatibilidade – (FIA, FIB, FIC, F_{repB} , HI1, HI2, I1, L/M, A/C, N, W, P, T, K, X, Y, U, R, *ColE-like*) pela da tipagem de *replicons* (do inglês *PCR-based replicon typing*) e os integrons de classe 1 (*intI1*), de classe 2 (*intI2*) e de classe 3 (*intI3*) foram pesquisados por PCRs de acordo com os itens 3.4.1.1, 3.4.1.2 e 3.4.1.3 (Tabela 5).

Tabela 5. Iniciadores utilizados na tipagem plasmidial e na detecção de integrons

Inc/ integron	Primer (5'-3') ¹	TA (°C) ²	Tamp (pb) ³	Referência
F_{repB}	F: TGATCGTTTAAGGAATTTTG R: GAAGATCAGTCACACCATCC	52	270	CARATTOLI et al., 2005
FIA	F: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG R: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	60	462	CARATTOLI et al., 2005
FIB	F: GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	60	702	CARATTOLI et al., 2005
FIC	F: GTGAACCTGGCAGATGAGGAAGG R: TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	60	262	CARATTOLI et al., 2005
HI1	F: GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC R: TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	60	471	CARATTOLI et al., 2005
HI2	F: TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC R: GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	60	644	CARATTOLI et al., 2005
I1	F: CGAAAGCCGGACGGCAGAA R: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	60	139	CARATTOLI et al., 2005
L/M	F: GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG R: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	60	785	CARATTOLI et al., 2005
A/C	F: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA R: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	60	465	CARATTOLI et al., 2005
N	F: GTCTAACGAGCTTACCGAAG R: GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	60	559	CARATTOLI et al., 2005
W	F: CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG R: GGTGCGCGGCATAGAACCGT	60	242	CARATTOLI et al., 2005
P	F: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA R: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	60	534	CARATTOLI et al., 2005
T	F: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT R: CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	60	450	CARATTOLI et al., 2005
K	F: GCGGTCCGAAAAGCCAGAAAAC R: TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	60	160	CARATTOLI et al., 2005
X	F: AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT R: GAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	60	376	CARATTOLI et al., 2005
Y	F: AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG R: GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	60	765	CARATTOLI et al., 2005
U	F: TCACGACACAAGCGCAAGGG R: TCATGGTACATCTGGGCGC	60	843	GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2009
R	F: TCGCTTCATTCTGCTTCAGC R: GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA	60	251	GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2009
<i>ColE-like</i>	F: GTTCGTGCATACAGTCCA R: GCGAAACCCGACAGGACT	60	187	GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2009
<i>intI1</i>	F: CAGTGGACATAAGCCTGTTC R: CCCGAGGCATAGACTGTA	55	160	KOELEMAN et al., 2001
<i>intI2</i>	F: CACGGATATGCGACAAAAAGGT R: GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	60	789	PLOY et al., 2000
<i>intI3</i>	F: GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG R: ACGGATCTGCCAAACCTGACT	60	979	PLOY et al., 2000

¹ Forward, F; Reverse, R. ² Temperatura de anelamento, TA. ³ Tamanho do *amplicon*, Tamp.

3.10 Tipagem e subtipagem de *E. coli*

3.10.1 Grupos filogenéticos

Os grupos filogenéticos A, B1, B2, C, E, D e F foram identificados utilizando o método de filotipagem de *Clermont* (do inglês *Clermont Escherichia coli phylo-typing method*) (Tabela 6). As PCRs foram realizadas com as condições descritas no item 3.4.1.1 e os produtos amplificados foram visualizados como descrito no item 3.4.1.2.

Tabela 6. Iniciadores utilizados na determinação dos grupos filogenéticos

Gene ¹	Primer (5'-3') ²	TA (°C) ³	Tamp (pb) ⁴	Referência
<i>chuA</i>	F: ATGGTACCGGACGAACCAAC R: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	59	288	CLERMONT et al., 2000, 2013
<i>yjaA</i>	F: CAAACGTGAAGTGTGTCAGGAG R: AATGCGTTCCTCAACCTGTG	59	211	CLERMONT et al., 2013
TspE4.C2	F: CACTATTCGTAAGGTCATCC R: AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	59	152	CLERMONT et al., 2013
<i>arpA</i>	F: AACGCTATTCGCCAGCTTGC R: TCTCCCCATACCGTACGCTA	59	400	CLERMONT et al., 2004, 2013
<i>arpA</i> *	F: GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC R: GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	57	301	LESCAT et al., 2013
<i>trpA</i> #	F: AGTTTTATGCCAGTGCGAG R: TCTGCGCCGGTACGCCC	59	219	LESCAT et al., 2013

¹ Específico para o grupo filogenético E, *. Específico para o grupo filogenético C, #. ² Forward, F; Reverse, R.

³ Temperatura de anelamento, TA. ⁴ Tamanho do *amplicon*, Tamp.

3.10.2 Multilocus Sequence Typing

A técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) foi realizada seguindo o esquema de Achtman utilizando os genes *housekeeping adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA* (Tabela 7). As PCRs foram realizadas com as condições descritas no item 3.4.1.1 e os produtos amplificados foram visualizados e sequenciados como descritos nos itens 3.4.1.2 e 3.4.1.3, respectivamente. Os perfis alélicos, as sequências tipo (ST – do inglês *sequence type*) e os complexos clonais (CC – do inglês *clonal complex*) foram determinados no *website* PubMLST.org (https://pubmlst.org/bigssdb?db=pubmlst_ecoli_achtman_seqdef) (JOLLEY et al., 2018).

Tabela 7. Iniciadores utilizados na tipagem por MLST

Gene	Primer (5'-3') ¹	TA (°C) ²	Tamp (pb) ³	Referência
<i>adk</i>	F: TCATCATCTGCACTTTCCGC R: CCAGATCAGCGGAACTTCA	54	583	WIRTH et al., 2006
<i>fumC</i>	F: TCACAGGTCGCCAGCGCTTC R: GTACGCAGCGAAAAAGATTC	54	806	WIRTH et al., 2006
<i>gyrB</i>	F: TCGGCGACACGGATGACGGC R: ATCAGGCCTTACGCGCATC	60	911	WIRTH et al., 2006
<i>icd</i>	F: ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA R: GGACGCAGCAGGATCTGTT	54	878	WIRTH et al., 2006
<i>mdh</i>	F: AGCGGTTCTGTTCAAATGC R: CAGGTCAGAACTCTCTCTGT	60	932	WIRTH et al., 2006
<i>purA</i>	F: CGCGCTGATGAAAAGAGATGA R: CATACGGTAAGCCACGCAGA	54	816	WIRTH et al., 2006
<i>recA</i>	F: ACCTTTGTAGCTGTACCACG R: AGCGTGAAGGTAAAACCTGTG	58	780	WIRTH et al., 2006

¹ Forward, F; Reverse, R. ² Temperatura de anelamento, TA. ³ Tamanho do *amplicon*, Tamp.

3.10.3 FimH-type

A subtipagem pelo gene *fimH* (975 pb) foi realizada com os iniciadores fimH-F (5'-CACTCAGGGAACCATTCAGGCA-3') e fimH-R (5'-TTATTGATAAAACAAAAGTCAC-3') com a temperatura de anelamento de 57 °C. As PCRs foram realizadas com as condições descritas no item 3.4.1.1 e os produtos amplificados foram visualizados e sequenciados como descritos nos itens 3.4.1.2 e 3.4.1.3, respectivamente. Os alelos do gene *fimH* foram determinados pelo *FimTyper 1.0* (ROER et al., 2017).

3.11 Sequenciamento completo dos genomas

Os sequenciamentos completos dos genomas (WGS – do inglês *whole-genome sequencing*) foram realizados pela metodologia de *short-reads* utilizando as plataformas *Illumina MiSeq*, *NextSeq* ou *NovaSeq* (Illumina Inc., EUA). Os DNAs genômicos foram extraídos utilizando o *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e as bibliotecas do tipo *paired-end* foram geradas pelo *Nextera XT DNA Library Preparation Kit* (Illumina Inc., EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações das bibliotecas foram determinadas pelo *Qubit 2.0 Fluorometer* (Thermo Scientific, EUA) utilizando o *Qubit™ dsDNA HS Assay Kit* (Thermo Scientific, EUA) e os tamanhos dos fragmentos foram avaliados pelo método de eletroforese capilar através do *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, EUA). Os sequenciamentos foram realizados no Laboratório Nacional de Biorrenováveis que compõe o Centro Nacional de Pesquisa em

Energia e Materiais, no Centro de Facilidades de apoio a Pesquisa (CEFAP-GENIAL) no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo ou na *Eurofins Genomics*. A montagem *de novo* dos genomas foi realizada utilizando o *Genomics Workbench v.12* (Qiagen Bioinformatics, Dinamarca) ou o *SPAdes v.3.9* (NURK et al., 2013). Os genomas foram anotados utilizando o *Rapid Annotation using Subsystems Technology v.2.0* (RAST) (AZIZ et al., 2008; BRETTIN et al., 2015) e depositados publicamente no *GenBank*®.

3.11.1 Detecção do resistoma e do viruloma

Os ARGs foram detectados pelo *ResFinder v.3.1/4.1* (BORTOLAIA et al., 2020) e/ou *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (MCARTHUR et al., 2013). As mutações nas QRDR (GyrA, ParC e ParE) foram determinadas utilizando o *PointFinder (ResFinder v.3.1/4.1)* (BORTOLAIA et al., 2020; ZANKARI et al., 2020), enquanto que as mutações nos sistemas de dois componentes PmrAB e PhoPQ e no regulador negativo MgrB foram identificadas *in-house* pelo *Geneious Prime v.2021* (Biomatters Ltd., Nova Zelândia). O alinhamento das sequências com as de referência e o impacto das mutações foram determinados como descritos no item 3.7. Os genes de virulência foram detectados pelo *VirulenceFinder v.2.0* (JOENSEN et al., 2014; MALBERG et al., 2020).

3.11.2 Análise e montagem dos plasmídeos

Os grupos de incompatibilidade plasmidial foram pesquisados e tipados através do *PlasmidFinder v.2.1* e *pMLST v.2.0*, respectivamente (CARATTOLI et al., 2014). A predição dos *contigs* dos plasmídeos foi realizada utilizando o *mlplasmids v.2.1.0* (ARREDONDO-ALONSO et al., 2018) e a relação com os ARGs e com os genes de virulência foi inicialmente determinada pelo *MobileElementFinder* (JOHANSSON et al., 2020). Os *gaps* foram fechados de acordo com CERDEIRA et al. (2011) e os plasmídeos foram manualmente curados utilizando o *Geneious Prime v.2021* (Biomatters Ltd., Nova Zelândia) e o *BLASTn* (NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2016). As ISs e os integrons foram identificados utilizando o *ISFinder* (SIGUIER et al., 2006) e o *INTEGRALL* (MOURA et al., 2009), respectivamente. Os plasmídeos foram alinhados utilizando o *MAUVE* (DARLING et al., 2004) e as figuras foram geradas pelo *Easyfig* (SULLIVAN et al., 2011). Os plasmídeos montados foram depositados publicamente no *GenBank*®.

3.11.3 Tipagem e subtipagem de *E. coli* pelo WGS

As STs foram determinadas utilizando o *MLST v.2.0* (WIRTH et al., 2006; LARSEN et al., 2012) e o *core genome MLST (cgMLST)* foi identificado através do *cgMLSTFinder v.1.1* (ZHOU et al., 2020). Os grupos filogenéticos, os sorotipos (O:H) e o *FimH-type* foram determinados utilizando o *ClermonTyping* (BEGHAIN et al., 2018), o *SerotypeFinder v.2.0* (JOENSEN et al., 2015) e o *FimTyper v.1.0* (ROER et al., 2017), respectivamente.

3.12 Ensaio de mobilização plasmidial

O método de conjugação em caldo foi realizado nos isolados positivos para o gene *mcr-1* utilizando a linhagem receptora *E. coli* C600 resistente à azida sódica. As linhagens doadoras e a receptora foram inoculadas em caldo *Luria Bertani Broth (LB)* (Oxoid, Reino Unido) a 35 ± 2 °C por 18 horas e, posteriormente, foram preparadas suspensões na proporção 3:1:1 (receptora:doadora:caldo LB) que foram incubadas a 35 ± 2 °C por 18 horas. Em seguida, 100 µL dos inóculos foram espalhados utilizando alças de Drigalsky em placas de ágar MacConkey (Oxoid, Reino Unido) suplementadas com 2 mg/L de colistina (Sigma-Aldrich, EUA) e 200 mg/L de azida sódica (Sigma-Aldrich, EUA), que foram incubadas a 35 ± 2 °C por até 72 horas. As possíveis transcojugantes foram selecionadas e avaliadas quanto ao fenótipo de resistência a colistina e a presença do gene *mcr-1* por PCR de acordo com os itens 3.5.2 e 3.6, respectivamente. Como controle, as linhagens doadoras e a receptora foram inoculadas separadamente em placas de ágar MacConkey contendo colistina e azida sódica, respectivamente.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Isolados obtidos de solo

Os isolados de *E. coli* foram obtidos de todas as fazendas analisadas, destacando as fazendas B, C, I e K, de onde foi obtida a maior porcentagem dos isolados. Sessenta isolados de *E. coli* foram recuperados das amostras de solo, dos quais 41 (68,3%) foram classificados como MDR e foram selecionados para a caracterização molecular. Vinte deles foram obtidos de solos com algum tipo de cultura, enquanto os outros 21 foram obtidos de solos sem nenhum tipo de cultura (**Tabela 8**). Dentre os isolados selecionados, todos apresentaram resistência para ampicilina, cefazolina, cefuroxima e cefaclor e a maioria dos isolados (> 51%) apresentou resistência para estreptomicina, tetraciclina, doxiciclina, sulfametoxazol+trimetoprim, sulfonamidas e trimetoprim. Adicionalmente, os isolados também foram resistentes (2,4% a 29,2%) para colistina, ácido clavulânico+amoxicilina, sulbactam+ampicilina, ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima, cefepima, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, levofloxacino, norfloxacino, ofloxacino, lomefloxacino, aztreonam, gentamicina, tobramicina, amicacina, minociclina, cloranfenicol, fosfomicina, nitrofurantoína. Os isolados S782 e S739 foram positivos para o teste sinérgico do duplo-disco. Nenhum isolado foi resistente à piperacilina+tazobactam e aos carbapenêmicos (ertapenem, meropenem e imipenem) (**Tabela 8**).

Baseado nos perfis de resistência aos antimicrobianos e no período de isolamento e caracterização, os isolados S366, S376, S526, S662 e S663 foram selecionados para o WGS. Os tamanhos dos genomas variaram de 4,9 a 5,2 Mb, com um conteúdo médio de GC de 50,5%. Os parâmetros de qualidade dos genomas, *BioSample* e *GenBank accession number* estão descritos na **Tabela 9**.

Tabela 8. Fontes de isolamento e perfis de resistência aos antimicrobianos dos isolados de *E. coli* MDR obtidos de amostras de solo

Fazenda	Isolado ¹	Fonte de isolamento ²	Perfil de resistência aos antimicrobianos ³
A	S366*	Goiaba	AMP, CFZ, CRX, CFC, CAZ, CRO, CTX, CPM, ATM, STP, GEN, TOB, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI
	S376*	Jaboticaba	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, TRI, CHL
B	S517	SSC	AMP, AMC, CFZ, CRX, CFC, STP, FOS
	S518	Manga	AMP, AMC, CFZ, CRX, CFC, CAZ, CRO, CTX, STP, SXT, SUL, TRI, FOS, COL
	S520	Milho	AMP, AMC, ASB, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI, COL
	S521	Limão	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI
	S522	<i>Brachiaria</i>	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX
	S523	Jaboticaba	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX
C	S512	Cana-de-açúcar	AMP, AMC, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI, COL
	S514	Cana-de-açúcar	AMP, AMC, CFZ, CRX, CFC, STP, FOS, COL
	S515	Cana-de-açúcar	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX
	S519	Cana-de-açúcar	AMP, AMC, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX
	S525	Cana-de-açúcar	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI, CHL
	S528	Cana-de-açúcar	AMP, ASB, CFZ, CRX, CFC, CAZ, CRO, CTX
D	S513	Milho	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI, CHL
	S526*	Milho	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI, FOS
	S527	SSC	AMP, CFZ, CRX, CFC, CAZ, CRO, CTX, CPM, ATM
	S549	Milho	AMP, CFZ, CRX, CFC, CAZ, CRO, CTX, CPM, ATM
E	S524	Abacate	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI, COL
F	S516	Amendoim	AMP, AMC, CFZ, CRX, CFC, SXT, SUL, TRI
G	S663*	Café	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, GEN, TOB, AMI, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI
H	S662*	Milho	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, GEN, TOB, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI
I	S480	SSC	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, GEN, TOB, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
	S481	SSC	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, GEN, TOB, TET, DOX, MIN, SXT, SUL, TRI
	S482	SSC	AMP, CFZ, CRX, CFC, CAZ, CRO, CTX, STP, GEN, TOB, AMI, TET, DOX, MIN, SXT, SUL, TRI, CHL
	S483	SSC	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, MIN, SXT, SUL, TRI, NIT
	S484	SSC	AMP, CFZ, CRX, CFC, CAZ, CRO, CTX, SXT, SUL, TRI
	S485	SSC	AMP, AMC, ASB, CFZ, CRX, CFC, CAZ, CRO, CTX, STP, GEN, TOB, SXT, SUL, TRI
	S486	SSC	AMP, AMC, ASB, CFZ, CRX, CFC, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
J	S529	SSC	AMP, AMC, ASB, CFZ, CRX, CFC, CAZ, CRO, CTX, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
	S530	SSC	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI
	S652	SSC	AMP, ASB, CFZ, CRX, CFC, CAZ, CRO, CTX, CPM, ATM, STP, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL
K	S624	SSC	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI
	S625	SSC	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI
	S647	SSC	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI, CHL, COL

	S716	SSC	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI
	S739[#]	SSC	AMP, ASB, CFZ, CRX, CFC, STP, CAZ, CRO, CTX, ATM, SXT, SUL, TRI, FOS
	S742	SSC	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI
L	S781	SSC	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI
	S782[#]	SSC	AMP, CFZ, CRX, CFC, CAZ, CRO, CTX, ATM, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
M	S623	SSC	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, GEN, TOB, AMI, TET, DOX

¹ Isolados selecionados para o WGS, *; Isolados positivos para o teste sinérgico do duplo-disco, [#]. ² Solo sem cultura, SSC. ³ Ampicilina, AMP; Ácido clavulânico+amoxicilina, AMC; Sulbactam+ampicilina, ASB; Cefazolina, CFZ; Cefuroxima, CRX; Cefaclor, CFC; Cefotaxima, CRO; Ceftriaxona, CTX; Ceftazidima, CAZ; Cefepima, CPM; Aztreonam, ATM; Estreptomicina, STP; Gentamicina, GEN; Tobramicina, TOB; Amicacina, AMI; Tetraciclina, TET; Doxiciclina, DOX; Minociclina, MIN; Ácido nalidixico, NAL; Levofloxacino, LVX; Ciprofloxacino, CIP; Norfloxacino, NOR; Ofloxacino, OFX; Lomefloxacino, LMX; Sulfametoxazol+trimetoprim, SXT; Sulfonamidas, SUL; Trimetoprim, TRI; Cloranfenicol, CHL; Colistina, COL; Fosfomicina, FOS; Nitrofurantoina, NIT. Dados: Isolados S376 e S366 (FURLAN & STEHLING, 2019a, 2019b); Isolados S480, S481, S482, S483, S484 e S485 (FURLAN et al., 2020c); Isolados S526, S662 e S663 (FURLAN et al., 2022b); Demais isolados (FURLAN & STEHLING, 2021).

Tabela 9. Características dos genomas dos isolados de *E. coli* MDR obtidos de amostras de solo e de água

Isolado ¹	Tamanho do genoma (Mb)	GC%	Cobertura (×)	BioSample	GenBank accession number
S366	5,2	50,3	107	SAMN10463796	RQOE00000000
S376	5,2	50,4	106	SAMN10477246	RQSJ00000000
S526	4,9	50,6	80	SAMN14448415	JAAVLT00000000
S662	5,0	50,6	133	SAMN14448416	JAAVLU00000000
S663	5,2	50,5	106	SAMN14448417	JAAVLV00000000
EW92	5,1	50,6	60	SAMN11831220	VCMD00000000
EW159	4,9	50,6	139	SAMN11831221	VCMC00000000
EW222	5,3	50,5	165	SAMN11831222	VCMB00000000
EW232	4,9	50,8	141	SAMN11831223	VCMA00000000
EW239	5,3	50,4	77	SAMN11831224	VCLZ00000000
EW625	5,0	50,4	350	SAMN25861734	JAKRMD00000000
EW655	4,7	50,7	522	SAMN25861729	JAKRMI00000000
EW658	5,1	50,7	431	SAMN25861727	JAKRMK00000000
EW659	4,8	50,7	580	SAMN25861728	JAKRMJ00000000
EW697	4,8	50,7	327	SAMN25861731	JAKRMG00000000
EW698	5,0	50,5	358	SAMN25861732	JAKRMF00000000
EW715	4,7	50,7	418	SAMN25861730	JAKRMH00000000
EW717	5,0	50,5	454	SAMN25861733	JAKRME00000000
EW827	5,5	50,6	328	SAMN18543060	JAGIYM00000000

¹ Isolados obtidos de amostras de solo, S; Isolados obtidos de amostras de água, EW.

Todos os isolados foram submetidos à tipagem molecular devido a escassez de dados sobre a diversidade genética em amostras de solo. O grupo filogenético A (n=19, 46,3%) foi o mais prevalente, seguido por B1 (n=18, 44%), D (n=3, 7,3%) e F (n=1, 2,4%). Os grupos filogenéticos B2, C e E não foram detectados. Trinta e oito diferentes STs foram identificados. Dentre esses STs, 23 foram atribuídos como *singletons*, enquanto os outros 14 pertenciam aos CC10 (ST10, ST34, ST48, ST195, ST488, ST1434), CC23 (ST345), CC101 (ST8246), CC155 (ST56, ST58), CC165 (ST189), CC270 (ST277), CC278 (ST278) e CC448 (ST448). Dentre todas as STs, três (ST345, ST1723, ST4477) foram detectados duas vezes em isolados obtidos de diferentes fazendas. A subtipagem por *fimH* revelou uma grande diversidade de alelos, sendo o H31 (5/36), H24/H54 (4/36) e H32/H38/H86 (3/36) os mais prevalentes e cinco isolados (S484, S516, S525, S549, S739) foram classificados como não tipáveis devido a ausência do gene *fimH* (Figura 6). Os isolados S366, S376, S526, S662 e S663 apresentaram os sorotipos O80:H26, O156:H23, O185:H2, O134:H53 e O8:H8, respectivamente.

Os isolados de *E. coli* MDR obtidos de solos apresentaram uma grande quantidade (n=176) e diversidade (n=24) de ARGs. Nesse sentido, os genes *aadA* (n=27, 65,8%), *bla_{CMY}/tetA* (n=19, 46,3%), *sull* (n=17, 41,4%) e *bla_{TEM}* (n=16, 39%) foram os mais prevalentes

dentre os isolados. Pelo menos um gene codificador de β -lactamase (*bla*_{TEM}, *bla*_{CMY}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1-like}, *bla*_{CTX-M-2} ou *bla*_{CTX-M-15}) foi detectado em cada isolado. Os isolados S782 e S739 apresentaram os genes *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-15}, respectivamente. Adicionalmente, outros genes associados à resistência aos aminoglicosídeos [*aadA*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *aph(3')-Ia*, *aac(6')-Ib*], fluorquinolonas (*qnrB*, *oqxB*), tetraciclinas [*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tet(34)*], sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*), fenicóis (*floR*, *cmlA*), trimetoprim (*dfrA*) e fosfomicina (*fosA*) também foram detectados (*GenBank accession numbers* MZ359767-MZ359784) (**Figura 6**). Os isolados S366, S482, S484, S485, S518, S527, S528, S529, S549, S652, S782 e S739 foram resistentes às cefalosporinas de espectro estendido, apresentaram CIM ≥ 32 mg/L para ceftazidima e carregavam os genes *bla*_{CMY} ou *bla*_{CTX-M}. Os isolados positivos para *bla*_{CMY} e *bla*_{CTX-M} pertenciam a 20 diferentes STs, realçando as STs do CC10 e, a maioria desses isolados, pertenciam ao grupo filogenético A. Os genes *bla*_{CTX-M-Gp8}, *bla*_{CTX-M-Gp9}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER}, *bla*_{GES}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *aac(3)-Ia*, *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ih*, *aph(3')-VI*, *ant(2'')-Ia*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetM*, *catA*, *qepA*, *oqxA*, *qnrA*, *qnrS* e *mcr* não foram identificados por PCRs.

A variante *bla*_{TEM-1B} foi detectada nos isolados S366, S376, S526, S662 e S663, enquanto as variantes *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadA24*, *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA12* e *dfrA17* foram distribuídas dentre os isolados citados anteriormente. Os isolados S366, S376 e S662 apresentaram os cassetes gênicos *dfrA17-aadA5* (In54), *dfrA1-aadA1* (In18) e *dfrA12-gcuF-aadA2* (In27), respectivamente, enquanto que o isolado S663 apresentou o elemento *intI1-dfrA5-IS26*; entretanto, o cassete do gene *dfrA5* não possuía a região conservada 3'-CS devido a uma deleção mediada pela IS26. Análises de *BLASTn* demonstraram que essas sequências possuíam 100% de identidade com outras sequências obtidas de isolados de *E. coli* recuperados de seres humanos, de animais e do meio ambiente em todo o mundo.

Dentre os isolados, oito (S366, S376, S513, S526, S662, S663, S652, S781) apresentaram resistência às fluorquinolonas com CIMs variando de 4 a 32 mg/L. Dois isolados (S513 e S781) foram positivos para os genes PMQR (*qnrB*, *oqxB*), enquanto os outros isolados apresentaram mutações nas QRDR de GyrA (S83L, D87Y, D87N), ParC (E62K, S80I) e ParE (S458A, S458T). Nenhum dos isolados apresentou conjuntamente os genes PMQR e as mutações nas QRDR (**Tabela 10**). Adicionalmente, os isolados resistentes às fluorquinolonas pertenciam aos grupos filogenéticos A e B1, diferentes STs, incluindo os pertencentes ao CC10 (ST195), CC23 (ST345), CC165 (ST189) e CC448 (ST448) e os *singletons* ST906, ST1146 e ST1797. Estes

isolados também carregavam diversos alelos do gene *fimH*. Além disso, todos os isolados abrigavam o gene *bla*_{TEM}, exceto o isolado S652 que carregava o gene *bla*_{SHV} (Tabela 10; Figura 6).

Tabela 10. CIMs e características genéticas dos isolados de *E. coli* resistentes às fluorquinolonas obtidos de amostras de solo

Isolado ¹	GF ²	ST ³	<i>fimH</i> - type	CIM (mg/L)		Mutações nas QRDR ⁵		
				Ciprofloxacino	PMQR ⁴	GyrA	ParC	ParE
S366	A	ST189	H54	16	nd	S83L, D87Y	E62K, S80I	WT
S376	B1	ST906	H61	16	nd	S83L, D87Y	E62K, S80I	S458A
S513 [#]	A	ST195	H54	8	<i>qnrB</i>	WT	WT	WT
S526	B1	ST1146	H97	4	nd	S83L, D87N	S80I	WT
S662	B1	ST448	H31	16	nd	S83L, D87N	S80I	WT
S663	B1	ST345	H35	32	nd	S83L, D87N	S80I	S458T
S652	A	ST1797	H24	4	nd	S83L, D87N	S80I	WT
S781	B1	ST345	H31	16	<i>oqxB</i>	WT	WT	WT

¹ Classificado como EAEC, [#]. ² Grupo filogenético, GF. ³ Sequência tipo, ST. ⁴ Não detectado, nd. ⁵ Ácido aspártico, D; Ácido glutâmico, E; Alanina, A; Asparagina, N; Isoleucina, I; Leucina, L; Lisina, K; Serina, S; Tirosina, Y; Treonina, T; Linhagem selvagem, ^{WT} - do inglês *wild type*.

Seis isolados (S512, S514, S518, S520, S524, S647) apresentaram CIMs que variaram de 4 a 8 mg/L e foram classificados como resistentes à colistina. Nenhum dos genes *mcr* (*mcr-1* a *mcr-9*) foi detectado; entretanto, mutações em PhoP (I44L, M175L, D181G, G215A, L222S), PhoQ (P182S, V183W, E261D, A470P), PmrA (S29G, G144S) e PmrB (H2R, T246I, D283G, V289I, Y358N) foram identificadas. A análise *in silico* pelo PROVEAN determinou as substituições em PhoP (D181G, G215A e L222S) e PhoQ (P182S, E261D e A470P) como deletérias, as quais podem ter contribuído para a resistência à colistina (Tabela 11). Adicionalmente, todos os isolados de *E. coli* resistentes à colistina abrigavam os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY} e/ou *bla*_{SHV}, destacando as ST1434 e ST48 pertencentes ao CC10 carregando o gene *bla*_{CMY} e classificados como STEC. Além disso, isolados pertenciam ao ST58/CC155 e aos *singletons* ST1723, ST1782 e ST2098, aos grupos filogenéticos A e B1 e carregavam vários alelos do gene *fimH* (Tabela 11; Figura 6).

Tabela 11. CIMs e características genéticas dos isolados de *E. coli* resistentes à colistina obtidos de amostras de solo

Isolado ¹	GF ²	ST ³	<i>fimH</i> - <i>type</i>	CIM (mg/L) ⁴ Colistina	<i>mcr</i> ⁴	Mutações ⁵				
						MgrB	PhoP	PhoQ	PmrA	PmrB
S518*	A	ST1434	H53	4	nd	WT	WT	E261D	S29G	WT
S520*	A	ST48	H37	8	nd	WT	WT	A470P	S29G	H2R
S512&	B1	ST58	H32	4	nd	WT	D181G G215A L222S	WT	S29G	D283G Y358N
S514#	A	ST1782	H32	4	nd	WT	I44L	WT	S29G	D283G Y358N
S524#	B1	ST1723	H38	4	nd	WT	I44L	WT	S29G	H2R T246I D283G V289I Y358N
S647#	B1	ST2098	H86	4	nd	WT	I44L M175L	P182S V183W	S29G G144S	D283G Y358N

¹ Isolados classificados como STEC (*), EIEC (&) e EAEC (#). ² Grupo filogenético, GF. ³ Sequência tipo, ST. ⁴ Não detectado, nd. ⁵ As mutações previstas *in silico* como neutras ou deletérias estão destacadas em verde e vermelho, respectivamente; Ácido aspártico, D; Ácido glutâmico, E; Alanina, A; Arginina, R; Asparagina, N; Glicina, G; Histidina, H; Isoleucina, I; Leucina, L; Metionina, M; Prolina, P; Serina, S; Tirosina, Y; Treonina, T; Triptofano, W; Valina, V; Linhagem selvagem, ^{WT} - do inglês *wild type*.

Vinte e três diferentes genes de virulência relacionados com DEC (*stx1*, *stx2*, *ipaH*, *aap*, *aata*, *AAprobe*, *aggR*, *eaeA*, *bfpA*), ExPEC (*iutA*, *papA*, *papC*, *kpsMT II*) e outros (*iucA*, *gad*, *iss*, *lpfA*, *iron*, *ompT*, *hlyF*, *cma*, *mchF*, *mcmA*) foram identificados (GenBank accession numbers MZ359785-MZ359799). O gene *gad* (n=40, 97,5%; glutamato descarboxilase) foi detectado na grande maioria dos isolados, enquanto o gene *iss* (n=9, 21,9%; *increased serum survival*) foi o segundo mais encontrado. Dentre os isolados, 19,2%, 14,6%, 12,2%, 12,2% e 2,4% foram classificados como EAEC (*aap*⁺, *aata*⁺, *aggR*⁺ e/ou *AAprobe*⁺), STEC (*stx1*⁺ e/ou *stx2*⁺), ExPEC (≥ 2 *papA/papC*⁺, *kpsMT II*⁺ e *iutA*⁺), EIEC (*ipaH*⁺) e tEPEC (*eaeA*⁺ e *bfpA*⁺), respectivamente (Figura 6). Dentre os isolados EAEC, cinco (S513, S527, S528, S529, S623) apresentaram o gene *aggR* e foram classificados como tEAEC. A maioria dos isolados classificados como EAEC, STEC, EIEC, tEPEC e ExPEC pertencia ao grupo filogenético A. Outros genes relacionados com a adesão, a invasão, a colonização e com os sideróforos também foram detectados. Os genes *aaiC*, *est*, *elt*, *ehxA*, *sfa/foc* e *afa/dra* não foram detectados por PCRs.

Quatorze grupos de incompatibilidade (IncF_{repB}, IncFIA, IncFIB, IncFIC, IncHI1, IncI1, IncN, IncP, IncR, IncU, IncY, ColE-like, ColpVC, ColRNAI) foram detectados. Dentre esses grupos, IncF_{repB} (n=34, 82,9%), ColE-like (n=28, 68,3%) e IncFIB (n=18, 43,9%) foram os mais prevalentes. Diversos grupos de incompatibilidade foram identificados nos isolados de *E. coli* positivos para os genes *bla*_{CMY} e *bla*_{CTX-M}, salientando a presença do IncF_{repB}. Todos os isolados apresentaram o gene *intI1* (do inglês *class 1 integron-integrase gene*) e alguns cassetes gênicos e elementos associados ao gene *intI1* foram identificados possivelmente em *contigs* de plasmídeos. No entanto, não foi possível determinar o Inc dos mesmos (**Figura 6**). Os grupos de incompatibilidade IncHI2, IncL/M, IncA/C, IncW, IncT, IncK e IncX e os integrons *intI2* e *intI3* não foram identificados por PCRs.

Diante desses resultados, foi possível observar que os isolados resistentes às cefalosporinas de espectro estendido, fluorquinolonas e colistina foram recuperados principalmente de solos com culturas, os quais possuíam um histórico de uso de dejetos de animais como fertilizantes. Dentre os ARGs (**Figura 7A**), os de virulência e os patotipos (**Figura 7B**), e os grupos de incompatibilidade/*intI1* (**Figura 7C**) detectados neste estudo, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *tet(34)*, *qnrB*, *dfra*, *aatA*, *bfpA*, *lpfA*, *cma*, *mchF*, *mcmA*, tEPEC, ColpVc e ColRNAI foram identificados apenas em solos com culturas, enquanto os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA-1-like}, *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *oqxB*, *iucA*, IncFIC e IncI1 foram detectado apenas nos solos sem culturas. Os demais genes/alvos e patotipos foram distribuídos dentre os dois tipos de solo. A tipagem e a subtipagem dos isolados indicaram uma grande diversidade genética, destacando as STs pertencentes ao CC10, dentre as diferentes amostras de solo (**Tabela 8; Figura 6**).

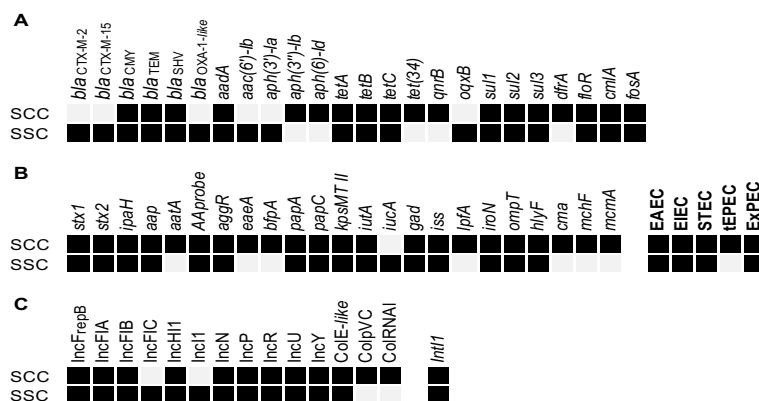


Figura 7. Distribuição dos genes/alvos identificados em solos com culturas (SCC) e solos sem culturas (SSC).

A. ARGs. **B.** Genes de virulência e patotipos. **C.** Grupos de incompatibilidade e *IntI1*. A presença e a ausência dos genes/alvos estão representadas por quadrados pretos e cinzas, respectivamente.

4.2 Isolados obtidos de água

Duzentos isolados de *E. coli* foram recuperados das amostras de água, dos quais 64 (32%) foram classificados como MDR e foram selecionados para a caracterização molecular. Dentre os isolados MDR, 33 foram obtidos de amostras de rios, 27 de amostras de ribeirões/córregos e quatro de amostras do Lago do córrego da vendinha (**Tabela 12**). Os ecossistemas aquáticos B (Rio Sapucaí) e Q (Ribeirão dos Bagres) são fortemente afetados por poluições oriundas de áreas agrícolas, industriais e urbanas, e foram os que mais apresentaram isolados MDR. Os valores máximos recomendados de *E. coli* em ambientes aquáticos classificados como 2 e 3 são < 600 UFC/100 mL e < 2400 UFC/100 mL, respectivamente. Adicionalmente, não há valores máximos recomendados para os ambientes aquáticos classificados como classe 4 até o momento. A análise microbiológica realizada pela CETESB revelou contagens de *E. coli* maiores do que os valores máximos na grande maioria dos pontos analisados (classes 2 e 3), destacando as altas contagens em amostras em rios e em ambientes aquáticos classificados como classe 4 (> 200.000 UFC/100 mL) (**Tabela 12**). Esses dados sugerem uma influência antrópica, tendo como consequência a contaminação desses ambientes aquáticos.

Todos os isolados MDR de amostras de água apresentaram resistência para ampicilina, cefazolina, cefuroxima e cefaclor. A grande maioria dos isolados (> 73%) apresentou resistência para estreptomicina, tetraciclina, doxiciclina, sulfametoxazol+trimetoprim, sulfonamidas e trimetoprim, enquanto que 6,2% a 32,1% dos isolados também foram resistentes para colistina, ácido clavulânico+amoxicilina, sulbactam+ampicilina, ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima, cefepima, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, levofloxacino, norfloxacino, ofloxacino, lomefloxacino, aztreonam, gentamicina, tobramicina e cloranfenicol. Os isolados EW126, EW222, EW239 e EW827 foram positivos para o teste sinérgico do duplo-disco. Nenhum isolado foi resistente para piperacilina+tazobactam, ertapenem, imipenem, meropenem, amicacina, minociclina, nitrofurantoína e fosfomicina (**Tabela 13**). Diante disso, os isolados resistentes às cefalosporinas de espectro estendido, fluorquinolonas e colistina foram submetidos à tipagem e subtipagem através da determinação das STs e dos alelos do gene *fimH*, enquanto que os grupos filogenéticos foram identificados em todos os isolados. Nesse sentido, o grupo filogenético B1 (n=29, 45,3%) foi o mais prevalente, seguido do A (n=19, 29,8%), C (n=5, 7,8%), D (n=4, 6,2%), F (n=3, 4,7%) e B2/E (n=2 cada, 3,1%) (**Figura 8**).

Tabela 12. Isolados, fontes de isolamento e dados microbiológicos dos ecossistemas aquáticos utilizados neste estudo

EA ¹	Isolado	Fonte	Cidade ²	Classe CONAMA	Ponto de amostragem	Data de coleta	Dados de GPS ³	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL) ⁴				
A	EW92	Rio Mogi-Guaçu	Pirassununga	2	MOGU 02350	17/10/2018	21 55 32S, 47 22 06W	1.380				
	EW82					11/12/2018		880				
	EW414					12/12/2019		3.500				
	EW89					23/10/2018		1.060				
B	EW197	Rio Sapucaí	Altinópolis	2	SAPU 02050	13/12/2018	20 59 22S 47 14 02W	2.200				
	EW625					03/02/2020		2.800				
	EW717		Restinga	2	SAPU 02250	13/02/2020	20 43 46S 47 31 18W	3.900				
	EW698		Batatais	2	SAPU 02200	12/02/2020	20 46 16S 47 27 54W	5.900				
	EW697		São José da Bela Vista	2	SAPU 02270	12/02/2020	20 42 27S47 35 05W	18.000				
	EW658			2	SAPU 02300	10/02/2020	20 38 36S 47 40 23W	980				
	EW659		São Joaquim da Barra	2	SAPU 02400	10/02/2020	20 31 24S 47 49 39W	7.300				
	EW655		Guaíra	2	SAPU 02900	06/02/2020	20 12 13S 48 17 24W	7.200				
	EW715		Patrocínio Paulista	4	SAPZ 04500	13/02/2020	20 37 59S47 17 02W	6.200				
C	EW207	Rio Grande	Miguelópolis	2	GRDE 02271	03/12/2018	20 09 10S 48 01 58W	136				
D	EW209	Rio Carmo	Ituverava	4	CARM 04400	03/12/2018	20 16 47S, 47 47 49W	1.140				
	EW434					14/10/2019		560				
E	EW216	Rio Pardo	Ribeirão Preto	2	PARD 02500	04/12/2018	21 06 00S, 47 45 44W	50.000				
	EW268					07/08/2019		20.000				
	EW223					Pontal		2	PARD 02600	04/12/2018	20 57 58S, 48 01 40W	20.000
	EW508					Jaborandi		2	PARD 02750	11/12/2019	20 36 56S, 48 20 06W	1.500
F	EW334	Rio Tietê	São Paulo	4	TIET 04200	11/07/2019	23 31 11S, 46 44 47W	2.900.000				
	EW358		Itaquaquetuba	3	TIET 03130	11/07/2019	23 28 19S, 46 20 50W	27.000				
	EW374		Mogi das Cruzes	2	TIET 02090	11/07/2019	23 32 55S, 46 08 09W	136				
	EW384		Biritiba Mirim	2	TIET 02050	11/07/2019	23 33 54S, 46 00 57W	106				
G	EW420	Rio da Prata	Espírito Santa do Pinhal	2	PRAT 02400	21/08/2019	22 49 36S, 45 40 51W	96.000				
	EW476					11/12/2019		42.000				
H	EW423	Rio Jacaré-Guaçu	Ribeirão Bonito	3	JCGU 03200	13/11/2019	22 00 58S, 48 07 28W	5.900				
I	EW442	Rio Canoas	Mococa	2	CANO 02000	03/12/2019	21 25 20S, 46 59 45W	2.000				
J	EW396	Rio Preto	Ipiruá	4	PRET 04300	03/09/2019	20 37 40S, 49 21 18W	59.000				
	EW454					19/11/2019		640.000				
	EW385					São José do Rio Preto		2	RPRE 02200	17/07/2019	20 48 34S, 49 22 34W	440
K	EW460	Rio São José dos Dourados	Monte Aprazível	2	SJDO 02150	19/11/2019	20 43 02S, 49 46 00W	400				
L	EW462	Rio Turvo	Nova Granada	2	TURV 02800	19/11/2019	20 29 58S, 49 12 40W	400				
M	EW51	Ribeirão da Onça	Palmares Paulista	2	ONCA 02500	29/11/2018	21 04 41S, 48 47 31W	1.260				
	EW52					21/11/2019		500				
N	EW500	Ribeirão das Onças	Luis Antonio	2	RONC 02030	03/12/2019	21 31 58S 47 41 17W	80				
O	EW81	Ribeirão do Moquem	Santa Cruz da Conceição	2	QUEM 02700	01/10/2018	22 08 06S, 47 27 13W	30				

	EW205					03/12/2018		640
	EW159					17/12/2018		14
P	EW222	Ribeirão do Sertãozinho	Sertãozinho	4	SETA 04600	29/11/2018	21 05 19 S 48 02 40W	700.000
	EW239					04/12/2018		840.000
Q	EW126	Ribeirão dos Bagres	Franca	4	BAGR 04020	24/10/2018	20 31 14S, 47 22 28W	940
	EW128			4	BAGR 04500	23/10/2018	20 33 18S, 47 24 50W	28
	EW494					24/10/2019		23.000
	EW132		Batatais	4	BAGR 04950	23/10/2018	20 41 43S, 47 34 15W	1.380
	EW488		Restinga	4	BAGR 04600	24/10/2019	20 37 51S, 47 28 18W	240.000
R	EW173	Ribeirão Preto	Bonfim Paulista	4	RIPE 04300	29/11/2018	21 16 02S, 47 49 08W	12.000
	EW213					04/12/2018		24.000
	EW504					03/12/2019		250.000
	EW506		Ribeirão Preto	4	RIPE 04900	16/10/2019	21 05 13S, 47 48 56W	540.000
S	EW236	Ribeirão São Domingos	Sertãozinho	4	SDOM 04300	13/09/2018	21 09 30S, 48 56 32W	2.200
	EW232					29/11/2018		2.500
T	EW406	Ribeirão do Marinheiro	Pedranópolis	4	MARI 04250	09/03/2019	20 17 33S, 50 04 47W	19.000
	EW464					26/11/2019		35.000
U	EW227	Córrego do Tanquinho	Ribeirão Preto	2	TKIN 02950	04/12/2018	21 08 34S, 47 48 09W	18.000
	EW827					18/02/2020		210.000
V	EW400	Córrego da Biluca	São José do Rio Preto	2	BILU 02900	16/07/2019	20 51 12S, 49 25 57W	480
	EW458					19/11/2019		200
W	EW496	Córrego Rico	Monte Alto	2	RICO 02200	04/12/2019	21 18 38S, 48 27 42W	43
	EW502		Barrinha	3	RICO 03900	04/12/2019	21 14 01S, 48 10 48W	2.500
X	EW83	Lago do córrego da vendinha	Sertãozinho	2	LVEN 02501	01/10/2018	21 07 58S, 48 02 00W	6
	EW116					23/10/2018		2
	EW394					13/09/2019		800
	EW452					01/11/2019		144

¹ Ecossistema aquático, EA. ² Todas as cidades pertencem ao estado de São Paulo. ³ Dados do Sistema de Posicionamento Global (GPS - do inglês *Global Positioning System*); Latitude para o Sul, S; Longitude para o Oeste, W. ⁴ Dados microbiológicos de acordo com Relatório Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo (2018-2020) (<https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios/>); Valores acima do recomendado estão destacados em negrito. Dados: Isolados EW92, EW159, EW222, EW232 e EW239 (FURLAN et al., 2020d); Isolado EW827 (FURLAN et al., 2021a); Isolados EW625, EW655, EW658, EW659, EW697, EW698, EW715 e EW717 (FURLAN et al., 2022d). Demais isolados (FURLAN et al., 2020c).

De acordo com os perfis de resistência aos antimicrobianos, período de isolamento e o *screening* dos genes *mcr*, os isolados EW92, EW159, EW222, EW232, EW239, EW625, EW655, EW658, EW659, EW697, EW698, EW715, EW717 e EW827 foram selecionados para o WGS. Os tamanhos dos genomas variaram de 4,7 a 5,5 Mb, com um conteúdo médio de GC de 50,6%. Os parâmetros de qualidade dos genomas, *BioSample* e *GenBank accession numbers* estão descritos na **Tabela 9**. De modo complementar à tipagem molecular, os isolados EW159, EW222, EW232, EW239, EW625, EW659, EW697, EW698, EW171 e EW827 apresentaram os sorotipos O162:H7, O1:H6, O159:H21, O11:H4, O10:H45, O101:H9, O89:H10, O24:H10, O166:H15 e ONT:H4, respectivamente.

Os isolados de *E. coli* MDR obtidos de amostras de água demonstraram uma abundância (n=302) e diversidade (n=35) de ARGs, destacando a presença dos genes *mcr-I* (*mcr-I.1* e *mcr-I.26*) e *bla*_{CTX-M} (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-14} e *bla*_{CTX-M-15}). Todos os isolados, exceto o EW625, apresentaram pelo menos um gene codificador de β-lactamase. Os genes *bla*_{TEM} (n=50, 78,1%), *aadA* (n=38, 65,8%), *tetA* (n=33, 51,6%) e *sulI* (n=31, 48,4%) foram os mais prevalentes dentre os isolados. Outros genes associados à resistência aos β-lactâmicos (*bla*_{CMY}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-9}), aminoglicosídeos [*aac*(6')-Ib, *aac*(3)-IIId, *aph*(3')-Ia, *aph*(3'')-Ib, *aph*(6)-Id, *ant*(2'')-Ia], fluorquinolonas [*aac*(6')-Ib-cr, *qnrB*, *qnrS*, *oqxB*], tetraciclina (*tetB*, *tetC*), sulfonamidas (*sul2*, *sul3*), fenicóis (*floR*, *cmlA*, *catA*), trimetoprim (*dfrA*), lincosamidas [*lnu*(F)], macrolídeos [*mph*(A), *mdf*(A), *erm*(B)] (*GenBank accession numbers* OK001307-OK001307) também foram identificados (**Figura 8**). Os genes *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER}, *bla*_{GES}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *aac*(3)-Ia, *aac*(3)-IIa, *aac*(6')-Ih, *aph*(3')-VI, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetM*, *qepA*, *oqxA*, *qnrA* e *fosA* não foram detectados por PCRs.

Tabela 13. Perfis de resistência aos antimicrobianos nos isolados de *E. coli* MDR obtidos de amostras de água

EA ¹	Isolado ²	Perfil de resistência aos antimicrobianos ³
A	EW92*	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI, COL
	EW82	AMP, CFZ, CRX, CFC, CRO, CTX, CAZ, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
	EW414	AMP, CFZ, CRX, CFC, SXT, SUL, TRI
	EW89	AMP, CFZ, CRX, CFC, CRO, CTX, CAZ, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
B	EW197	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI, CHO
	EW625*	AMP, CFZ, CRX, CFC, COL
	EW717*	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI, COL
	EW698*	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI, COL
	EW697*	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI, COL
	EW658*	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI, COL
	EW659*	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, NAL, STX, SUL, TRI, CHL, COL
	EW655*	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI, CHL, COL
	EW715*	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI, CHL, COL
	C	EW207
D	EW209	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
	EW434	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, GEN, TOB, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI
E	EW216	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI
	EW268	AMP, CFZ, CRX, CFC, CRO, CTX, CAZ, STP, TET, DOX
	EW223	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI, CHL
	EW508	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
F	EW334	AMP, CFZ, CRX, CFC, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL
	EW358	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI
	EW374	AMP, CFZ, CRX, CFC, SXT, SUL, TRI
	EW384	AMP, AMC, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI
G	EW420	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
	EW476	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI
H	EW423	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI, COL
I	EW442	AMP, AMC, ASB, CFZ, CRX, CFC, CRO, CTX, CAZ, STP, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI, CHL, COL
J	EW396	AMP, CFZ, CRX, CFC, SXT, SUL, TRI, CHL
	EW454	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
	EW385	AMP, AMC, CFZ, CRX, CFC, SXT, SUL, TRI
K	EW460	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI
L	EW462	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, SXT, SUL, TRI
M	EW51	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
	EW52	AMP, CFZ, CRX, CFC, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
N	EW500	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
O	EW81	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX

	EW205	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI, COL
	EW159*	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, TRI, CHL, COL
P	EW222*#	AMP, CFZ, CRX, CFC, CAZ, CRO, CTX, CPM, ATM, STP, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI, COL
	EW239*#	AMP, AMC, ASB, CFZ, CRX, CFC, CAZ, CRO, CTX, CPM, ATM, GEN, TOB, STP, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI, CHL, COL
Q	EW126*#	AMP, CFZ, CRX, CFC, CRO, CTX, CAZ, CPM, ATM, TET, DOX
	EW128	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, GEN, TOB, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
	EW494	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
	EW132	AMP, CFZ, CRX, CFC, GEN, TOB, STP, TET, DOX
	EW488	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
R	EW173	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, GEN, TOB, TET, DOX
	EW213	AMP, CFZ, CRX, CFC, SXT, SUL, TRI
	EW504	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
	EW506	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
S	EW236	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, NAL, CIP, LVX, NOR, OFX, LMX, SXT, SUL, TRI, COL
	EW232*	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, TRI, CHL, COL
T	EW406	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
	EW464	AMP, AMC, ASB, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI
U	EW227	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
	EW827*#	AMP, AMC, ASB, CFZ, CRX, CFC, CRO, CTX, CAZ, CPM, ATM, STP, GEN, TOB, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI, CHL, COL
V	EW400	AMP, AMC, ASB, CFZ, CRX, CFC, CRO, CTX, CAZ, GEN, TOB, STP, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL
	EW458	AMP, AMC, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
W	EW496	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
	EW502	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, LMX, OFX, NAL, SXT, SUL, TRI
X	EW83	AMP, CFZ, CRX, CFC, CRO, CTX, CAZ, ATM, SXT, SUL, TRI
	EW116	AMP, CFZ, CRX, CFC, CRO, CTX, CAZ, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
	EW394	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI
	EW452	AMP, CFZ, CRX, CFC, STP, TET, DOX, SXT, SUL, TRI, COL

¹ Ecossistema aquático, EA; ² Isolados selecionados para o WGS, *; Isolados positivos para o teste sinérgico do duplo-disco, #. ³ Ampicilina, AMP; Ácido clavulânico+amoxicilina, AMC; Sulbactam+ampicilina, ASB; Cefazolina, CFZ; Cefuroxima, CRX; Cefaclor, CFC; Cefotaxima, CRO; Ceftriaxona, CTX; Ceftazidima, CAZ; Cefepima, CPM; Aztreonam, ATM; Estreptomicina, STP; Gentamicina, GEN; Tobramicina, TOB; Tetraciclina, TET; Doxíciclina, DOX; Ácido nalidíxico, NAL; Levofloxacino, LVX; Ciprofloxacino, CIP; Norfloxacino, NOR; Ofloxacino, OFX; Lomefloxacino, LMX; Sulfametoxazol+trimetoprim, SXT; Sulfonamidas, SUL; Trimetoprim, TRI; Cloranfenicol, CHL; Colistina, COL.

As variantes *bla*_{TEM-1A}, *bla*_{TEM-1B}, *bla*_{CMY-2}, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *dfrA5*, *dfrA8*, *dfrA14* e *dfrA17* foram identificadas dentre os isolados submetidos ao WGS. O módulo *intI1-dfrA17-aadA5-qacEΔ1-sul1-ORF-chrA-padR-IS6100-mph(R)-mrx-mph(A)* com 10.166 pb foi identificado nos isolados EW92, EW222, EW655 e EW715, o qual está associado com a resistência para trimetoprim, aminoglicosídeos, compostos de quaternário de amônio, sulfonamidas, crômio e macrolídeos (**Figura 9**). Análises de *BLASTn* revelaram > 99,9% de identidade com sequências de plasmídeos obtidas de isolados clínicos e de animais da cadeia produtora de alimentos de *E. coli* distribuídas mundialmente. Curiosamente, este módulo está intimamente associado com o clone ST131-*H30* (clado C), o mesmo clone identificado no isolado EW92 (subclone *H30R1* – isento de ESBL; O25:H4), mas não nos isolados EW222 (ST1665) e EW655/EW715 (ST744; cgST29209; O101:H10). Adicionalmente, o integron de classe 1 com o cassete gênico *aadA2-lnu(F)* (*In281*) foi detectado nos isolados EW159 e EW232. Além disso, o isolado EW697 apresentou o elemento *intI1-dfrA14-ΔtniB-IS6100-ΔtniB*, onde que a região conservada 3'-CS foi deletada pela *IS6100*.

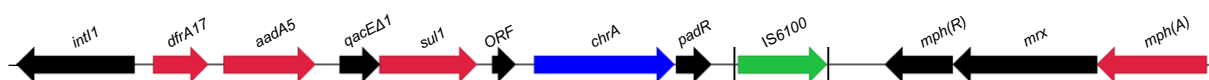


Figura 9. Representação esquemática do módulo com 10.166 pb detectado nos isolados EW92, EW222, EW655 e EW715.

As barras verticais representam as IRs. As setas vermelhas, verdes, azuis e pretas indicam os ARGs, a *IS6100*, os genes de tolerância ao crômio e os outros genes, respectivamente.

Os isolados EW82 (ST1141-*H25*), EW83 (ST2359-*H38*), EW89 (ST345-*H31*), EW116 (ST522-*H40*), EW126 (ST2521-*H31*), EW222 (ST648-*H27*), EW239 (ST354-*H58*), EW268 (ST34-*H972*), EW400 (ST7020-*H31*), EW442 (ST398-*H54*) e EW827 (ST1775-*H137*) foram resistentes às cefalosporinas de espectro estendido e apresentaram CIM ≥ 32 mg/L para ceftazidima. Os isolados EW827, EW126, EW239 e EW222 foram positivos para os genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-14} e *bla*_{CTX-M-15}, respectivamente, enquanto os demais apresentaram o gene *bla*_{CMY}. Os genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-14} e *bla*_{CTX-M-15} foram localizados nos cromossomos utilizando análises do WGS. A *ISEcp1* estava presente a montante (do inglês *upstream*) dos genes *bla*_{CTX-M-14} e *bla*_{CTX-M-15}, enquanto que a jusante (do inglês *downstream*) estavam presentes a Δ IS5-like e a *orf477*, respectivamente (*ISEcp1-bla*_{CTX-M-14}- Δ IS5-like e *ISEcp1-bla*_{CTX-M-15}-*orf477*).

O gene *bla*_{CTX-M-2} foi identificado no elemento *Tn21-like* com 29.179 pb (*GenBank accession number* MW836074) (**Figura 10**). Além do gene *bla*_{CTX-M-2}, o *Tn21-like* também

abrigava genes relacionados à transposição, ARGs (*tetA*, *aadA1*, *sul1*), ISs, o operon *merRTPCADE* (tolerância ao mercúrio), e outros. Adicionalmente, o gene *catA1* foi associado a uma *IS1-like* a montante do *Tn21-like*. A análise comparativa demonstrou que o *Tn21-like* do isolado EW827 estava mais relacionado ao *Tn21-like* associado a In117 (59% de cobertura e 99,98% de identidade nucleotídica) e ao *Tn21-like* do plasmídeo RCS58_p (62% de cobertura e 99,98% de identidade nucleotídica) de isolados de *E. coli* obtidos de seres humanos na Espanha e na França, respectivamente (**Figura 10**). O ambiente genético e a localização do gene *bla*_{CTX-M-8} do isolado EW126 não foram determinados.

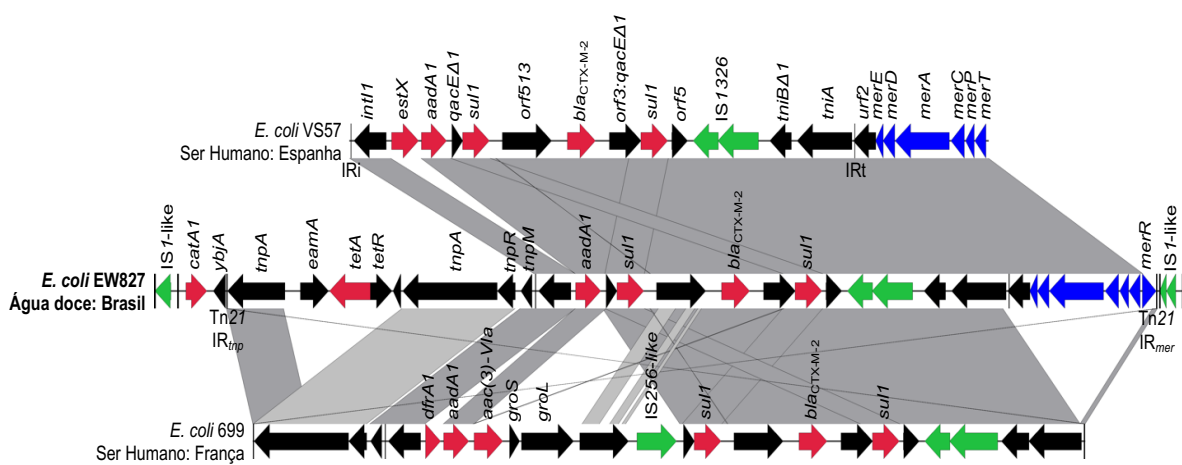


Figura 10. Comparação entre os ambientes genéticos do gene *bla*_{CTX-M-2}.

O gene *bla*_{CTX-M-2} integrado ao *Tn21-like* em isolados de *E. coli* obtidos de água doce (em negrito) e de seres humanos na Espanha (*GenBank accession number* DQ125241) e na França (*GenBank accession number* LT985268). As barras verticais representam as IRs; *IR_{tp}* e *IR_{mer}* delimitam o elemento *Tn21-like*. As setas vermelhas, verdes, azuis e pretas indicam os ARGs, as ISs, os genes de tolerância ao mercúrio e os outros genes, respectivamente. As regiões de homologia estão demonstradas em cinza. Adaptado de FURLAN et al. (2021a).

Por outro lado, o gene *bla*_{CMY-2} do isolado EW827 foi identificado em um plasmídeo IncI1-ST12, denominado pEW827-CMY-2 (*GenBank accession number* MW836073). A sequência parcial com 66.883 pb do plasmídeo pEW827-CMY-2 foi obtida da montagem *in silico* contendo 48,4% de conteúdo GC. Este plasmídeo também abrigava genes relacionados a transferência conjugativa, replicação, manutenção e elementos de inserção. A análise do ambiente genético do gene *bla*_{CMY-2} revelou a presença do contexto mais prevalente deste gene (*ISEcp1-bla*_{CMY-2}-*blc-sugE*) em plasmídeos IncI1-ST12.

O isolado EW658 (B2-ST131-H22; O25:H4) abrigava um plasmídeo híbrido e multireplicon IncF [F2:A-B1]-ΔIncQ1, denominado pEW658-TEM (*GenBank accession number* OM735810), com 151.575 pb e contendo 51% de conteúdo GC. Este plasmídeo carregava ARGs [*bla*_{TEM-1B}, *aph*(3'')-Ib, *aph*(6)-Id, *aph*(3')-Ia, *sul2*, *dfrA5*], genes de resistência

ao peróxido de hidrogênio (biocida) (*sitABCD*), genes de tolerância ao mercúrio (*merEDACPTR*) e genes de virulência (*hlyF*, *ompT*, *estC*, *iss*, *iron*, *mchF*, *cvaC*, *cia*, *traT*, *iutA*, *iucABCD*). Os ARGs estavam flanqueados principalmente pela IS26 (**Figura 11A, B**).

A análise comparativa demonstrou que o pEW658-TEM estava mais relacionado ao pVPS18EC0676-1 (96,5% de identidade nucleotídica) de um isolado de *E. coli* obtido de carne de vitela nos EUA (**Figura 11A**), diferenciando principalmente pela presença do gene de resistência *tetA* (**Figura 11B**). Adicionalmente, o pEW658-TEM também mostrou alta identidade nucleotídica (>90%) com os plasmídeos p1 e pSF-088-1 obtidos de isolados de *E. coli* associados a infecção urinária e bacteremia em seres humanos nos EUA (*GenBank accession numbers* CP071442 e CP012636).

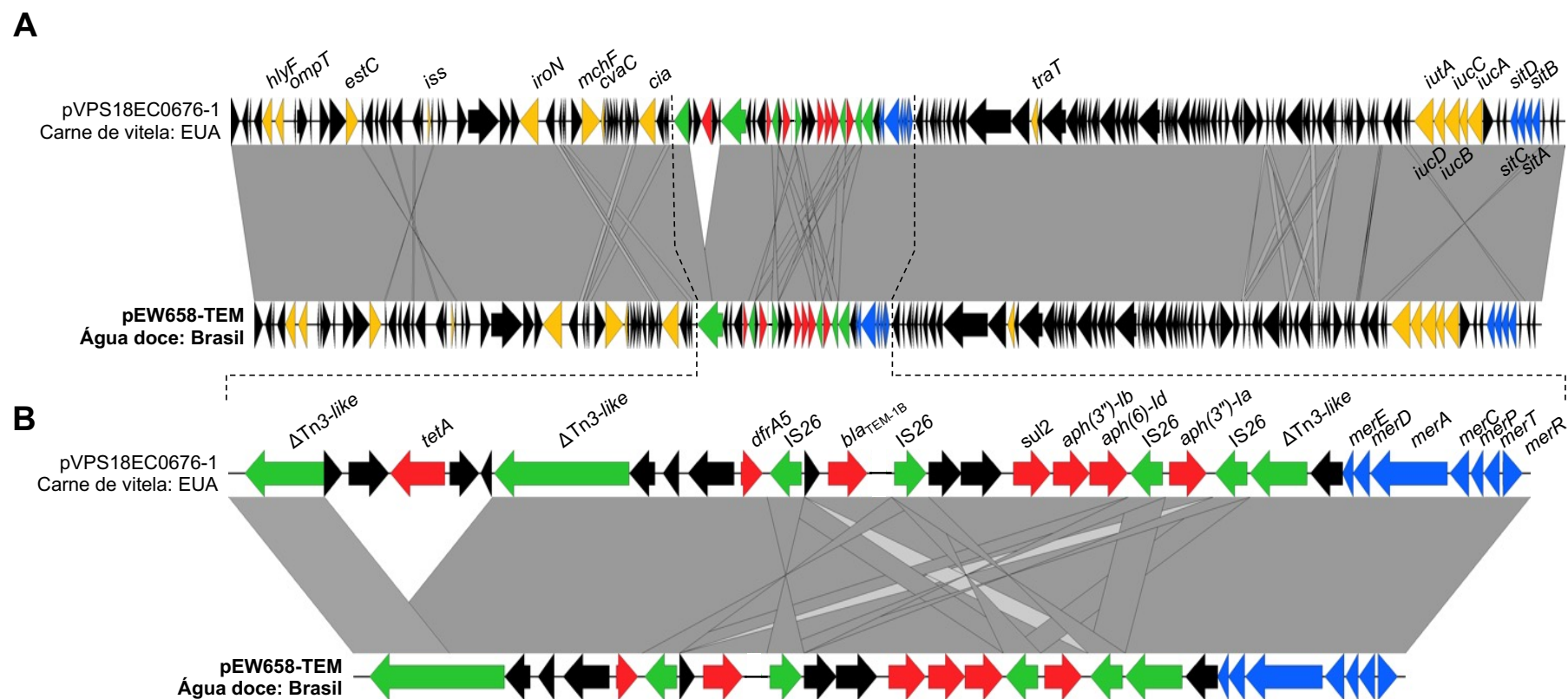


Figura 11. Comparação dos plasmídeos IncF [F2:A-B1]- Δ IncQ1 carreando ARGs, genes de resistência aos biocidas, genes de tolerância ao mercúrio e genes de virulência.

A. Plasmídeos de isolados de *E. coli* obtidos de água doce (em negrito) e carne de vitela (pVPS18EC0676-1, GenBank accession number CP063726). B. Região dos plasmídeos com os ARGs e genes de tolerância ao mercúrio. As setas vermelhas, azuis, amarelas, verdes e pretas indicam os ARGs, os genes de resistência ao peróxido de hidrogênio e de tolerância ao mercúrio, os genes de virulência, as ISs e os outros genes, respectivamente. As regiões de homologia estão demonstradas em cinza.

Dentre os isolados, 17 (EW92, EW159, EW222, EW232, EW236, EW239, EW334, EW400, EW423, EW434, EW442, EW464, EW502, EW655, EW697, EW715 e EW827) foram resistentes às fluorquinolonas, enquanto o isolado EW659 foi resistente apenas ao ácido nalidíxico. As CIMs para ciprofloxacino variaram de 0,5 a 8 mg/L. Os genes PMQR (*qnrB*, *qnrS*, *oqxB*) foram mais prevalentes do que as mutações nas QRDR de GyrA (S83L, D87N), ParC (A56T, S80I, E84G, E84V) e ParE (I129L, I355T, S458A). Nenhum dos isolados apresentou conjuntamente os genes PMQR e as mutações nas QRDR (**Tabela 14**).

Adicionalmente, esses isolados pertenciam a todos os grupos filogenéticos pesquisados (A, B1, B2, F, D e E) e diversas STs, incluindo os pertencentes ao CC10 (ST10, ST744, ST8583), CC69 (ST106), CC86 (ST1720), CC131 (ST131), CC155 (ST56, ST223), CC165 (ST165), CC278 (ST7020), CC350 (ST1775), CC354 (ST354), CC648 (ST648), CC398 (ST398) e os *singletons* ST1665 e ST540. Esses isolados carregavam diversos alelos do gene *fimH*, com uma prevalência do H54 (**Tabela 14**). Além disso, todos os isolados abrigavam pelo menos um gene codificador de β -lactamase (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY} e/ou *bla*_{TEM}), os quais podem estar associados a resistência às cefalosporinas de espectro estendido. Alguns desses isolados também apresentaram resistência para colistina associada à presença do gene *mcr-1* (**Tabela 13; Figura 8**).

Tabela 14. CIMs e características genéticas dos isolados de *E. coli* resistentes às fluorquinolonas obtidos de amostras de água

Isolado ¹	GF ²	ST ³	<i>fimH</i> - type ⁴	CIM (mg/L) Ciprofloxacino	Genes PMQR ⁵	Mutações nas QRDR ⁶		
						GyrA	ParC	ParE
EW92	B2	ST131	H30	8	nd	S83L, D87N	S80I, E84V	I529L
EW159	B1	ST1665	H31	8	<i>qnrS1</i>	WT	WT	WT
EW222	F	ST648	H27	8	nd	S83L, D87N	S80I	S458A
EW232	B1	ST223	H32	8	<i>qnrS1</i>	WT	WT	WT
EW236*	A	ST744	H54	4	<i>qnrB</i>	WT	WT	WT
EW239	F	ST354	H58	8	nd	S83L, D87N	S80I, E84G	I355T
EW334	A	ST8583	HNT	4	<i>oqxB</i> , <i>qnrB</i>	WT	WT	WT
EW400	B1	ST7020	H31	4	<i>qnrB</i>	WT	WT	WT
EW423^	D	ST106	H47	4	<i>oqxB</i>	WT	WT	WT
EW434	A	ST165	H54	4	<i>qnrB</i>	WT	WT	WT
EW442	A	ST398	H54	8	nd	S83L, D87N	S80I	WT
EW464	B1	ST56	H54	4	<i>oqxB</i> , <i>qnrB</i>	WT	WT	WT
EW502	A	ST540	H54	4	<i>qnrB</i>	WT	WT	WT
EW655	A	ST744	H54	8	nd	S83L, D87N	A56T, S80I	WT
EW659	A	ST10	H54	0,5	<i>qnrB19</i>	WT	WT	WT
EW697	A	ST1720	H54	8	nd	S83L, D87N	S80I	S458A
EW715	A	ST744	H54	8	nd	S83L, D87N	A56T, S80I	WT
EW827	E	ST1775	H137	8	nd	S83L	WT	WT

¹ Isolados classificados como STEC (*) e ExPEC (°). ² Grupo filogenético, GF. ³ Sequência tipo, ST. ⁴ Não tipável, NT. ⁵ Não detectado, nd. ⁶ Ácido aspártico, D; Ácido glutâmico, E; Alanina, A; Asparagina, N; Isoleucina, I; Glicina, G; Leucina, L; Serina, S; Treonina, T; Valina, V; Linhagem selvagem, ^{WT} - do inglês *wild type*.

Os plasmídeos IncR foram identificados nos isolados EW159 e EW232 carregando o gene *qnrS1* que estava flanqueado pela $\Delta ISKpn19$ ($\Delta ISKpn19-qnrS1-\Delta ISKpn19$). Esses plasmídeos também abrigavam o gene *bla*_{TEM-1B} e o operon *silESRCBAP* (tolerância a prata). Entretanto, não foi possível determinar a sequência completa desses plasmídeos. No isolado EW659, o plasmídeo Col(pHAD28), denominado pEW659-QnrB (*GenBank accession number* OM735811), contendo 48,1% de conteúdo GC e com 2.989 pb, foi identificado carregando o gene *qnrB19* (**Figura 12**). O plasmídeo pEW659-QnrB apresentou > 99.9% de identidade nucleotídica com outros plasmídeos distribuídos mundialmente na interface humana, animal e ambiental.

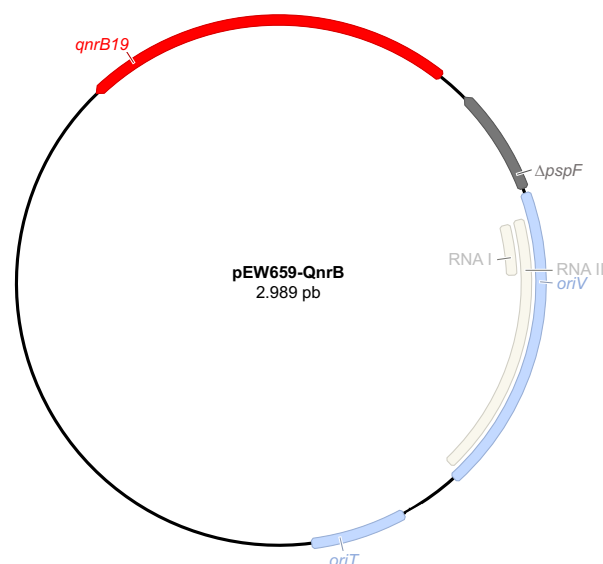


Figura 12. Mapa circular do pEW659-QnrB.

Referente a resistência à colistina, 20 isolados (EW92, EW159, EW205, EW207, EW222, EW232, EW239, EW236, EW423, EW442, EW452, EW625, EW655, EW658, EW659, EW697, EW698, EW715, EW717 e EW827) foram resistentes a este antimicrobiano (CIM 4 mg/L). O gene *mcr-1* (alelos *mcr-1.1* e *mcr-1.26*) foi detectado em sete isolados. Diversas mutações em MgrB (V8A), PhoP (I44L), PhoQ (S301N, E464D, L467M, A482T), PmrA (S29G, T31S, G144S, E221K, N222D), PmrB (H2R, E123D, S138N, T235N, T246I, D282N, D283G, Y358N, V351I, A360V) foram identificadas nos isolados positivos e negativos para o gene *mcr-1*. A análise *in silico* pelo PROVEAN determinou apenas a mutação em MgrB (V8A) como deletéria (**Tabela 15**).

Tabela 15. CIMs e características genéticas dos isolados de *E. coli* resistentes à colistina obtidos de amostras de água

Isolado ¹	GF ²	ST ³	<i>fimH</i> - <i>type</i> ⁴	CIM (mg/L) Colistina	<i>mcr</i> ⁵	Mutações ⁶				
						MgrB	PhoP	PhoQ	PmrA	PmrB
EW92	B2	ST131	H30	4	nd	WT	WT	WT	S29G N222D	WT
EW159	B1	ST1665	H47	4	nd	WT	I44L	A482T	S29G	H2R S138N D283G
EW205	B1	ST2522	H38	4	nd	WT	I44L	WT	S29G G144S	D283G Y358N
EW207	A	ST1408	H54	4	nd	WT	WT	E464D A482T	S29G N222D	H2R
EW222	F	ST648	H54	4	nd	WT	I44L	A482T	S29G	H2R S138N D283G
EW232	B1	ST223	H31	4	nd	WT	I44L	WT	S29G E221K	D283G Y358N
EW236*	A	ST744	H54	4	nd	WT	WT	WT	S29G N222D	WT
EW239	F	ST354	H37	4	nd	WT	I44L	WT	S29G	H2R D283G
EW423^	D	ST106	H47	4	nd	WT	I44L	A482T	S29G	H2R S138N D283G
EW442	A	ST398	H54	4	nd	WT	I44L	A482T	S29G	H2R S138N D283G
EW452	B1	ST1727	H31	4	nd	WT	I44L	WT	S29G E221K	D283G Y358N
EW625	F	ST6157	H394	4	nd	WT	I44L	S301N L467M	T31S	H2R T235N D283G A360V
EW655	A	ST744	H54	4	<i>mcr-1.1</i>	WT	WT	WT	WT	WT
EW658^	B2	ST131	H22	4	<i>mcr-1.26</i>	V8A	I44L	WT	T31S	H2R E123D D283G V351I
EW659	A	ST10	H54	4	<i>mcr-1.26</i>	WT	WT	WT	WT	WT
EW697	A	ST12841	HNT	4	<i>mcr-1.1</i>	WT	WT	WT	WT	WT
EW698	B1	ST1720	H54	4	<i>mcr-1.1</i>	WT	I44L	WT	WT	D283G Y358N
EW715	A	ST744	H54	4	<i>mcr-1.1</i>	WT	WT	WT	WT	WT
EW717	D	ST349	H93	4	nd	WT	I44L	A482T	WT	H2R T246I D282N D283G
EW827	E	ST1775	H137	4	<i>mcr-1.1</i>	WT	I44L	WT	S29G	H2R D283G

¹ Isolados classificados como STEC (*) e ExPEC (°). ² Grupo filogenético, GF. ³ Sequência tipo, ST. ⁴ Não tipável, NT. ⁵ Não detectado, nd. ⁶ Mutações previstas *in silico* como neutras ou deletérias estão destacadas em verde e vermelho, respectivamente; Ácido aspártico, D; Ácido glutâmico, E; Alanina, A; Arginina, R; Asparagina, N; Glicina, G; Histidina, H; Isoleucina, I; Leucina, L; Lisina, K; Metionina, M; Serina, S; Tirosina, Y; Treonina, T; Valina, V; Linhagem selvagem, ^{WT} - do inglês *wild type*.

Os isolados resistentes à colistina pertenciam a todos os grupos filogenéticos pesquisados e diversas STs pertencentes ao CC10 (ST10, ST744, ST12841), CC69 (ST106, ST1665), CC86 (ST1720), CC131 (ST131), CC349 (ST349), CC350 (ST354, ST1775), CC398 (ST398, ST648), CC446 (ST223, ST1727) e os *singletons* ST1408, ST2522 e ST6157 com diferentes alelos do gene *fimH*. Dentre os clones encontrados, destacam-se clones de alto risco (ST10, ST131, ST354, ST648, ST744) e a presença da linhagem A-ST744-H54 em três isolados (EW236, EW655 e EW715) que também foram resistentes às fluorquinolonas (**Tabela 14; Tabela 15**). O novo ST12841 (CC10) foi descrito neste estudo, o qual apresentou um novo alelo do gene *gyrB* (1237) e foi *single locus variant* do ST617/CC10. Adicionalmente, estes isolados também apresentaram genes *bla* e PMQR (**Figura 8**).

Os plasmídeos IncX4 foram identificados carreando os genes *mcr-1.1* e *mcr-1.26*. A sequência completa desses plasmídeos possuía ~ 33 kb com um conteúdo médio de GC de 41,8% (**Tabela 16**). Esses plasmídeos possuíam uma estrutura genética conservada de ~ 30 kb e abrigavam genes relacionados à transferência conjugativa, replicação, manutenção e elementos de inserção. Os plasmídeos IncX4 deste estudo compartilharam > 99% de identidade nucleotídica entre eles e > 98% com outros identificados mundialmente, como por exemplo na China, Japão, Suíça, Taiwan, na interface humana, animal e ambiental. No Brasil, esses plasmídeos demonstraram altas identidades nucleotídicas com plasmídeos IncX4 de isolados de *E. coli* obtidos de seres humanos, de animal (pinguim) e do meio ambiente (água do mar - praia). Curiosamente, o pEW827-MCR-1 abrigava um novo ambiente genético do gene *mcr-1.1*, no qual uma Δ IS5-like (258 pb) foi inserida na orientação oposta a montante do elemento *mcr-1.1-pap2* (**Figura 13**). Ensaios de conjugação confirmaram a transferência dos plasmídeos IncX4 para a célula receptora *E. coli* C600 resistente a azida sódica. As transcojugantes apresentaram CIMs de 2 a 4 mg/L para colistina e foram positivas para o gene *mcr-1*.

Tabela 16. Características dos plasmídeos IncX4 carreando o gene *mcr-1*

Isolado	Gene <i>mcr-1</i>		Nome do plasmídeo	GenBank accession number
	Alelo	Localização (tamanho)		
EW655	<i>mcr-1.1</i>	IncX4 (33.304 pb)	pEW655-MCR	OM735814
EW697	<i>mcr-1.1</i>	IncX4 (33.304 pb)	pEW697-MCR	OM735816
EW698	<i>mcr-1.1</i>	IncX4 (33.304 pb)	pEW698-MCR	OM735817
EW715	<i>mcr-1.1</i>	IncX4 (33.304 pb)	pEW715-MCR	OM735815
EW827	<i>mcr-1.1</i>	IncX4 (33.613 pb)	pEW827-MCR-1	MW836072
EW658	<i>mcr-1.26</i>	IncX4 (33.304 pb)	pEW658-MCR	OM735812
EW659	<i>mcr-1.26</i>	IncX4 (33.304 pb)	pEW659-MCR	OM735813

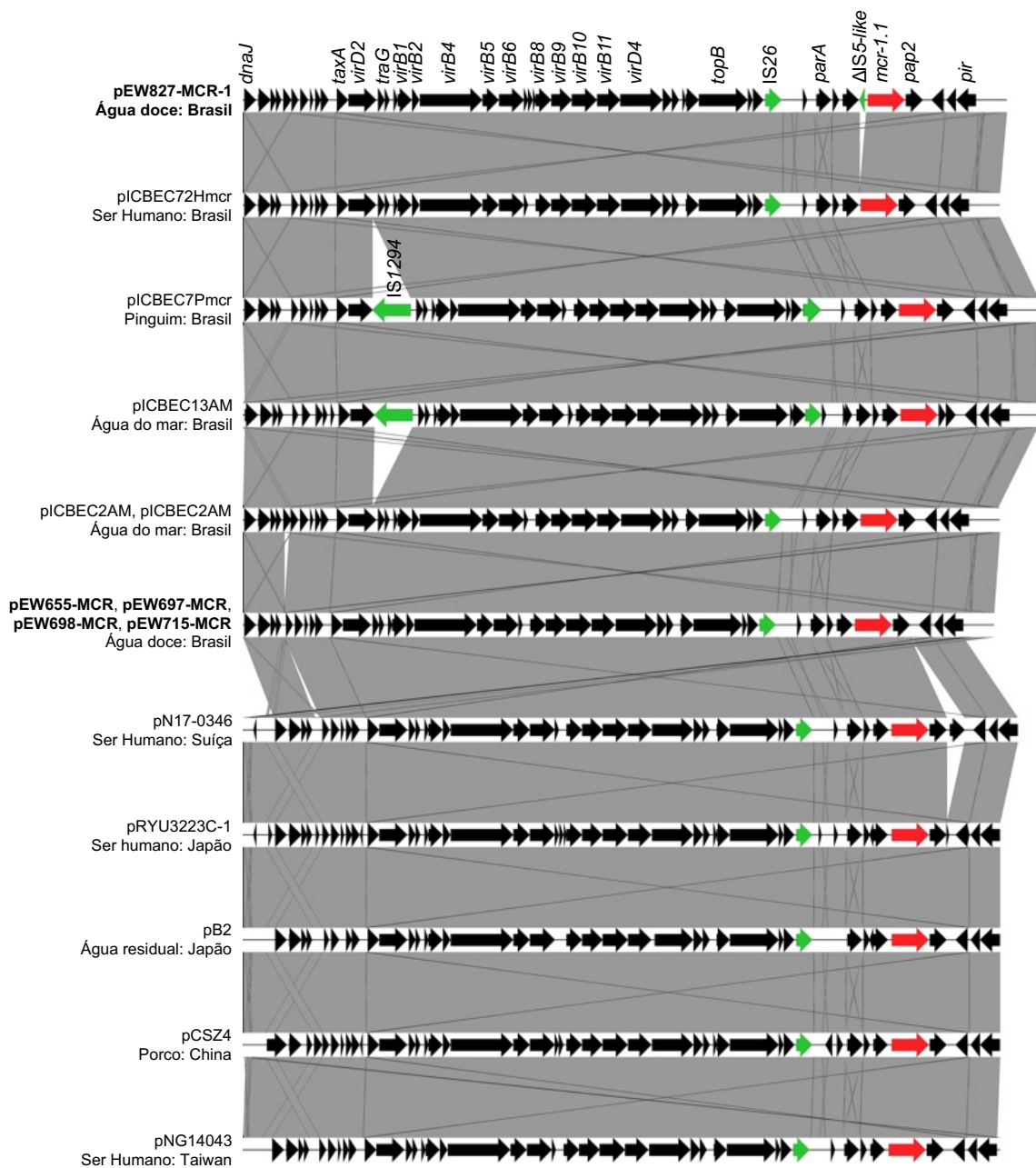


Figura 13. Representação da comparação dos plasmídeos IncX4 carreando o gene *mcr-1.1*. Plasmídeos de isolados de *E. coli* obtidos de água doce (em negrito), seres humanos (pICBEC72Hmcr, GenBank accession number CP015977; pN17-0346, GenBank accession number CP031291; pRYU3223C-1, GenBank accession number AP018411; pNG14043, GenBank accession number GenBank nº KY120364), pinguim (pICBEC7Pmcr, GenBank accession number CP017246), porco (pCSZ4, GenBank accession number KX711706), água do mar (pICBEC13AM, GenBank GenBank accession number; pICBEC3AM, GenBank accession number KY770024; pICBEC2AM, GenBank accession number KY770023) e água residual (pB2, GenBank accession number LC479085). As setas vermelhas, verdes e pretas indicam o gene *mcr-1.1*, as ISs e os outros genes, respectivamente. As regiões de homologia estão demonstradas em cinza. Adaptado de FURLAN et al. (2021a).

O gene *mcr-1.26* foi identificado pela primeira vez em um isolado clínico de *E. coli*, denominado 803-18, na Alemanha. Esse gene possui a substituição T2C quando comparado com o gene *mcr-1.1*, que causa uma substituição de Met (ATG) por Thr (ACG), denominada como a deleção de Met1 (Met1del). Essa substituição resulta em uma proteína MCR-1 mais curta (1623 aa vs. 1626 aa) cuja tradução é guiada pelo Met contíguo. Curiosamente, a Met1del nos isolados EW658 e EW659 foi devido ao códon ATA (Ile) em vez do códon ACG (Thr). Análises pelo *BLASTn* revelaram que a ocorrência do gene *mcr-1.26* é subestimada e que os plasmídeos IncX4 e IncI2 (apenas um relato) carreando este gene circulam desde 2016 em seres humanos, animais de companhia, animais da cadeia produtora de alimentos e seus derivados em diversos países, incluindo o Brasil. No entanto, até o momento, não existem descrições do gene *mcr-1.26* no meio ambiente (**Tabela 17**).

Tabela 17. Dados dos isolados positivos para o gene *mcr-1.26* distribuídos em todo o mundo

Isolado ^{1,2}	Espécie	ST ²	Fonte de isolamento	Ano ²	País	Localização do <i>mcr-1.26</i>	GenBank accession number
803-18	<i>E. coli</i>	ST155	Ser humano	2018	Alemanha	IncX4	NG_068217.1
nd	<i>E. coli</i>	nd	Ser humano	2017	Holanda	IncX4	LR882927.1
1253_17_A2	<i>E. coli</i>	ST10	Carne de peru	2017	República Tcheca	IncX4	MT929278.1
1318_17_D1	<i>E. coli</i>	ST744	Carne de peru	2017	República Tcheca	IncX4	MT929276.1
GDT6F49	<i>E. coli</i>	ST2040	Peixe	2016	China	IncX4	MF978387.1
787	<i>E. coli</i>	nd	Porco	2017	China	IncX4	MG825367.1
QDFD216	<i>E. coli</i>	ST132	Cachorro	2019	China	IncX4	CP053212.1
ICBEC79H	<i>E. coli</i>	ST224	Ser humano	2016	Brasil	IncX4	CP020376.1
TMS4	<i>E. coli</i>	ST744	Ser humano	2016	Brasil	IncX4	MH298055.1
EC91	<i>E. coli</i>	ST354	Ser humano	2016	Brasil	IncX4	MK940858.1
5134	<i>E. coli</i>	nd	Ser humano	nd	Brasil	IncX4	MN635737.1
EW658	<i>E. coli</i>	ST131	Água doce	2020	Brasil	IncX4	OM735812
EW659	<i>E. coli</i>	ST10	Água doce	2020	Brasil	IncX4	OM735813
MFDS1310	<i>E. coli</i>	nd	Carne de porco	nd	Alemanha	IncX4	MK875284.1
MCR1_NJ	<i>E. coli</i>	ST7358	Ser humano	2014	EUA	IncX4	KX447768.1
Lishui142	<i>E. coli</i>	nd	Ser humano	2016	China	IncI2	KY075654.1

¹ Os isolados deste estudo estão destacados em negrito. ² Não determinado, nd.

Apesar da alta identidade nucleotídica (> 99,9%) observada entre os plasmídeos IncX4 carreando os gene *mcr-1.26* (**Figura 14A**), diferentes regiões adjacentes ao gene *mcr-1.26* (*mcr-1 cassette*) que incluem a sequência repetida invertida, denominada IRR2, e as sequências de repetição direta (DR), foram identificadas com uma distribuição variável: grupo I) *mcr-1.26* com o códon ACG (Thr) na Holanda e na República Checa; grupo II) *mcr-1.26* com o códon ATA (Ile) e deleções a jusante do *mcr-1* na China; grupo III) *mcr-1.26* com o códon ATA (Ile) e deleções a jusante e a montante do gene *mcr-1* no Brasil, na Alemanha e nos Estados Unidos (**Figura 14B**). Além disso, os ambientes genéticos dos plasmídeos IncX4 que carregavam o gene *mcr-1.1* deste estudo foram idênticos ao do grupo III.

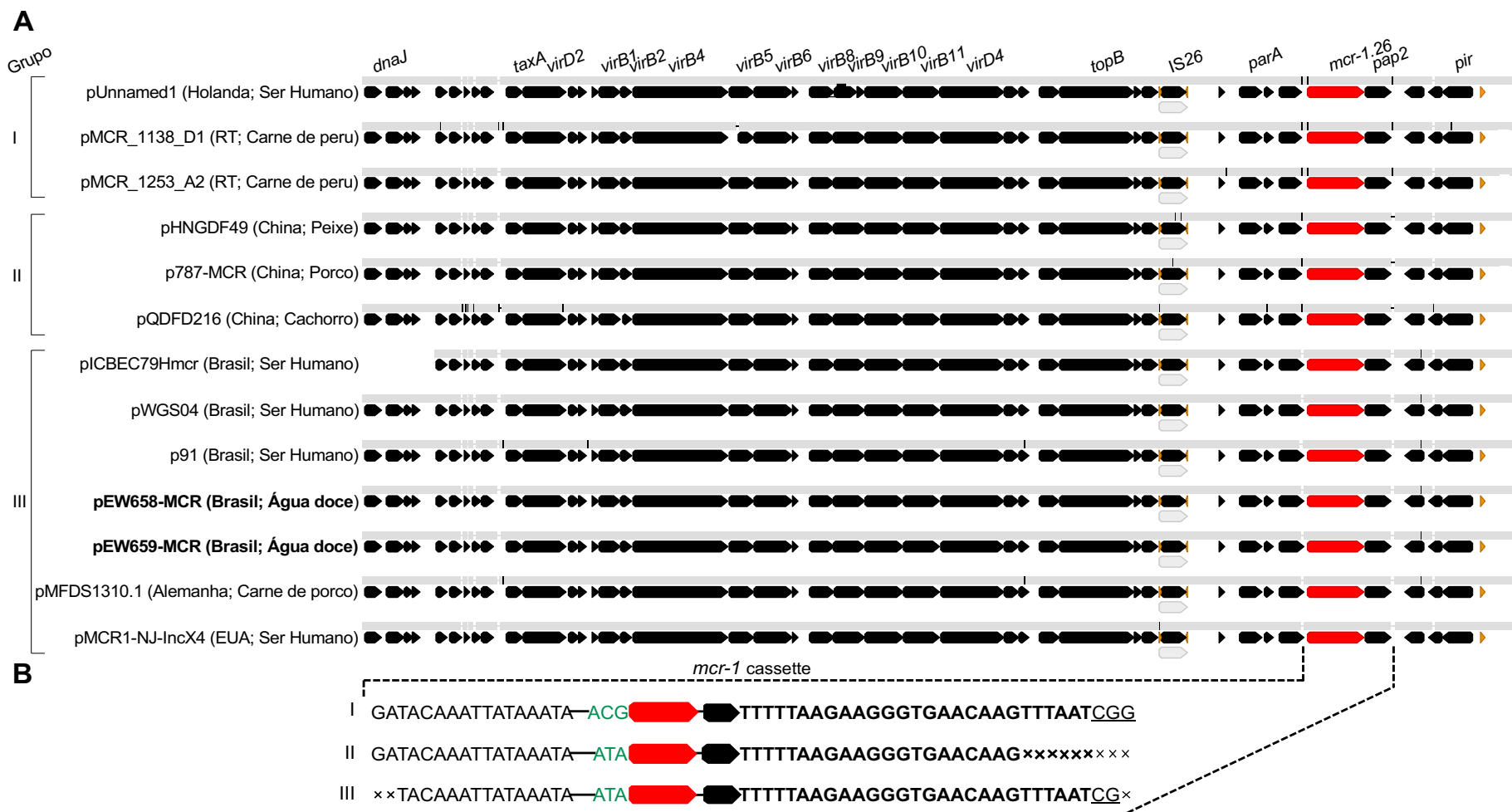


Figura 14. Comparação dos plasmídeos IncX4 e dos ambientes genéticos do gene *mcr-1.26*.

A. Alinhamento dos plasmídeos IncX4 (~ 33 kb) carregando o gene *mcr-1.26* em isolados de *E. coli* obtidos de seres humanos, de animais, de alimentos e do meio ambiente. Os *GenBank accession numbers* estão listados na **Tabela 16**. Os plasmídeos deste estudo estão destacados em negrito. As regiões de homologia estão demonstradas em cinza. República Tcheca, RT. **B.** Sequências adjacentes do gene *mcr-1.26*. Os três primeiros nucleotídeos anteriores ao gene *mcr-1.26*, IRR2 e DR estão demonstrados em verde, em negrito e sublinhado, respectivamente. Adaptado de FURLAN et al. (2022d).

Trinta e oito diferentes genes de virulência relacionados com DEC (*stx2*, *aap*, *AAprobe*), ExPEC (*iutA*, *papA*, *papC*, *kpsMT III/kpsE*) e outros (*eilA*, *iucA*, *gad*, *iss*, *lpfA*, *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *terC*, *mchF*, *traT*, *chuA*, *sitA*, *ibeA*, *estC*, *fyuA*, *irp2*, *ireA*, *neuC*, *yfcV*, *tsh*, *sat*, *iha*, *hra*, *usp*, *cma*, *air*, *cvaC*, *cia*) foram detectados (*GenBank accession numbers* OK001328-OK001339). No geral, esses genes estão relacionados com a adesão, a invasão, a colonização, os sideróforos e as toxinas. O gene *gad* (n=54, 84,3%) foi o mais prevalente, seguido de *iss/ompT* (n=12, 18,7%). Dentre os isolados, 10,9%, 7,8% e 4,7% foram classificados como ExPEC (≥ 2 *papA/papC*⁺, *kpsMT III/kpsE*⁺ e *iutA*⁺), aEAEC (*aap*⁺ e *AAprobe*⁺) e STEC (*stx2*⁺), respectivamente (**Figura 8**). A ilha de alta patogenicidade contendo os *clusters* de *yersiniabactin* (Ybt) e *invasin* (Inv) com ~ 43 kb foi identificada no isolado EW658 (B2-ST131-H22 – clado B; ExPEC). Os genes *aggR*, *ipaH*, *aatA*, *aaiC*, *bfpA*, *est*, *elt*, *ehxA*, *eaeA*, *stx1*, *sfa/foc* e *afa/dra* não foram detectados por PCRs.

Dentre os grupos de incompatibilidade detectados [*IncF_{repB}*, *IncFIA*, *IncFIB*, *IncHI1*, *IncI1*, *IncN*, *IncP*, *IncQ*, *IncR*, *IncU*, *IncX1*, *IncX4*, *IncY*, *ColE-like*, *ColpVC*, *Col4401*, *ColRNAI*, *Col(MG828)*, *Col(pHAD28)*], o *IncF_{repB}* (n=33, 51,5%) foi o mais prevalente, seguido do *IncFIB* (n=24, 37,%) e *ColE-like* (n=20, 31,2%). Como descrito anteriormente, os grupos *IncX4*, *IncI1*, *IncR*, *Col(pHAD28)* foram identificados carregando os genes *mcr-1*, *bla_{CMY-2}*, *qnrS1* e *qnrB19*, respectivamente, enquanto que o *IncF* [F2:A-B1]- Δ *IncQ1* foi identificado carregando ARGs e genes de virulência. Dezesete isolados (26,6%) apresentaram o gene *intI1*. Baseado em análises *in silico*, os cassetes genéticos, os módulos e os elementos, exceto o *Tn21-like*, associados ao gene *intI1* estavam localizados em *contigs* de plasmídeos. No entanto, não foi possível determinar os grupos de incompatibilidade dos mesmos (**Figura 8**). Os grupos de incompatibilidade *FIC*, *IncHI2*, *IncL/M*, *IncA/C*, *IncW*, *IncT* e *IncK* e os integrons *intI2* e *intI3* não foram identificados por PCRs.

Baseado nesses resultados, a grande maioria dos rios e dos ribeirões/córregos compartilharam os mesmos genes, grupos de incompatibilidade e patótipos. Dentre os ARGs (**Figura 15A**), os de virulência, os patótipos (**Figura 15B**), e os grupos de incompatibilidade/*intI1* (**Figura 15C**) identificados, os *bla_{OXA-9}*, *aac(6')-Ib-cr*, *cmlA*, *erm(B)*, *kpsE*, *terC*, *ibeA*, *fyuA*, *irp2*, *ireA*, *neuC*, *yfcV*, *sat*, *iha*, *usp*, *cia*, *IncQ*, *IncX1* e *Col(pHAD28)* foram detectados apenas em amostras de rios, enquanto que os *bla_{CTX-M}*, *aac(3)-IId*, *ant(2'')-Ia*, *qnrS*, *catA*, *lnu(F)*, *tsh*, *cma*, *Col4401* e *ColRNAI* foram encontrados apenas em amostras de ribeirões/córregos. Além disso, os genes *bla_{TEM}*, *bla_{CMY}*, *aadA*, *tetA*, *tetB*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *gad*, *IncF_{repB}*, *IncFIB*, *IncI1*, *IncU* e *ColE-like* foram detectados dentre os rios, ribeirões/córregos e no

Lago do córrego da vendinha. A tipagem e a subtipagem dos isolados indicaram um uma grande diversidade genética, ressaltando os clones de alto risco, dentre as amostras de água (Figura 8).

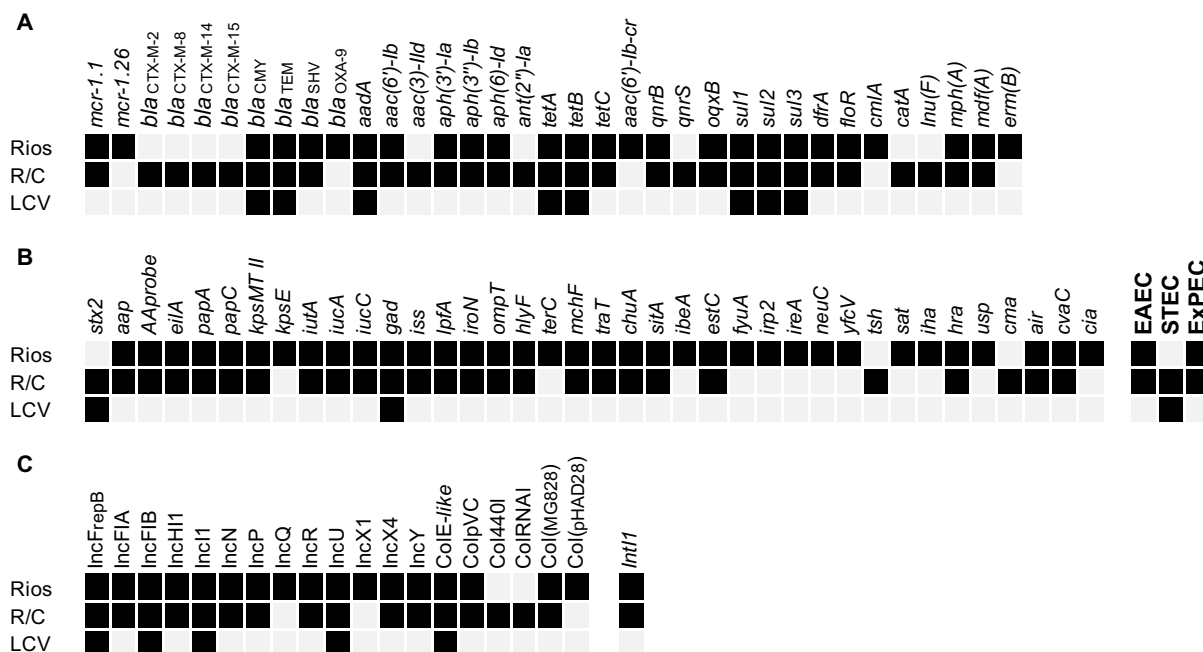


Figura 15. Distribuição dos genes/alvos identificados em rios, ribeirões/córregos (R/C) e no Lago do córrego da vendinha (LGV).

A. ARGs. **B.** Genes de virulência e patotipos. **C.** Grupos de incompatibilidade e *intI1*. A presença e a ausência dos genes/alvos estão representadas por quadrados pretos e cinzas, respectivamente.

No geral, os isolados resistentes às cefalosporinas de espectro estendido, fluorquinolonas e colistina foram detectados em amostras de solo e de água. Uma maior diversidade de ARGs, de genes de virulência e de plasmídeos foi identificada nos isolados obtidos de amostras de água, destacando os genes *mcr-1* e *bla*_{CTX-M}. Os clones de alto risco foram detectados em isolados obtidos de solo e de água. Os isolados obtidos de amostras de solo demonstraram uma maior quantidade de genes de virulência associados com DEC e uma prevalência de *intI1*.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este estudo descreve a ocorrência e a caracterização fenotípica e molecular de isolados de *E. coli* MDR obtidos de amostras de solo e de água no Brasil. Os isolados de *E. coli*, um patógeno emergente de prioridade crítica, apresentaram resistência, algumas vezes concomitante, aos antimicrobianos criticamente importantes de maior prioridade pela OMS, incluindo as cefalosporinas de espectro estendido e as polimixinas (TACCONELLI et al., 2018). A descrição de bactérias MDR e de seus ARGs clinicamente relevantes em amostras ambientais está aumentando gradativamente em todo o mundo, a qual está intimamente relacionada ao conceito de Saúde Única frente a problemática da AMR (TIEDJE et al., 2019). Dentre a interface humana, animal e ambiental, o meio ambiente é o menos explorado, uma vez que a grande maioria dos estudos é realizada com isolados bacterianos obtidos de IRAS (MCEWEN & COLLIGNON, 2018; GUARDABASSI et al., 2020).

A detecção de isolados ambientais de *E. coli* com fenótipo de resistência para as cefalosporinas de espectro estendido, os carbapenêmicos, as fluorquinolonas e as polimixinas está aumentando gradualmente, enquanto que a resistência para a ampicilina, as cefalosporinas de primeira e segunda gerações, as tetraciclínas, a estreptomicina e as sulfonamidas está se tornando comum (BEN SAID et al., 2015; OGURA et al., 2020; SAVIN et al., 2020). Por consequência, a presença de ARGs relacionados a estes fenótipos está sendo cada vez mais reportada em bactérias MDR, principalmente naquelas da família *Enterobacteriaceae*, e em DNA total de amostras ambientais (GRAHAM et al., 2016; FURLAN & STEHLING, 2017; NASCIMENTO et al., 2017; FURLAN et al., 2020b, 2021b; SAMREEN et al., 2021). Adicionalmente, as concentrações subinibitórias de antimicrobianos no meio ambiente aumentam a ocorrência da HGT e de mutações nos determinantes de resistência entre bactérias, contribuindo para o aumento e para a disseminação da AMR (DURÃO et al., 2018; KNOPP & ANDERSSON, 2018).

Diversos clones de *E. coli* MDR e uma diversidade de ARGs foram disseminados em solos com e sem culturas. A microbiota do solo possui um resistoma intrínseco diverso. No entanto, clones de *E. coli* MDR comumente reportados em seres humanos, em animais e em águas de irrigação contaminadas já foram descritos em diferentes amostras de solo (FORSBERG et al., 2014; ZHU et al., 2019). Estes fenômenos podem estar relacionados com a presença de animais da cadeia produtora de alimentos em todas as fazendas, com o uso de dejetos de animais como fertilizante orgânico nas lavouras e/ou uso de água contaminada (MA et al., 2021). Adicionalmente, o uso intensivo de antimicrobianos na pecuária e a

integração entre agricultura e pecuária também contribuem fortemente para o aumento e para a disseminação da AMR (MARTIN et al., 2015; MACEDO et al., 2020).

A presença e a ocorrência de clones de *E. coli* MDR e seus ARGs em ambientes aquáticos estão intimamente relacionados com a poluição ambiental proveniente de áreas agrícolas, industriais e/ou comerciais (PÉREZ-ETAYO et al., 2020). Além disso, os efluentes hospitalares podem afetar diretamente os ambientes aquáticos, uma vez que abrigam e transportam patógenos MDR (URŠKA et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Neste sentido, a influência de atividades antrópicas contribui vigorosamente para a disseminação da AMR para os ambientes aquáticos. Diante disso, os ambientes aquáticos atuam como reservatórios e disseminadores de patógenos MDR e ARGs clinicamente relevantes (MANAIA, 2017; LEITE et al., 2019; DOMÍNGUEZ et al., 2021).

A presença de isolados de *E. coli* MDR potencialmente patogênicos, ou seja, carreando genes de virulência associados com DEC e ExPEC, em amostras ambientais chama a atenção e causa preocupações (PITOUT et al., 2012; DALE & WOODFORD, 2015; GOMI et al., 2017; AIJUKA et al., 2018). Na pecuária, isolados de DEC podem colonizar o trato gastrointestinal de animais e se disseminar diretamente ou indiretamente para os seres humanos e, conseqüentemente, causar doenças e até surtos. As doenças diarreicas são consideradas um problema de saúde pública e afetam principalmente os países em desenvolvimento, ocorrendo altas taxas de morbidade e de mortalidade principalmente em crianças. Nesse sentido, as doenças diarreicas são responsáveis por altos custos relacionados a saúde que aumentam ainda mais quando associados a AMR (FARTHING et al., 2013; GOMES et al., 2016).

Dentre as linhagens de *E. coli*, os grupos filogenéticos A, B1 e C são considerados comensais, enquanto que os grupos filogenéticos B2, D, E e F são classificados como potencialmente patogênicos (CLERMONT et al., 2015). No entanto, linhagens de *E. coli* A-CC10 e B1-CC155 já foram descritas causando infecções em todo o mundo (SCHAUFLENER et al., 2019; AWORH et al., 2021) e também foram recuperadas das amostras ambientais utilizadas neste estudo. Curiosamente, as linhagens F-ST117 e B1-ST906 foram obtidas de amostras de solo com cultivo de jaboticaba e já foram reportadas como contaminantes em retalhos de carnes e associadas com infecções do trato urinário nos EUA (YAMAJI et al., 2018). Além disso, a linhagem F-ST117, atualmente classificada como G-ST117, é um patógeno humano que emerge globalmente e uma das principais causas de infecções

extraintestinais em aves (MANGES et al., 2015; CLERMONT et al., 2019; ZHUGE et al., 2021).

Os clones de alto risco ST10, ST131, ST354, ST648 e ST744 ganharam predominância global através da disseminação da AMR, da alta patogenicidade e da rápida adaptação a diferentes fontes. Esses clones são classificados como pandêmicos, enquanto que os clones ST10 e ST648 são emergentes e com potencial zoonótico (NICOLAS-CHANOINE et al., 2014; SCHAUFLENER et al., 2019; FUGA et al., 2022). Esses clones já estão disseminados em seres humanos e em animais, destacando as linhagens A-ST10 e A-CC10 que são conhecidas como linhagens emergentes de ExPEC de origem alimentar e responsáveis pela disseminação do gene *mcr-1* (MATAMOROS et al., 2017; GARCÍA-MENIÑO et al., 2018). O clone ST648 (linhagens D-ST648 e F-ST648) é classificado como altamente virulento e intimamente associado ao gene *bla_{CTX-M-15}*, como também detectado neste estudo (EWERS et al., 2014; SCHAUFLENER et al., 2019). Além disso, os clones de alto risco ST10, ST131 e ST648 foram recentemente associados a transmissão zooantroponótica (SELLERA & LINCOPAN, 2019).

A linhagem B2-ST131 é reconhecida atualmente como a principal linhagem de *E. coli* responsável pela disseminação AMR, principalmente através do gene *bla_{CTX-M}* (KONDRATYEVA et al., 2020). As linhagens B2-ST131-H22 (clado B) e B2-ST131-H30 (clado C) foram detectadas neste estudo e apresentaram resistência para as fluorquinolonas e/ou polimixinas, mas não apresentaram o gene *bla_{CTX-M}*; entretanto, o isolado EW659 (clado B) apresentou o gene *mcr-1.26*. O clado C é o mais prevalente e onde a maioria dos estudos se concentram, sendo uma das principais causas de infecções extraintestinais em seres humanos (MATSUMURA et al., 2015; MAMANI et al., 2019), enquanto que o clado B é predominante em animais e pode ser transmitido zoonoticamente, apresentando um desafio a saúde pública (LIU et al., 2018; ROER et al., 2019; SAIDENBERG et al., 2020).

Os clones de alto risco já foram reportados na interface humana, animal e ambiental em todo mundo, com destaque nos relatos de infecções em seres humanos com uma prevalência de resistência às fluorquinolonas (HU et al., 2013; FUKUSHIMA et al., 2021). Neste estudo, os clones de alto risco foram identificados principalmente em amostras de água, reforçando a disseminação ambiental dessas linhagens potencialmente patogênicas e dos ARGs, evidenciando os genes *bla_{CTX-M-15}* e *mcr-1*. No meio ambiente, os clones de alto risco carregando genes codificadores de ESBL foram identificados principalmente em amostras de águas residuais e de águas doce em diversos países (COLOMER-LLUCH et al., 2013; HU et

al., 2013; GOMI et al., 2017). No Brasil, além dos relatos desses clones em seres humanos e animais (CAMPOS et al., 2018; DOS ANJOS et al., 2019; FERNANDES et al., 2020; SAIDENBERG et al., 2020), os clones ST10 e ST131 já foram identificados no estado de São Paulo em amostras de águas recreativas de praias e de uma amostra de solo cultivada com couve (FERNANDES et al., 2017; LOPES et al., 2021b).

Uma grande diversidade de ARGs foi detectada neste estudo, com destaque para os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY}, PMQR e *mcr-1*. Os genes codificadores de ESBL e pAmpC têm sido cada vez mais descritos em isolados de *E. coli* MDR obtidos de seres humanos, de animais e de alimentos. Esses genes estão comumente integrados aos plasmídeos IncF e IncII e podem também estar associados aos integrons de classe 1 e aos transposons complexos (GILLINGS et al., 2009; LAHLAOUI et al., 2015; SHAIKH et al., 2016; PIETSCH et al., 2018; ROZWANDOWICZ et al., 2018). Neste sentido, esses plasmídeos podem ainda abrigar outros ARGs, tais como *bla*_{TEM}, *aadA*, *tetA*, *sul1* e *floR*, ocasionando o fenótipo de MDR (AWOSILE & AGBAJE, 2021). Por outro lado, a integração cromossômica dos genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CMY} mediada pela *ISEcp1* também já foi descrita e corrobora com os resultados deste estudo (MINARINI et al., 2009; CASELLA et al., 2018; SINGH et al., 2018; FANG et al., 2020; GREVSKOTT et al., 2020). Curiosamente, o clone ST354 abrigando o gene *bla*_{CTX-M-14} no cromossomo e com o mesmo ambiente genético identificado neste estudo foi obtido de uma infecção da corrente sanguínea na China, sugerindo a transferência vertical do gene *bla*_{CTX-M-14} dentre este clone (ZHENG et al., 2021).

O gene *bla*_{CMY-2} é a pAmpC mais descrita e tem sido associada principalmente aos plasmídeos IncII-ST12 com ~ 100 kb identificados em isolados de *E. coli* de seres humanos e de aves (CASTELLANOS et al., 2017, 2019; ROER et al., 2019). Adicionalmente, este gene já foi mobilizado para diversos outros plasmídeos, como o IncC (BORTOLAIA et al., 2014; CHEN et al., 2019). No geral, a *ISEcp1* é identificada a montante do gene *bla*_{CMY-2} e também compõe o contexto genético mais prevalente (*ISEcp1-bla*_{CMY-2-blc-sugE-encR) em plasmídeos de resistência (PIETSCH et al., 2018). Curiosamente, no Brasil, existe apenas um relato de uma linhagem de *E. coli* (B1-ST453) MDR obtida de frango no estado do Paraná carregando concomitantemente os genes *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CMY-2/IncII-ST12} (CUNHA et al., 2017).}

No geral, as linhagens pertencentes aos clones de alto risco e outros clones disseminados dentre amostras clínicas têm sido descritas como responsáveis pela disseminação do gene *bla*_{CTX-M} (MÜLLER et al., 2016; SCHAUFLER et al., 2016; RODRIGUES et al., 2017). No entanto, neste estudo, os genes *bla*_{CTX-M} foram detectados

principalmente em STs incomuns, tais como ST1775, ST1848, ST2521 e ST8246, corroborando com ZHENG et al. (2017), que também reportaram STs incomuns carregando o gene *bla*_{CTX-M} em amostras ambientais. Por outro lado, os isolados de *E. coli* pertencentes aos CC10 e CC155 obtidos de seres humanos e de animais são comumente reportados carregando o gene *bla*_{CMY}, corroborando os nossos resultados (BÖRJESSON et al., 2016; PIETSCH et al., 2018). No Sudeste do Brasil, mesma região deste estudo, as linhagens A-ST744-H54 e B1-ST2522-H38 exibindo o fenótipo de MDR foram descritas em peixes selvagens e em ovinos (SELLERA et al., 2018; FURLAN et al., 2019), enquanto que neste estudo essas linhagens foram recuperadas de amostras de água.

A resistência às fluorquinolonas é mediada principalmente por mutações nas regiões QRDR e pelos genes PMQR, que na maioria das vezes conferem um baixo nível de resistência. As mutações nas QRDR e os genes PMQR identificados neste estudo também são frequentemente descritos em isolados de *E. coli* distribuídos mundialmente em diversas fontes (JACOBY et al., 2014; HOOPER & JACOBY, 2015; KOTB et al., 2019; SALAH et al., 2019). Diversas famílias de plasmídeos já foram descritas carregando os genes PMQR e os outros ARGs descritos neste estudo (CARATTOLI et al., 2013). Os genes *qnrS1* e *qnrB19* foram identificados em plasmídeos IncR e Col, respectivamente, os quais possuem um histórico de identificação principalmente em bactérias da família *Enterobacteriaceae* obtidas de seres humanos e de animais da cadeia produtora de alimentos (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2009; RUIZ et al., 2012; ROZWANDOWICZ et al., 2018; MONTE et al., 2019; TYSON et al., 2019).

A resistência às polimixinas ocorre principalmente por mutações nos sistemas de dois componentes PmrAB e PhoPQ e no regulador negativo MgrB. No entanto, após o relato do gene *mcr-1*, uma alta ocorrência de isolados de *E. coli* resistentes à colistina associados a presença do gene *mcr-1*, principalmente em seres humanos, animais e alimentos, está sendo descrita (LIU et al., 2016; EL-SAYED AHMED et al. 2020; LING et al., 2020). As mutações identificadas em PhoP (I44L), PmrA (S29G) e PmrB (H2R, D283G) já foram detectadas em isolados clínicos de *E. coli* suscetíveis e resistentes à colistina (LUO et al., 2017; SATO et al., 2018; WANG et al. al., 2020), enquanto que as mutações em MgrB (V8A), PhoP (D181G, G215A, L222S), PhoQ (P182S, E261D, A470P), PmrA (G144S) e PmrB (Y358N) já foram detectadas em isolados clínicos de *E. coli* resistentes à colistina ou foram previstas como deletérias (DELANNOY et al., 2017; LUO et al., 2017; ZAKARIA et al., 2021).

Diante disso, foi detectado uma diversidade de mutações nos alvos cromossômicos de resistência a colistina, sendo algumas delas amplamente relatadas na literatura (OLAITAN et al., 2014; GOGRY et al., 2021; BINSKER et al., 2022). Algumas dessas mutações foram preditas como deletérias, mas a grande maioria foi predita como neutra, o que pode estar relacionado com a distância filogenética dos isolados com a linhagem de referência. Além disso, outros mecanismos, denominados como secundários (EptAB, QseBC, LpxM) ou até mesmo outros ainda desconhecidos, podem estar associados a este fenótipo de resistência, necessitando assim, ampliar o conhecimento sobre as correlações genotípicas-fenotípicas e os mecanismos em diversas linhagens (SATO et al., 2018; EL-SAYED AHMED et al. 2020; BINSKER et al., 2022; CAMPOS et al., 2021; GOGRY et al., 2021). Curiosamente, não haviam relatos de mutações nos alvos cromossômicos de resistência às polimixinas em isolados de *E. coli* obtidos de amostras de solo, os quais foram reportados por FURLAN & STEHLING (2021).

Neste estudo, o gene *mcr-1* foi detectado apenas em isolados de *E. coli* MDR obtidos de amostras de água. Até o presente momento, existem apenas três relatos de isolados de *E. coli* positivos para o gene *mcr-1* em amostras de solo da Argélia, do Brasil e da China (ZHENG et al., 2017; TOUATI et al., 2020; LOPES et al., 2021b), enquanto que em amostras de água este gene já está mais difundido, exaltando a presença em ambientes aquáticos utilizados para fins recreativos de contato primário (FERNANDES et al., 2017; CHERAK et al., 2021). No geral, o gene *mcr-1* já está disseminado principalmente em isolados de *E. coli* obtidos de seres humanos e de animais da cadeia produtora de alimentos (FERNANDES et al., 2016a; HUSSEIN et al., 2021; LENTZ et al., 2021). Dentre os plasmídeos envolvidos na disseminação do gene *mcr-1*, os IncX4, IncI2 e IncHI2 são os mais prevalentes (NANG et al., 2019).

Os plasmídeos IncX4 possuem uma estrutura genética conservada de ~ 30 kb com genes essenciais e responsáveis pela replicação, partição, transferência, manutenção e estabilidade. Com isso, esses plasmídeos se destacam na disseminação global do gene *mcr-1*, sendo classificados como epidêmicos (SUN et al., 2015, 2017; Yi et al., 2020). Historicamente, a IS*Ap11* esteve envolvida na transposição do cassete *mcr-1*, mas nos plasmídeos IncX4, essa IS foi perdida. Assim, os plasmídeos IncX4 preservam a sequência *pap2* e uma proteína hipotética ao redor do gene *mcr-1*, bem como a presença das IRR2 e DR, nos quais já foram descritas em outros plasmídeos, por exemplo em IncHI1, IncHI2, IncF-

type, e em cromossomos, sugerindo que eles podem ter um ancestral comum (SUN et al., 2017; LENTZ et al., 2021).

Na América do Sul, a carne de frango foi descrita como um reservatório emergente de *mcr-1/IncX4* em isolados de *E. coli* resistentes à colistina (MONTE et al., 2017). No Brasil, o *mcr-1/IncX4* já foi reportado em diversas linhagens de *E. coli* de diferentes fontes e estados (FERNANDES et al., 2016b; CONCEIÇÃO-NETO et al., 2017; DALMOLIN et al., 2017; PALMEIRA et al., 2018; ZAMPARETTE et al., 2020). No estado de São Paulo, linhagens de *E. coli* pertencentes aos CC10, CC31, CC73, CC131, CC156, CC552 e outras STs *singletons* foram reportadas carreando o *mcr-1/IncX4* em infecções em seres humanos e em pinguim, em carnes de frango e em amostras de água do mar (SELLERA et al., 2016; FERNANDES et al., 2017; ROSSI et al., 2017; MONTE et al., 2017a, 2017b; OLIVEIRA et al., 2018; PERDIGÃO NETO et al., 2019; GIRARDELLO et al., 2021; PAIVA et al., 2021). Dentre os clones encontrados no estado de São Paulo e pertencentes aos CCs descritos acima, se destacam as ST10, ST131 e ST744, os mesmos detectados neste estudo. Na macrorregião de Ribeirão Preto, existem apenas dois relatos da presença do gene *mcr-1* em isolados bacterianos, sendo os dois em *E. coli* de amostras ambientais e um deles originado deste estudo (FURLAN et al., 2021a; LOPES et al., 2021b). Portanto, esses resultados destacam a disseminação de clones de alto risco carreando o gene *mcr-1* em amostras de água e reforçam o importante papel dos plasmídeos IncX4 na disseminação deste gene.

Dentre os alelos do gene *mcr-1* identificados neste estudo, o *mcr-1.1* é o mais prevalente, enquanto que o *mcr-1.26* foi descrito apenas uma vez em uma linhagem *E. coli* B1-ST155 na Alemanha (PARTRIDGE et al., 2018a; NEUMANN et al., 2020). Devido a caracterização genômica detalhada dos isolados positivos para o gene *mcr-1*, foi possível identificar o gene *mcr-1.26* pela primeira vez no meio ambiente. A prevalência desse gene estava subestimada devido a potenciais limitações no reconhecimento das diferenças de nucleotídeos e aminoácidos entre *mcr-1.1* e *mcr-1.26*. A partir dessas análises, também foi possível identificar que esse gene estava circulando bem antes da primeira descrição em 2020 e está distribuído em seres humanos, em animais e em alimentos de diferentes países. Além disso, assinaturas genéticas específicas podem ser usadas para rastrear diferentes contextos genéticos observados em determinadas regiões geográficas.

A ocorrência de linhagens de *E. coli* MDR e potencialmente patogênicas carreando plasmídeos de resistência em amostras ambientais pode levar à contaminação principalmente dos ambientes circundantes e de verduras e de legumes que são geralmente consumidos crus

(REID et al., 2020; LOPES et al., 2021a). Neste sentido, essas linhagens podem colonizar os seres humanos e os animais, o que pode contribuir para a HGT para a microbiota intestinal. Adicionalmente, essas linhagens podem causar infecções adquiridas ou endógenas, aumentando a exposição a AMR (REID et al., 2020; MAEUSLI et al., 2020). Portanto, a presença dessas linhagens em amostras ambientais representa uma potencial ameaça à saúde humana e animal.

Finalmente, as linhagens, genes e plasmídeos identificados nas amostras ambientais deste estudo e que são comumente reportados em seres humanos e em animais da cadeia de produção de alimentos reforça a circulação dos mesmos na interface humana, animal e ambiental. No entanto, algumas dessas linhagens nunca foram descritas em amostras ambientais do mundo todo, em amostras em geral no Brasil e nem exibindo um fenótipo de MDR, reforçando também que o meio ambiente apresenta uma diversidade genética dentro a espécie de *E. coli* e que ele é um reservatório de bactérias MDR e de seus ARGs. Portanto, mais estudos são necessários para estabelecer as vias de transmissão entre os seres humanos, os animais e o meio ambiente para, assim, apoiar adequadamente as medidas que podem mitigar principalmente a propagação da AMR, reforçando a abordagem da Saúde Única.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Linhagens de *E. coli* MDR e potencialmente patogênicas estão circulando no meio ambiente (solo e água).
- ARGs clinicamente relevantes foram detectados em linhagens de *E. coli* MDR obtidas principalmente de ecossistemas aquáticos.
- Resistência às cefalosporinas de espectro estendido foi mediada especialmente pelo gene *bla*_{CTX-M} localizado no cromossomo.
- Resistência às fluorquinolonas e à colistina foram mediadas por ARGs localizados em plasmídeos ou por mutações nos seus determinantes de resistência.
- Diversidade de STs com destaque para os clones de alto risco ST10, ST131, ST354, ST648 e ST744.
- Persistência de STs e CCs ao longo de ecossistemas aquáticos.
- A identificação do gene *mcr-I* em plasmídeos IncX4 foi similar aos achados de outros plasmídeos de origens humana, animal e ambiental do mundo todo e do Brasil.
- Reconhecimento da subestimação do alelo *mcr-I.26* em plasmídeos IncX4 e a descrição do primeiro relato no mundo deste gene em amostras ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 677–678, 1988.

ADEOLU, M.; ALNAJAR, S.; NAUSHAD, S.; GUPTA, R. S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 2016.

AHMED, A. M.; SHIMAMOTO, T. Emergence of a cefepime- and ceftazidime-resistant *Citrobacter freundii* clinical isolate harbouring a novel chromosomally encoded AmpC beta-lactamase, CMY-37. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 3, p. 256–261, 2008.

AIJUKA, M.; SANTIAGO, A. E.; GIRÓN, J. A.; NATARO, J. P.; BUYS, E. M. Enteroaggregative *Escherichia coli* is the predominant diarrheagenic *E. coli* pathotype among irrigation water and food sources in South Africa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 278, p. 44–51, 2018.

AL-KANDARI, F.; WOODWARD, M. J. Genotypic and phenotypic diversity differences of presumptive commensal and avian pathogenic *E. coli*. **British Poultry Science**, v. 60, n. 1, p. 79–86, 2019.

ALLEN, H. K.; DONATO, J.; WANG, H. H.; CLOUD-HANSEN, K. A.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 251–259, 2010.

AMBLER R. P. The structure of Beta-lactamases. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 1980.

AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, p. 134, 2010.

ANDRADE, F. F.; SILVA, D.; RODRIGUES, A.; PINA-VAZ, C. Colistin update on its Mechanism of action and resistance, present and future challenges. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1716, 2020.

ANJUM, M. F.; SCHMITT, H.; BÖRJESSON, S.; DONNER, E.; STEHLING, E. G.; BOERLIN, P.; TOPP, E.; JARDINE, J.; XUEWEN, L.; LI, B.; DOLEJSKA, M.; MADEC, J-Y.; DAGOT, C.; GUENTHER, S.; WALSH, F.; VILLA, L.; VELDMAN, K.; SUNDE, M.; KRZEMINSKI, P.; WASYL, D.; POPOWSKA, M.; JÄRHULT, J.; ÖRN, S.; MAHJOUR, O.; MANSOUR, W.; THÁI, D. N.; ELVING, J.; PEDERSEN, K.; BERENDONK, T. U. The potential of using *E. coli* as an indicator for the surveillance of antimicrobial resistance (AMR) in the environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 64, p. 152-158, 2021.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução-RDC nº 44, de 26 de outubro de 2010**. ANVISA. 2010. Acessado em 23 de fevereiro de 2022. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0044_26_10_2010.html.

ANYANWU, M. U.; JAJA, I. F.; NWOBI, O. C. Occurrence and characteristics of mobile colistin resistance (*mcr*) gene-containing isolates from the Environment: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 3, p. 1028, 2020.

ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiology Letters**, v. 267, n. 2, p. 145–150, 2007.

ARREDONDO-ALONSO, S.; ROGERS, M.; BRAAT, J. C.; VERSCHUUREN, T. D.; TOP, J.; CORANDER, J.; WILLEMS, R.; SCHÜRCH, A. C. mlplasmids: a user-friendly tool to predict plasmid- and chromosome-derived sequences for single species. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 11, p. e000224, 2018.

ASLAM, B.; KHURSHID, M.; ARSHAD, M. I.; MUZAMMIL, S.; RASOOL, M.; YASMEEN, N.; SHAH, T.; CHAUDHRY, T. H.; RASOOL, M. H.; SHAHID, A.; XUESHAN, X.; BALOCH, Z. Antibiotic resistance: One Health One World Outlook. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 771510, 2021.

ASLAM, B.; WANG, W.; ARSHAD, M. I.; KHURSHID, M.; MUZAMMIL, S.; RASOOL, M. H.; NISAR, M. A.; ALVI, R. F.; ASLAM, M. A.; QAMAR, M. U.; SALAMAT, M.; BALOCH, Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1645–1658, 2018.

ASM – AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. **FAQ: *E. coli*: Good, Bad, & Deadly: “What is true for *E. coli* is true for the elephant”**. Washington (DC): ASM. 2011. Acessado em 24 de março de 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562895/>.

ATLAS, R. M. One Health: its origins and future. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 365, p. 1–13, 2013.

AWORH, M. K.; KWAGA, J. K. P.; HENDRIKSEN, R. S.; OKOLOCHA, E. C.; THAKUR, S. Genetic relatedness of multidrug resistant *Escherichia coli* isolated from humans, chickens and poultry environments. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 10, p. 58, 2021.

AWOSILE, B. B.; AGBAJE, M. Genetic environments of plasmid-mediated *bla*_{CTXM-15} Beta-lactamase gene in *Enterobacteriaceae* from Africa. **Microbiology Research**, v. 12, n. 2, p. 383–394, 2021.

AZIZ, R. K.; BARTELS, D.; BEST, A. A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G. J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A. L.; OVERBEEK, R. A.; MCNEIL, L. K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G. D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A.; ZAGNITKO, O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, p. 75, 2008.

BÄUMLER, A. J.; HEFFRON, F. Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 8, p. 2087–2097, 1995.

BABAKHANI, S.; OLOOMI, M. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 905–917, 2018.

BECKER, B.; COOPER, M. A. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 1, p. 105–115, 2013.

BEGHAIN, J.; BRIDIER-NAHMIAS, A.; LE NAGARD, H.; DENAMUR, E.; CLERMONT, O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 7, p. e000192, 2018.

BEN SAID, L.; JOUINI, A.; KLIBI, N.; DZIRI, R.; ALONSO, C. A.; BOUDABOUS, A.; BEN SLAMA, K.; TORRES, C. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 203, p. 86–92, 2015.

BEN SALLEM, R.; BEN SLAMA, K.; ROJO-BEZARES, B.; PORRES-OSANTE, N.; JOUINI, A.; KLIBI, N.; BOUDABOUS, A.; SÁENZ, Y.; TORRES, C. IncI1 plasmids carrying *bla*_(CTX-M-1) or *bla*_(CMY-2) genes in *Escherichia coli* from healthy humans and animals in Tunisia. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 5, p. 495–500, 2014.

BERENDONK, T. U.; MANAIA, C. M.; MERLIN, C.; FATTA-KASSINOS, D.; CYTRYN, E.; WALSH, F.; BÜRGMANN, H.; SØRUM, H.; NORSTRÖM, M.; PONS, M. N.; KREUZINGER, N.; HUOVINEN, P.; STEFANI, S.; SCHWARTZ, T.; KISAND, V.; BAQUERO, F.; MARTINEZ, J. L. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 310–317, 2015.

BERGLUND, F.; MARATHE, N. P.; ÖSTERLUND, T.; BENGTSSON-PALME, J.; KOTSAKIS, S.; FLACH, C. F.; LARSSON, D.; KRISTIANSSON, E. Identification of 76 novel B1 metallo- β -lactamases through large-scale screening of genomic and metagenomic data. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 134, 2017.

BHULLAR, K.; WAGLECHNER, N.; PAWLOWSKI, A.; KOTEVA, K.; BANKS, E. D.; JOHNSTON, M. D.; BARTON, H. A.; WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34953, 2012.

BIELASZEWSKA, M.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; KÖCK, R.; FRUTH, A.; BAUWENS, A.; PETERS, G.; KARCH, H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain

associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 671–676, 2011.

BINSKER, U.; KÄSBOHRER, A.; HAMMERL, J. A. Global colistin use: a review of the emergence of resistant Enterobacterales and the impact on their genetic basis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, n. 1, p. fuab049, 2022.

BISCHOFF, K. M.; WHITE, D. G.; HUME, M. E.; POOLE, T. L.; NISBET, D. J. The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, n. 1, p. 285–291, 2005.

BLONDEAU J. M. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. **Survey of Ophthalmology**, v. 49 Suppl 2, p. S73–S78, 2004.

BÖRJESSON, S.; NY, S.; EGERVÄRN, M.; BERGSTRÖM, J.; ROSENGREN, Å.; ENGLUND, S.; LÖFMARK, S.; BYFORS, S. Limited dissemination of extended-spectrum β -lactamase- and plasmid-encoded ampC-Producing *Escherichia coli* from food and farm animals, Sweden. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 634–640, 2016.

BOROWIAK, M.; FISCHER, J.; HAMMERL, J. A.; HENDRIKSEN, R. S.; SZABO, I.; MALORNY, B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 12, p. 3317–3324, 2017.

BOROWIAK, M.; BAUMANN, B.; FISCHER, J.; THOMAS, K.; DENEKE, C.; HAMMERL, J. A.; SZABO, I.; MALORNY, B. Development of a Novel *mcr-6* to *mcr-9* multiplex PCR and assessment of *mcr-1* to *mcr-9* occurrence in colistin-resistant *Salmonella enterica* isolates from environment, feed, animals and food (2011-2018) in Germany. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 80, 2020.

BORTOLAIA, V.; KAAS, R. S.; RUPPE, E.; ROBERTS, M. C.; SCHWARZ, S.; CATTOIR, V.; PHILIPPON, A.; ALLESOE, R. L.; REBELO, A. R.; FLORENSA, A. F.; FAGELHAUER, L.; CHAKRABORTY, T.; NEUMANN, B.; WERNER, G.; BENDER, J. K.; STINGL, K.; NGUYEN, M.; COPPENS, J.; XAVIER, B. B.; MALHOTRA-KUMAR, S.; WESTH, H.; PINHOLT, M.; ANJUM, M. F.; DUGGETT, N. A.; KEMPF, I.; NYKÄSENOJA, S.; OLKKOLA, S.; WIECZOREK, K.; AMARO, A.; CLEMENTE, L.; MOSSONG, J.; LOSCH, S.; RAGIMBEAU, C.; LUND, O.; AARESTRUP, F. M. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 12, p. 3491–3500, 2020.

BRAZ, V. S.; MELCHIOR, K.; MOREIRA, C. G. *Escherichia coli* as a multifaceted pathogenic and versatile bacterium. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. 548492, 2020.

BRETTIN, T.; DAVIS, J. J.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; GERDES, S.; OLSEN, G. J.; OLSON, R.; OVERBEEK, R.; PARRELLO, B.; PUSCH, G. D.; SHUKLA, M.; THOMASON, J. A.; 3RD, STEVENS, R.; VONSTEIN, V.; WATTAM, A. R.; XIA, F. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building

custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. **Scientific Reports**, v. 5, n. 8365, 2015.

BUSH, K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. **Critical Care**, v. 14, n. 3, p. 224, 2010.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 8, p. a025247, 2016.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. e00047-19, 2020.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of Beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.

CAMPOS, A.; ANDRADE, N. L.; FERDOUS, M.; CHLEBOWICZ, M. A.; SANTOS, C. C.; CORREAL, J.; LO TEN FOE, J. R.; ROSA, A.; DAMASCO, P. V.; FRIEDRICH, A. W.; ROSSEN, J. Comprehensive molecular characterization of *Escherichia coli* isolates from urine samples of hospitalized patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 243, 2018.

CAMPOS, P. A.; FUGA, B.; FERREIRA, M. L.; BRÍGIDO, R. T. E. S.; LINCOPAN, N.; GONTIJO-FILHO, P. P.; RIBAS, R. M. Genetic alterations associated with polymyxin B resistance in nosocomial KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 27, n. 12, p. 1677-1684, 2021.

CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 110, 2012.

CASELLA, T.; HAENNI, M.; MADELA, N. K.; ANDRADE, L. K.; PRADELA, L. K.; ANDRADE, L. N.; DARINI, A.; MADEC, J. Y.; NOGUEIRA, M. Extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from chickens and chicken meat in Brazil is associated with rare and complex resistance plasmids and pandemic ST lineages. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 12, p. 3293–3297, 2018.

CASTANHEIRA, M.; SIMNER, P. J.; BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 3, n. 3, p. dlab092, 2021.

CASTELLANOS, L. R.; DONADO-GODOY, P.; LEÓN, M.; CLAVIJO, V.; AREVALO, A.; BERNAL, J. F.; TIMMERMAN, A. J.; MEVIUS, D. J.; WAGENAAR, J. A.; HORDIJK, J. High heterogeneity of *Escherichia coli* sequence types harbouring ESBL/AmpC genes on IncII plasmids in the Colombian poultry chain. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0170777, 2017.

CASTELLANOS, L. R.; VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L.; DONADO-GODOY, P.; MEVIUS, D. J.; WAGENAAR, J. A.; HORDIJK, J.; ZOMER, A. L. Phylogenomic

investigation of IncII-1y plasmids harboring *bla*_{CMY-2} and *bla*_{SHV-12} in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in multiple countries. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 7, p. e02546-18, 2019.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 298–304, 2013.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227–2238, 2009.

CARATTOLI, A.; BERTINI, A.; VILLA, L.; FALBO, V.; HOPKINS, K. L.; THRELFALL, E. J. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, n. 3, p. 219–228, 2005.

CARATTOLI, A.; VILLA, L.; FEUDI, C.; CURCIO, L.; ORSINI, S.; LUPPI, A.; PEZZOTTI, G.; MAGISTRALI, C. F. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Euro Surveillance**, v. 22, n. 31, p. 30589, 2017.

CARATTOLI, A.; ZANKARI, E.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; VOLDBY LARSEN, M.; LUND, O.; VILLA, L.; MØLLER AARESTRUP, F.; HASMAN, H. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3895–3903, 2014.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; ROTIMI, V.; SOUSSY, C. J.; NORDMANN, P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 394–397, 2007.

CDC - CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic Resistance Threats in United States**, 2019. Acessado em 21 de março de 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>.

CERNA, J. F.; NATARO, J. P.; ESTRADA-GARCIA, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2138–2140, 2003.

CERDEIRA, L. T.; CARNEIRO, A. R.; RAMOS, R. T.; DE ALMEIDA, S. S.; D'AFONSECA, V.; SCHNEIDER, M. P.; BAUMBACH, J.; TAUCH, A.; MCCULLOCH, J. A.; AZEVEDO, V. A.; SILVA, A. Rapid hybrid de novo assembly of a microbial genome using only short reads: *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19 as a case study. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 2, p. 218–223, 2011.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Norma Técnica L5.230. Escherichia coli – Determination in water samples by membrane filtration technique: Test Method**. CETESB. 2012. Acessado em 01 de fevereiro de 2022. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/normas-tecnicas-cetesb/normas-tecnicas-vigentes>.

CHEN, C. Y.; HSIEH, P. H.; CHANG, C. Y.; YANG, S. T.; CHEN, Y. H.; CHANG, K.; LU, P. L. Molecular epidemiology of the emerging ceftriaxone resistant non-typhoidal *Salmonella*

in southern Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, v. 52, n. 2, p. 289–296, 2019.

CHERAK, Z.; LOUCIF, L.; MOUSSI, A.; ROLAIN, J. M. Epidemiology of mobile colistin resistance (*mcr*) genes in aquatic environments. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 27, p. 51–62, 2021.

CHEN, X.; ZHANG, W.; PAN, W.; YIN, J.; PAN, Z.; GAO, S.; JIAO, X. Prevalence of *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3423–3427, 2012.

CHOI, Y.; CHAN, A. P. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. **Bioinformatics**, v. 31, n. 16, p. 2745–2747, 2015.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.

CIMA, G. WHO warns of 'post-antibiotic era'. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 244, n. 12, p. 1356–1357, 2014.

CLARK, N. C.; OLSVIK, O.; SWENSON, J. M.; SPIEGEL, C. A.; TENOVER, F. C. Detection of a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 1, p. 157–160, 1999.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–4558, 2000.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Characterization of an anonymous molecular marker strongly linked to *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1770–1772, 2004.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.

CLERMONT, O.; DIXIT, OVA.; VANGCHHIA, B.; CONDAMINE, B.; DION, S.; BRIDIER-NAHMIA, A.; DENAMUR, E.; GORDON D. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 3107–3117, 2019.

CLERMONT, O.; GORDON, D.; DENAMUR, E. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. **Microbiology**, v. 161, n. 5, p. 980–988, 2015.

COHEN STUART, J.; VAN DEN MUNCKHOF, T.; VOETS, G.; SCHARRINGA, J.; FLUIT, A.; HALL, M. L. Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, n. 3, p. 212–214, 2012.

COLOMER-LLUCH, M.; MORA, A.; LÓPEZ, C.; MAMANI, R.; DAHBI, G.; MARZOA, J.; HERRERA, A.; VISO, S.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; ALONSO, M. P.; JOFRE, J.; MUNIESA, M.; BLANCO, J. Detection of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates belonging to clonal groups O25b:H4-B2-ST131 and O25b:H4-D-ST69 in raw sewage and river water in Barcelona, Spain. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 758–765, 2013.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução 357, de 17 de Março de 2005**. CONAMA. 2005. Acessado em 01 de fevereiro de 2022. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>.

CONCEIÇÃO-NETO, O. C.; AIRES, C. A. M.; PEREIRA, N. F.; DA SILVA, L. H. J.; PICÃO, R. C.; SIQUEIRA, B. N.; ALBANO, R. M.; ASENSI, M. D.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 2, p. 282-284, 2017.

CORDEIRO-MOURA, J. R.; KRAYCHETE, G. B.; LONGO, L.; CORRÊA, L. L.; DA SILVA, N.; CAMPANA, E. H.; OLIVEIRA, C.; PICÃO, R. C. Description and comparative genomic analysis of a *mcr-1*-carrying *Escherichia coli* ST683/CC155 recovered from touristic coastal water in Northeastern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 97, p. 105196, 2022.

CUNHA, M. P.; LINCOPAN, N.; CERDEIRA, L.; ESPOSITO, F.; DROPA, M.; FRANCO, L. S.; MORENO, A. M.; KNÖBL, T. Coexistence of CTX-M-2, CTX-M-55, CMY-2, FosA3, and QnrB19 in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from poultry in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. e02474-16, 2017.

CYOIA, P. S.; KOGA, V. L.; NISHIO, E. K.; HOULE, S.; DOZOIS, C. M.; DE BRITO, K.; DE BRITO, B. G.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. Distribution of ExPEC virulence factors, *bla*_{CTX-M}, *fosA3*, and *mcr-1* in *Escherichia coli* isolated from commercialized chicken carcasses. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 3254, 2019.

D'ANDREA, M. M.; ARENA, F.; PALLECCHI, L.; ROSSOLINI, G. M. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 305–317, 2013.

D'COSTA, V. M.; KING, C. E.; KALAN, L.; MORAR, M.; SUNG, W. W.; SCHWARZ, C.; FROESE, D.; ZAZULA, G.; CALMELS, F.; DEBRUYNE, R.; GOLDING, G. B.; POINAR, H. N.; WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 457–461, 2011.

DALE, A. P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. **The Journal of Infection**, v. 71, n. 6, p. 615–626, 2015.

DALLENNE, C.; DA COSTA, A.; DECREÉ, D.; FAVIER, C.; ARLET, G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important Beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490–495, 2010.

DALMOLIN, T. V.; CASTRO, L.; MAYER, F. Q.; ZAVASCKI, A. P.; MARTINS, A. F.; LIMA-MORALES, D.; BARTH, A. L. Co-occurrence of *mcr-1* and *bla_{KPC-2}* in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 8, p. 2404-2406, 2017.

DALMOLIN, T. V.; DE LIMA-MORALES, D.; BARTH, A. L. Plasmid-mediated colistin resistance: What do we know?. **Journal of Infectiology**, v. 1, n. 2, p. 16–22, 2018.

DARLING, A. C.; MAU, B.; BLATTNER, F. R.; PERNA, N. T. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. **Genome Research**, v. 14, n. 7, p. 1394–1403, 2004.

DATTA, N.; HEDGES, R. W. Compatibility groups among ϕ - R factors. **Nature**, v. 234, n. 5326, p. 222–223, 1971.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.

DELANNOY, S.; LE DEVENDEC, L.; JOUY, E.; FACH, P.; DRIDER, D.; KEMPF, I. Characterization of colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in France. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2278, 2017.

DIAS, E.; OLIVEIRA, M.; MANAGEIRO, V.; VASCONCELOS, V.; CANIÇA, M. Deciphering the role of cyanobacteria in water resistome: Hypothesis justifying the antibiotic resistance (phenotype and genotype) in *Planktothrix* genus. **The Science of The Total Environment**, v. 652, p. 447–454, 2019.

DIONISIO, F.; CONCEIÇÃO, I. C.; MARQUES, A. C.; FERNANDES, L.; GORDO, I. The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. **Biology Letters**, v. 1, n. 2, p. 250–252, 2005.

DOI, Y. Treatment options for carbapenem-resistant Gram-negative bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. Suppl 7, p. S565–S575, 2019.

DOMÍNGUEZ, D. C.; CHACÓN, L. M.; WALLACE, D. Anthropogenic activities and the problem of antibiotic resistance in Latin America: A water issue. **Water**, v. 13, n. 19, p. 2693, 2021.

DOS ANJOS, C.; SABINO, C. P.; BUERIS, V.; FERNANDES, M. R.; POGLIANI, F. C.; LINCOPAN, N.; SELLERA, F. P. Antimicrobial blue light inactivation of international clones of multidrug-resistant *Escherichia coli* ST10, ST131 and ST648. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 27, p. 51–53, 2019.

DRIEUX, L.; BROSSIER, F.; SOUGAKOFF, W.; JARLIER, V. Phenotypic detection of extended-spectrum Beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. Suppl 1, p. 90–103, 2008.

DURÃO, P.; BALBONTÍN, R.; GORDO, I. Evolutionary mechanisms shaping the maintenance of antibiotic resistance. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 677–691, 2018.

DUTTA, S.; GUIN, S.; GHOSH, S.; PAZHANI, G. P.; RAJENDRAN, K.; BHATTACHARYA, M. K.; TAKEDA, Y.; NAIR, G. B.; RAMAMURTHY, T. Trends in the prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* among hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56068, 2013.

EIAMPHUNGORN, W.; SCHADUANGRAT, N.; MALIK, A. A.; NANTASENAMAT, C. Tackling the antibiotic resistance caused by class A β -lactamases through the use of β -lactamase inhibitory protein. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 2222, 2018.

EL-SAYED AHMED, M.; ZHONG, L. L.; SHEN, C.; YANG, Y.; DOI, Y.; TIAN, G. B. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 868–885, 2020.

ELTAI, N. O.; AL THANI, A. A.; AL HADIDI, S. H.; AL ANSARI, K.; YASSINE, H. M. Antibiotic resistance and virulence patterns of pathogenic *Escherichia coli* strains associated with acute gastroenteritis among children in Qatar. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 54, 2020.

ESCHERICH, T. Die darmbakterien des neugeborenen und saglings. **Fortschritte der Medizin**, v. 3, p. 515–522, 1885.

ESCUADERO, J. A.; LOOT, C.; NIVINA, A.; MAZEL, D. The integron: adaptation on demand. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, p. MDNA3–2014, 2015.

EVANS, B. A. & AMYES, S. G. OXA β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 241–263, 2014.

EWERS, C.; BETHE, A.; STAMM, I.; GROBBEL, M.; KOPP, P. A.; GUERRA, B.; STUBBE, M.; DOI, Y.; ZONG, Z.; KOLA, A.; SCHAUFLE, K.; SEMMLER, T.; FRUTH, A.; WIELER, L. H.; GUENTHER, S. CTX-M-15-D-ST648 *Escherichia coli* from companion animals and horses: another pandemic clone combining multiresistance and extraintestinal virulence? **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 5, p. 1224–1230, 2014.

FÀBREGA, A.; MADURGA, S.; GIRALT, E.; VILA, J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 40–61, 2009.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 9, p. 1333–1341, 2005.

FALAGAS, M. E.; RAFAILIDIS, P. I.; MATTHAIIOU, D. K. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 4-5, v. 132–138, 2010.

FALAGAS, M. E.; VOULOUMANOU, E. K.; SAMONIS, G.; VARDAKAS, K. Z. Fosfomycin. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 321–347, 2016.

FAN, C.; WU, Y. H.; DECKER, C. M.; ROHANI, R.; GESELL SALAZAR, M.; YE, H.; CUI, Z.; SCHMIDT, F.; HUANG, W. E. Defensive function of transposable elements in bacteria. **ACS Synthetic Biology**, v. 8, n. 9, p. 2141–2151, 2019.

FANG, L. X.; LI, X. P.; LI, L.; CHEN, M. Y.; WU, C. Y.; LI, L. L.; LIAO, X. P.; LIU, Y. H.; SUN, J. ISEcp1-mediated transposition of chromosome-borne *bla*_{CMY-2} into an endogenous ColE1-like plasmid in *Escherichia coli*. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 995–1005, 2018.

FAO/OIE/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Tripartite's Commitment: Providing multi-sectoral, collaborative leadership in addressing health challenges**. FAO/OIE/WHO. 2017. Acessado em 23 de março de 2022. Disponível em: https://www.who.int/zoonoses/tripartite_oct2017.pdf.

FARTHING, M.; SALAM, M. A.; LINDBERG, G.; DITE, P.; KHALIF, I.; SALAZAR-LINDO, E.; RAMAKRISHNA, B. S.; GOH, K. L.; THOMSON, A.; KHAN, A. G.; KRABSHUIS, J.; LEMAIR, A.; WGO. Acute diarrhea in adults and children: a global perspective. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 47, n. 1, p. 12–20, 2013.

FERNANDES, M. R.; CERDEIRA, L.; SILVA, M. M.; SELLERA, F. P.; MUÑOZ, M.; JUNIOR, F. G.; AZEVEDO, S. S.; POWER, P.; GUTKIND, G.; LINCOPAN, N. Novel *mcr-5.3* variant in a CTX-M-8-producing *Escherichia coli* ST711 isolated from an infected horse. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 12, p. 3520–3522, 2018.

FERNANDES, M. R.; SELLERA, F. P.; CUNHA, M.; LOPES, R.; CERDEIRA, L.; LINCOPAN, N. Emergence of CTX-M-27-producing *Escherichia coli* of ST131 and clade C1-M27 in an impacted ecosystem with international maritime traffic in South America. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 6, p. 1647–1649, 2020.

FERNANDES, M. R.; MOURA, Q.; SARTORI, L.; SILVA, K. C.; CUNHA, M. P.; ESPOSITO, F.; LOPES, R.; OTUTUMI, L. K.; GONÇALVES, D. D.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; MONTE, D. F.; LANDGRAF, M.; FRANCISCO, G. R.; BUENO, M. F.; DE OLIVEIRA GARCIA, D.; KNÖBL, T.; MORENO, A. M.; LINCOPAN, N. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. **Euro Surveillance**, v. 21, n. 17, p. 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214, 2016a.

FERNANDES, M. R.; MCCULLOCH, J. A.; VIANELLO, M. A.; MOURA, Q.; PÉREZ-CHAPARRO, P. J.; ESPOSITO, F.; SARTORI, L.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; LIRA, D. P.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* sequence type 101 isolate from a human infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6415–6417, 2016b.

FERNANDES, M. R.; SELLERA, F. P.; ESPOSITO, F.; SABINO, C. P.; CERDEIRA, L.; LINCOPAN, N. Colistin-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli* on public beaches, an infectious threat emerging in recreational waters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, p. e00234-17, 2017.

FERNÁNDEZ, M.; CONDE, S.; DE LA TORRE, J.; MOLINA-SANTIAGO, C.; RAMOS, J. L.; DUQUE, E. Mechanisms of resistance to chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1001–1009, 2012.

FIRMO, E. F.; BELTRÃO, E.; SILVA, F.; ALVES, L. C.; BRAYNER, F. A.; VERAS, D. L.; LOPES, A. Association of *bla*_{NDM-1} with *bla*_{KPC-2} and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 21, p. 255–261, 2020.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, n. 3, p. 226–236, 1929.

FORSBERG, K. J.; PATEL, S.; GIBSON, M. K.; LAUBER, C. L.; KNIGHT, R.; FIERER, N.; DANTAS, G. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. **Nature**, v. 509, n. 7502, p. 612–616, 2014.

FROST, L.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A.; TOUSSAINT, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 3, p. 722–732, 2005.

FUGA, B.; SELLERA, F. P.; CERDEIRA, L.; ESPOSITO, F.; CARDOSO, B.; FONTANA, H.; MOURA, Q.; CARDENAS-ARIAS, A.; SANO E.; RIBAS, R. M.; CARVALHO, A. C.; TOGNIM, M. C. B.; MORAIS, M. M. C.; QUARESMA, A. J. P. G.; SANTANA, A. P.; REIS, J. N.; PILONETTO, M.; VESPERO, E. C.; BONELLI, R. R.; CERQUEIRA, A. M. F.; SINCERO, T. C. M.; LINCOPAN, N. WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health challenge for a post-pandemic scenario: Genomic surveillance and analysis of current trends in Brazil. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, p. e01256–21, 2022.

FUKUSHIMA, Y.; SATO, T.; TSUKAMOTO, N.; NAKAJIMA, C.; SUZUKI, Y.; TAKAHASHI, S.; YOKOTA, S. I. Clonal/subclonal changes and accumulation of CTX-M-type β -lactamase genes in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* ST131 and ST1193 strains isolated during the past 12 years, Japan. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 27, p. 150–155, 2021.

FURLAN, J. P. R.; STEHLING, E. G. Presence of β -lactamases encoding genes in soil samples from different origins. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 228, p. 125, 2017.

FURLAN, J. P. R.; GALLO, I. F. L.; DE CAMPOS, A. C. L. P.; PASSAGLIA, J.; FALCÃO, J. P.; NAVARRO, A.; NAKAZATO, G.; STEHLING, E. G. Molecular characterization of multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* harboring antimicrobial resistance genes obtained from a farmhouse. **Pathogens and Global Health**, v. 113, n. 6, p. 268–274, 2019.

FURLAN, J. P. R.; STEHLING, E. G. Draft genome sequence of a multidrug-resistant *tetA*/*IncF*-harbouring *Escherichia coli* ST906 obtained from a soil cultivated with jaboricaba (*Plinia cauliflora*). **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 16, p. 181–182, 2019a.

FURLAN, J. P. R.; STEHLING, E. G. Draft genome sequence of a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST189 carrying several acquired antimicrobial resistance genes obtained from Brazilian soil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 17, p. 321–322, 2019b.

FURLAN, J. P. R.; DOS SANTOS, L. D. R.; RAMOS, M. S.; GALLO, I. F. L.; STEHLING, E. G. Presence of colistin resistance *mcr-4* gene and clinically relevant antimicrobial resistance genes in sand samples from a public beach. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 231, p. 321, 2020a.

FURLAN, J.; DOS SANTOS, L.; MORETTO, J.; RAMOS, M. S.; GALLO, I.; ALVES, G.; PAULELLI, A. C.; ROCHA, C.; CESILA, C. A.; GALLIMBERTI, M.; DEVÓZ, P. P.; JÚNIOR, F. B.; STEHLING, E. G. Occurrence and abundance of clinically relevant antimicrobial resistance genes in environmental samples after the Brumadinho dam disaster, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 726, p. 138100, 2020b.

FURLAN, J. P. R.; FERREIRA, M. E. S.; STEHLING, E. G. Genetic diversity of multidrug-resistant CMY-producing *Escherichia coli* from feces and soil in a small-scale pig farm. **Microbial Drug Resistance**, v. 26, p. 1365–1371, 2020c.

FURLAN, J.; SAVAZZI, E. A.; STEHLING, E. G. Widespread high-risk clones of multidrug-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* B2-ST131 and F-ST648 in public aquatic environments. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 5, n. 1, p. 106040, 2020d.

FURLAN, J.; LOPES, R.; RAMOS, M. S.; DOS SANTOS, L.; DA SILVA ROSA, R.; SAVAZZI, E. A.; STEHLING, E. G. Colistin-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli* ST1775-H137 co-harboring *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CMY-2} recovered from an urban stream. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 96, p. 105156, 2021a.

FURLAN, J. P. R.; RAMOS, M. S.; DOS SANTOS, L.; GALLO, I. F. L.; LOPES, R.; STEHLING, E. G. Appearance of *mcr-9*, *bla*_{KPC}, *cfr* and other clinically relevant antimicrobial resistance genes in recreation waters and sands from urban beaches, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 167, p. 112334, 2021b.

FURLAN, J. P. R.; STEHLING, E. G. Multiple sequence types, virulence determinants and antimicrobial resistance genes in multidrug- and colistin-resistant *Escherichia coli* from agricultural and non-agricultural soils. **Environmental Pollution**, v. 288, p. 117804, 2021.

FURLAN, J., DOS SANTOS, L., RAMOS, M. S., GALLO, I., MORETTO, J., & STEHLING, E. G. Occurrence of clinically relevant antimicrobial resistance genes, including *mcr-3* and *mcr-7.1*, in soil and water from a recreation club. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 32, n. 4, p. 819–828, 2022a.

FURLAN, J. P. R.; GALLO, I. F. L.; STEHLING, E. G. Genomic characterization of multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from grain culture soils. **Pedosphere**, v. 32, n. 3, p. 495-502, 2022b.

FURLAN, J. P. R.; RAMOS, M. S.; ROSA, R. S.; SAVAZZI, E. A.; STEHLING, E. G. Occurrence and genetic characteristics of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates co-

harboring antimicrobial resistance genes and metal tolerance genes in aquatic ecosystems. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 244, p. 114003, 2022c.

FURLAN, J. P. R.; STEHLING, E. G.; SAVAZZI, E. A.; PEIXE, L.; NOVAIS, A. High occurrence of colistin- and multidrug-resistant strains carrying *mcr-1* or an underestimated *mcr-1.26* allelic variant along a large Brazilian river. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 30, p. 127–129, 2022d.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; FORTINI, D.; VELDMAN, K.; MEVIUS, D.; CARATTOLI, A. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 274–281, 2009.

GARCÍA-MENIÑO, I.; GARCÍA, V.; MORA, A.; DÍAZ-JIMÉNEZ, D.; FLAMENT-SIMON, S. C.; ALONSO, M. P.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J. Swine enteric colibacillosis in Spain: Pathogenic potential of *mcr-1* ST10 and ST131 *E. coli* isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2659, 2018.

GARDINER, B. J.; STEWARDSON, A. J.; ABBOTT, I. J.; PELEG, A. Y. Nitrofurantoin and fosfomicin for resistant urinary tract infections: old drugs for emerging problems. **Australian Prescriber**, v. 42, n. 1, p. 14–19, 2019.

GAYNES, R. The discovery of Penicillin-New insights after more than 75 years of clinical use. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 849–853, 2017.

ELIOPOULOS, G. M.; HUOVINEN, P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 11, p. 1608–1614, 2001.

GERMOVSEK, E.; BARKER, C. I.; SHARLAND, M. What do I need to know about aminoglycoside antibiotics?. **Archives of Disease in Childhood**, v. 102, n. 2, p. 89–93, 2017.

GHAFOURIAN, S.; SADEGHIFARD, N.; SOHEILI, S.; SEKAWI, Z. Extended spectrum Beta-lactamases: definition, classification and epidemiology. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 17, p. 11–21, 2015.

GIRARDELLO, R.; PIROUPO, C. M.; MARTINS, J.; JR, MAFFUCCI, M. H.; CURY, A. P.; FRANCO, M.; MALTA, F. M.; ROCHA, N. C.; PINHO, J.; ROSSI, F.; DUARTE, A.; SETUBAL, J. C. Genomic characterization of *mcr-1.1*-producing *Escherichia coli* recovered from human infections in São Paulo, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. 663414, 2021.

GIL-GIL, T.; LABORDA, P.; SANZ-GARCÍA, F.; HERNANDO-AMADO, S.; BLANCO, P.; MARTÍNEZ, J. L. Antimicrobial resistance: A multifaceted problem with multipronged solutions. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 11, p. e945, 2019.

GILLINGS, M. R.; LABBATE, M.; SAJJAD, A.; GIGUÈRE, N. J.; HOLLEY, M. P.; STOKES, H. W. Mobilization of a Tn402-like class 1 integron with a novel cassette array via flanking miniature inverted-repeat transposable element-like structures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 18, p. 6002–6004, 2009.

- GOGRY, F. A.; SIDDIQUI, M. T.; SULTAN, I.; HAQ, Q. Current update on intrinsic and acquired colistin resistance mechanisms in bacteria. **Frontiers in Medicine**, v. 8, n. 677720, 2021.
- GOMES, T. A.; ELIAS, W. P.; SCALETSKY, I. C.; GUTH, B. E.; RODRIGUES, J. F.; PIAZZA, R. M.; FERREIRA, L. C.; MARTINEZ, M. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 3–30, 2016.
- GOMI, R.; MATSUDA, T.; MATSUMURA, Y.; YAMAMOTO, M.; TANAKA, M.; ICHIYAMA, S.; YONEDA, M. Occurrence of clinically important lineages, including the sequence type 131 C1-M27 subclone, among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in wastewater. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 9, p. e00564-17, 2017.
- GOMI, R.; MATSUDA, T.; MATSUMURA, Y.; YAMAMOTO, M.; TANAKA, M.; ICHIYAMA, S.; YONEDA, M. Whole-genome analysis of antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in river water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 5, p. e02703-16, 2017.
- GONG, L.; TANG, N.; CHEN, D.; SUN, K.; LAN, R.; ZHANG, W.; ZHOU, H.; YUAN, M.; CHEN, X.; ZHAO, X.; CHE, J.; BAI, X.; ZHANG, Y.; XU, H.; WALSH, T. R.; LU, J.; XU, J.; LI, J.; FENG, J. A nosocomial respiratory infection outbreak of carbapenem-resistant *Escherichia coli* ST131 with multiple transmissible *bla*_{KPC-2} carrying plasmids. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 2068, 2020.
- GONZÁLEZ-ZORN, B.; ESCUDERO, J. A. Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment. **International Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 101–109, 2012.
- GORDON, L.; CLOECKAERT, A.; DOUBLET, B.; SCHWARZ, S.; BOUJU-ALBERT, A.; GANIÈRE, J. P.; LE BRIS, H.; LE FLÈCHE-MATÉOS, A.; GIRAUD, E. Complete sequence of the *floR*-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. 65–71, 2008.
- GRAHAM, D. W.; KNAPP, C. W.; CHRISTENSEN, B. T.; MCCLUSKEY, S.; DOLFING, J. Appearance of β -lactam resistance genes in agricultural soils and clinical isolates over the 20th century. **Scientific Reports**, v. 6, n. 21550, 2016.
- GRÉGOIRE, N.; ARANZANA-CLIMENT, V.; MAGRÉAULT, S.; MARCHAND, S.; COUET, W. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of colistin. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 56, n. 12, p. 1441–1460, 2017.
- GREVSKOTT, D. H.; SALVÀ-SERRA, F.; MOORE, E.; MARATHE, N. P. Nanopore sequencing reveals genomic map of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases carried by *Escherichia coli* strains isolated from blue mussels (*Mytilus edulis*) in Norway. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 134, 2020.
- GRUBER, C. J.; LANG, S.; RAJENDRA, V. K.; NUK, M.; RAFFL, S.; SCHILDBACH, J. F.; ZECHNER, E. L. Conjugative DNA transfer is enhanced by plasmid R1 partitioning proteins. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 3, n. 32, 2016.

GUARDABASSI, L.; BUTAYE, P.; DOCKRELL, D. H.; FITZGERALD, J. R.; KUIJPER, E. J.; ESCMID STUDY GROUP FOR VETERINARY MICROBIOLOGY. One Health: a multifaceted concept combining diverse approaches to prevent and control antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 12, p. 1604–1605, 2020.

GUERRA, B.; SOTO, S. M.; ARGÜELLES, J. M.; MENDOZA, M. C. 2001. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1305–1308, 2001.

GUERRIERI, C. G.; PEREIRA, M. F.; GALDINO, A.; DOS SANTOS, A.; ELIAS, W. P.; SCHUENCK, R. P.; SPANO, L. C. Typical and atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* are both Virulent in the *Galleria mellonella* model. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1791, 2019.

GURUNG, S.; KAFLE, S.; DHUNGEL, B.; ADHIKARI, N.; THAPA SHRESTHA, U.; ADHIKARI, B.; BANJARA, M. R.; RIJAL, K. R.; GHIMIRE, P. Detection of OXA-48 gene in carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Urine Samples. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 2311–2321, 2020.

GUZMÁN-BLANCO, M.; LABARCA, J. A.; VILLEGAS, M. V.; GOTUZZO, E.; LATIN AMERICA WORKING GROUP ON BACTERIAL RESISTANCE. Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial *Enterobacteriaceae* in Latin America. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 421–433, 2014.

GYLES, C. One Medicine, One Health, One World. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 57, n. 4, p. 345–346, 2016.

HAENNI, M.; MÉTAYER, V.; JARRY, R.; DRAPEAU, A.; PUECH, M. P.; MADEC, J. Y.; KECK, N. Wide spread of *bla*_{CTX-M-9}/*mcr-9* IncHI2/ST1 plasmids and CTX-M-9-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* in rescued wild Animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 601317, 2020.

HARMER, C. J.; MORAN, R. A.; HALL, R. M. Movement of IS26-associated antibiotic resistance genes occurs via a translocatable unit that includes a single IS26 and preferentially inserts adjacent to another IS26. **mBio**, v. 5, n. 5, p. e01801–e1814, 2014.

HAMMOUDI HALAT, D.; AYOUB MOUBARECK, C. The current burden of carbapenemases: review of significant properties and dissemination among Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, p. 186, 2020.

HEß, S.; BERENDONK, T. U.; KNEIS, D. Antibiotic resistant bacteria and resistance genes in the bottom sediment of a small stream and the potential impact of remobilization. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 9, p. 10.1093/femsec/fiy128, 2018.

HENRY, R. Etymologia: *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 8, p. 1310, 2015.

- HERNANDO-AMADO, S.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1432–1442, 2019.
- HOOPER, D. C.; JACOBY, G. A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1354, n. 1, p. 12–31, 2015.
- HOU, J.; HUANG, X.; DENG, Y.; HE, L.; YANG, T.; ZENG, Z.; CHEN, Z.; LIU, J. H. Dissemination of the fosfomycin resistance gene *fosA3* with CTX-M β -lactamase genes and *rmtB* carried on IncFII plasmids among *Escherichia coli* isolates from pets in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 2135–2138, 2012.
- HU, Y. Y.; CAI, J. C.; ZHOU, H. W.; CHI, D.; ZHANG, X. F.; CHEN, W. L.; ZHANG, R.; CHEN, G. X. Molecular typing of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from environmental water, swine feces, specimens from healthy humans, and human patients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 5988–5996, 2013.
- HUMENIUK, C.; ARLET, G.; GAUTIER, V.; GRIMONT, P.; LABIA, R.; PHILIPPON, A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 3045–3049, 2002.
- HUSSEIN, N. H.; AL-KADMY, I.; TAHA, B. M.; HUSSEIN, J. D. Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 3, p. 2897–2907, 2021.
- IREDELL, J.; BROWN, J.; TAGG, K. Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*: mechanisms and clinical implications. **BMJ**, v. 352, p. h6420, 2016.
- JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161–182, 2009.
- JACOBY, G. A.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D. C. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 5, p. 10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013, 2014.
- JEONG, H. S.; KIM, J. A.; SHIN, J. H.; CHANG, L. C.; JEONG, J.; CHO, J-H.; KIM, M-N.; KIM, S.; KIM, R. Y.; LEE, C. H.; LEE, K.; LEE, K.; LEE, M. A.; LEE, W. G.; SHIN, J. H.; LEE, J. N. Resistance and Mutations in the Gyrase and Topoisomerase IV Genes in *Salmonella* Isolated from 12 Tertiary-Care Hospitals in Korea. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 4, p. 551–557, 2011.
- JIA, W.; WANG, J.; XU, H.; LI, G. Resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* to fluoroquinolones: Prevalence in a university hospital and possible mechanisms. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 5, p. 5177–5195, 2015.
- JIANG, H.; CHENG, H.; LIANG, Y.; YU, S.; YU, T.; FANG, J.; ZHU, C. Diverse mobile genetic elements and conjugal transferability of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in *Escherichia coli* isolates from *Penaeus vannamei* and pork from large markets in Zhejiang, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1787, 2019.

JIN, L.; WANG, R.; WANG, X.; WANG, Q.; ZHANG, Y.; YIN, Y.; WANG, H. Emergence of *mcr-1* and carbapenemase genes in hospital sewage water in Beijing, China. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 1, p. 84–87, 2018.

JINDAL, A. K.; PANDYA, K.; KHAN, I. D. Antimicrobial resistance: A public health challenge. **Medical Journal, Armed Forces India**, v. 71, n. 2, p. 178–181, 2015.

JOENSEN, K. G.; SCHEUTZ, F.; LUND, O.; HASMAN, H.; KAAS, R. S.; NIELSEN, E. M.; AARESTRUP, F. M. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1501–1510, 2014.

JOENSEN, K. G.; TETZSCHNER, A. M.; IGUCHI, A.; AARESTRUP, F. M.; SCHEUTZ, F. Rapid and easy *in silico* serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2410–2426, 2015.

JOHANSSON, M.; BORTOLAIA, V.; TANSIRICHAIIYA, S.; AARESTRUP, F. M.; ROBERTS, A. P.; PETERSEN, T. N. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 1, p. 101–109, 2021.

JOHNSON, J. R.; MURRAY, A. C.; GAJEWSKI, A.; SULLIVAN, M.; SNIPPES, P.; KUSKOWSKI, M. A.; SMITH, K. E. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 7, p. 2161–2168, 2003.

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

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, S. J.; ROSENBERGER, S. C.; NOLAN, L. K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3987–3996, 2008.

JOLLEY, K. A.; BRAY, J. E.; MAIDEN, M. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. **Wellcome Open Research**, v. 3, n. 124, 2008.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.

KARCZMARCZYK, M.; ABBOTT, Y.; WALSH, C.; LEONARD, N.; FANNING, S. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from animals presenting at a university veterinary hospital. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 20, p. 7104–7112, 2011.

- KAUSHIK, M.; KUMAR, S.; KAPOOR, R. K.; VIRDI, J. S.; GULATI, P. Integrons in *Enterobacteriaceae*: diversity, distribution and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 2, p. 167–176, 2018.
- KERN, M. B.; KLEMMENSEN, T.; FRIMODT-MØLLER, N.; ESPERSEN, F. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 513–516, 2002.
- KEYES, K.; HUDSON, C.; MAURER, J. J.; THAYER, S.; WHITE, D. G.; LEE, M. D. Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 421–424, 2000.
- KIEFFER, N.; NORDMANN, P.; MORENO, A. M.; ZANOLLI MORENO, L.; CHABY, R.; BRETON, A.; TISSIÈRES, P.; POIREL, L. Genetic and functional characterization of an MCR-3-like enzyme-producing *Escherichia coli* isolate recovered from swine in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 7, p. e00278-18, 2018.
- KLÜMPER, U.; RIBER, L.; DECHESNE, A.; HANSEN, L. H.; SØRENSEN, J. S.; SMETS, B. F. Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community. **ISME Journal**, v. 9, p. 934–945, 2015.
- KNOPP, M.; ANDERSSON, D. I. Predictable phenotypes of antibiotic resistance mutations. **mBio**, v. 9, n. 3, p. e00770-18, 2018.
- KOELEMAN, J. G.; STOOF, J.; VAN DER BIJL, M. W.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; SAVELKOUL, P. H. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 8–13, 2001.
- KOGA, V. L.; MALUTA, R. P.; DA SILVEIRA, W. D.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M.; VESPERO, E. C.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. Characterization of CMY-2-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses and human infection in a city of South Brazil. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 174, 2019.
- KOLA, A.; KOHLER, C.; PFEIFER, Y.; SCHWAB, F.; KÜHN, K.; SCHULZ, K.; BALAU, V.; BREITBACH, K.; BAST, A.; WITTE, W.; GASTMEIER, P.; STEINMETZ, I. High prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in organic and conventional retail chicken meat, Germany. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2631–2634, 2012.
- KOMP LINDGREN, P.; KARLSSON, A.; HUGHES, D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3222–3232, 2003.
- KONDRATYEVA, K.; SALMON-DIVON, M.; NAVON-VENEZIA, S. Meta-analysis of pandemic *Escherichia coli* ST131 plasmidome proves restricted plasmid-clade associations. **Scientific Reports**, v. 10, p. 36, 2020.
- KOTB, D. N.; MAHDY, W. K.; MAHMOUD, M. S.; KHAIRY, R. Impact of co-existence of PMQR genes and QRDR mutations on fluoroquinolones resistance in *Enterobacteriaceae*

strains isolated from community and hospital acquired UTIs. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 979, 2019.

KRAUSE, K. M., SERIO, A. W., KANE, T. R.; CONNOLLY, L. E. Aminoglycosides: an overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 6, p. a027029, 2016.

LAHLAOUI, H.; DE LUCA, F.; MARADEL, S.; BEN-HAJ-KHALIFA, A.; BEN HAMOUDA, H.; KHEDER, M.; BEN MOUSSA, M.; ROSSILLINI, G. M.; DOCQUIER, J. D. Occurrence of conjugative IncF-type plasmids harboring the *bla*_{CTX-M-15} gene in *Enterobacteriaceae* isolates from newborns in Tunisia. **Pediatric Research**, v. 77, n. 1-1, p. 107–110, 2015.

LARSEN, M. V.; COSENTINO, S.; RASMUSSEN, S.; FRIIS, C.; HASMAN, H.; MARVIG, R. L.; JELSBAK, L.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; USSERY, D. W.; AARESTRUP, F. M.; LUND, O. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1355–1361, 2012.

LARSSON, D. G. J.; FLACH, C. F. Antibiotic resistance in the environment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, p. 257–269, 2021.

LEEKITCHAROENPHON, P.; HENDRIKSEN, R. S.; LE HELLO, S.; WEILL, F. X.; BAGGESEN, D. L.; JUN, S. R.; USSERY, D. W.; LUND, O.; CROOK, D. W.; WILSON, D. J.; AARESTRUP, F. M. Global genomic epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 8, p. 2516–2526, 2016.

LEI, C. W.; ZHANG, Y.; WANG, Y. T.; WANG, H. N. Detection of mobile colistin resistance gene *mcr-10.1* in a Conjugative plasmid from *Enterobacter roggenkampii* of chicken origin in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 10, p. e01191–20, 2020.

LEITE, B.; CHAVES, M. A.; NUNES, A. A. T.; JANK, L.; CORÇÃO, G. Antibiotic resistance in surface waters from a coastal lagoon of Southern Brazil under the impact of anthropogenic activities. **Revista Ambiente & Água**, v. 14, p. 5, 2019.

LEITE, E. L.; ARAÚJO, W. J.; VIEIRA, T. R.; ZENATO, K. S.; VASCONCELOS, P. C.; CIBULSKI, S.; GIVISIEZ, P.; CARDOSO, M.; OLIVEIRA, C. First reported genome of an *mcr-9*-mediated colistin-resistant *Salmonella* Typhimurium isolate from Brazilian livestock. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 23, p. 394–397, 2020.

LENTZ, S.; DALMOLIN, T. V.; BARTH, A. L.; MARTINS, A. F. *mcr-1* gene in latin america: How is it disseminated among humans, animals, and the environment? **Frontiers in Public Health**, v. 9, p. 648940, 2021.

LERMINIAUX, N. A.; CAMERON, A. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 34–44, 2019.

LESCAT, M.; CLERMONT, O.; WOERTHER, P. L.; GLODT, J.; DION, S.; SKURNIK, D.; DJOSSOU, F.; DUPONT, C.; PERROZ, G.; PICARD, B.; CATZEFLIS, F.; ANDREMONT, A.; DENAMUR, E. Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic

diversity with host-dependant population structure. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 49–57, 2013

LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 12, n. 5, p. 371–387, 2013.

LIAKOPOULOS, A.; MEVIUS, D.; CECCARELLI, D. A. Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected yet ubiquitous. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1374, 2016.

LIMA, I.; BOISEN, N.; SILVA, J.; HAVT, A.; DE CARVALHO, E. B.; SOARES, A. M.; LIMA, N. L.; MOTA, R.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. Pt 5, p. 683–693, 2013.

LIMA, L. M.; SILVA, B.; BARBOSA, G.; BARREIRO, E. J. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 208, p. 112829, 2020.

LING, Z.; YIN, W.; SHEN, Z.; WANG, Y.; SHEN, J.; WALSH, T. R. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 11, p. 3087–3095, 2020.

LIU, C. M.; STEGGER, M.; AZIZ, M.; JOHNSON, T. J.; WAITS, K.; NORDSTROM, L.; GAULD, L.; WEAVER, B.; ROLLAND, D.; STATHAM, S.; HORWINSKI, J.; SARIYA, S.; DAVIS, G. S.; SOKURENKO, E.; KEIM, P.; JOHNSON, J. R.; PRICE, L. B. *Escherichia coli* ST131-H22 as a foodborne uropathogen. **mBio**, v. 9, p. 4, 2018.

LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L. F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J. H.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 2016.

LIVERMORE, D. M.; DAY, M.; CLEARY, P.; HOPKINS, K. L.; TOLEMAN, M. A.; WAREHAM, D. W.; WIUFF, C.; DOUMITH, M.; WOODFORD, N. OXA-1 β -lactamase and non-susceptibility to penicillin/ β -lactamase inhibitor combinations among ESBL-producing *Escherichia coli*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 2, p. 326–333, 2019.

LOPES, R.; FUENTES-CASTILLO, D.; FONTANA, H.; RODRIGUES, L.; DANTAS, K.; CERDEIRA, L.; HENRIQUES, I.; LINCOPAN, N. Endophytic lifestyle of global clones of extended-spectrum β -lactamase-producing priority pathogens in fresh vegetables: a trojan horse strategy favoring human colonization?. **mSystems**, v. 6, n. 1, p. e01125-20, 2021a.

LOPES, R.; FURLAN, J. P. R.; DOS SANTOS, L. D. R.; GALLO, I. F. L.; STEHLING, E. G. Colistin-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli* ST131-H22 carrying *bla*_{CTX-M-15} and *qnrB19* in agricultural soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 659900, 2021b.

- LÖHR, I. H.; HÜLTER, N.; BERNHOFF, E.; JOHNSEN, P. J.; SUNDSFJORD, A.; NASEER, U. Persistence of a pKPN3-like CTX-M-15-encoding IncFIIK plasmid in a *Klebsiella pneumoniae* ST17 host during two years of intestinal colonization. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0116516, 2015.
- LUGLI, G. A.; MILANI, C.; MANCABELLI, L.; TURRONI, F.; FERRARIO, C.; DURANTI, S.; SINDEREN, D. V.; VENTURA, M. Ancient bacteria of the Ötzi's microbiome: a genomic tale from the Copper Age. **Microbiome**, v. 5, p. 5, 2017.
- LUO, Q.; YU, W.; ZHOU, K.; GUO, L.; SHEN, P.; LU, H.; HUANG, C.; XU, H.; XU, S.; XIAO, Y.; LI, L. Molecular epidemiology and colistin resistant mechanism of *mcr*-positive and *mcr*-negative clinical isolated *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2262, 2017.
- MA, F.; XU, S.; TANG, Z.; LI, Z.; ZHANG, L. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. **Biosafety and Health**, v. 3, n. 1, p. 32-38, 2021.
- MACEDO, G.; HERNANDEZ-LEAL, L.; VAN DER MAAS, P.; HEEDERIK, D.; MEVIUS, D.; SCHMITT, H. The impact of manure and soil texture on antimicrobial resistance gene levels in farmlands and adjacent ditches. **The Science of the Total Environment**, v. 737, p. 139563, 2020.
- MAEUSLI, M.; LEE, B.; MILLER, S.; REYNA, Z.; LU, P.; YAN, J.; ULHAQ, A.; SKANDALIS, N.; SPELLBERG, B.; LUNA, B. Horizontal gene transfer of antibiotic resistance from *Acinetobacter baylyi* to *Escherichia coli* on lettuce and subsequent antibiotic resistance transmission to the gut microbiome. **mSphere**, v. 5, n. 3, p. e00329-20, 2020.
- MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant; extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.
- MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 1-2, p. 2–12, 2013.
- MALBERG, T. A. M.; JOHNSON, J. R.; JOHNSTON, B. D.; LUND, O.; SCHEUTZ, F. *In silico* genotyping of *Escherichia coli* isolates for extraintestinal virulence genes by use of whole-genome sequencing data. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 10, p. e01269-20, 2020.
- MAMANI, R.; FLAMENT-SIMON, S. C.; GARCÍA, V.; MORA, A.; ALONSO, M. P.; LÓPEZ, C.; GARCÍA-MENIÑO, I.; DÍAZ-JIMÉNEZ, D.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J. Sequence types, clonotypes, serotypes, and virotypes of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteraemia in a Spanish hospital over a 12-year period (2000 to 2011). **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1530, 2019.

- MANAIA, C. M. Assessing the risk of antibiotic resistance transmission from the environment to humans: non-direct proportionality between abundance and risk. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 173–181, 2017.
- MANGES, A. R.; GEUM, H. M.; GUO, A.; EDENS, T. J.; FIBKE, C. D.; PITOUT, J. Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, p. e00135-18, 2019.
- MANGES, A. R.; HAREL, J.; MASSON, L.; EDENS, T. J.; PORTT, A.; REID-SMITH, R. J.; ZHANEL, G. G.; KROPINSKI, A. M.; BOERLIN, P. Multilocus sequence typing and virulence gene profiles associated with *Escherichia coli* from human and animal sources. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 4, p. 302–310, 2015.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Uso de substância antimicrobiana em rações animais é proibido**. MAPA. 2016. Acessado em 23 de março de 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/uso-de-substancia-antimicrobiana-em-racoes-animais-e-proibido>.
- MARKLEY, J. L.; WENCEWICZ, T. A. Tetracycline-inactivating enzymes. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1058, 2018.
- MARTIN, M. J.; THOTTATHIL, S. E.; NEWMAN, T. B. Antibiotics overuse in animal agriculture: A call to action for health care providers. **American Journal of Public Health**, v. 105, n. 12, p. 2409–2410, 2015.
- MARTINS-SORENSEN, N.; SNESRUD, E.; XAVIER, D. E.; CACCI, L. C.; IAVARONE, A. T.; MCGANN, P.; RILEY, L. W.; MOREIRA, B. M. A novel plasmid-encoded *mcr-4.3* gene in a colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 1, p. 60–64, 2020.
- MATAMOROS, S.; VAN HATTEM, J. M.; ARCILLA, M. S.; WILLEMSE, N.; MELLES, D. C.; PENDERS, J.; Vinh, T. N.; Hoa, N. T.; Bootsma, M. C. J.; Van Genderen, P. R.; Goorhuis, A.; Grobusch, M.; Molhoek, N.; Lashof, A. M. L. O.; Stobberingh, E. E.; Verbrugh, H. A.; De Jong, M. D.; Schultsz, C. Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr-1* gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. **Scientific Reports**, v. 7, p. 15364, 2017.
- MATHER, A. E.; REID, S. W.; MASKELL, D. J.; PARKHILL, J.; FOOKES, M. C.; HARRIS, S. R.; BROWN, D. J.; COIA, J. E.; MULVEY, M. R.; GILMOUR, M. W.; PETROVSKA, L.; DE PINNA, E.; KURODA, M.; AKIBA, M.; IZUMIYA, H.; CONNOR, T. R.; SUCHARD, M. A.; LEMEY, P.; MELLOR, D. J.; HAYDON, D. T.; HAYDON, D. T.; THOMSON, N. R. Distinguishable epidemics of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in different hosts. **Science**, v. 341, n. 6153, p. 1514–1517, 2013.
- MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 565–591, 2015.
- MATSUMURA, Y.; JOHNSON, J. R.; YAMAMOTO, M.; NAGAO, M.; TANAKA, M.; TAKAKURA, S.; ICHIYAMA, S.; KYOTO-SHIGA CLINICAL MICROBIOLOGY

STUDY GROUP. CTX-M-27- and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H30 subclonal group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 6, p. 1639–1649, 2015.

MCARTHUR, A. G.; WAGLECHNER, N.; NIZAM, F.; YAN, A.; AZAD, M. A.; BAYLAY, A. J.; BHULLAR, K.; CANOVA, M. J.; DE PASCALE, G.; EJIM, L.; KALAN, L.; KING, A. M.; KOTEVA, K.; MORAR, M.; MULVEY, M. R.; O'BRIEN, J. S.; PAWLOWSKI, A. C.; PIDDOCK, L. J.; SPANOGIANNOPOULOS, P.; SUTHERLAND, A. D.; TANG, I.; TAYLOR, P. L.; THAKER, M.; WANG, W.; YAN, M.; YU, T.; WRIGHT, G. D. The comprehensive antibiotic resistance database. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3348–3357, 2013.

MCDANIELS, A. E.; RICE, E. W.; REYES, A. L.; JOHNSON, C. H.; HAUGLAND, R. A.; STELMA, G. N., JR. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3350–3354, 1996.

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 2, p. 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017, 2018.

MERIDA-VIEYRA, J.; DE COLSA-RANERO, A.; ARZATE-BARBOSA, P.; ARIAS-DE LA GARZA, E.; MÉNDEZ-TENORIO, A.; MURCIA-GARZÓN, J.; AQUINO-ANDRADE, A. First clinical isolate of *Escherichia coli* harboring *mcr-1* gene in Mexico. **PloS One**, v. 14, n. 4, p. e0214648, 2019.

MINARINI, L. A.; POIREL, L.; TREVISANI, N. A.; DARINI, A. L.; NORDMANN, P. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, n. 2, p. 202–206, 2009.

MOJICA, M. F.; BONOMO, R. A.; FAST, W. B1-Metallo- β -lactamases: where do we stand?. **Current Drug Targets**, v. 17, n. 9, p. 1029–1050, 2016.

MOJICA, M. F.; ROSSI, M. A.; VILA, A. J.; BONOMO, R. A. The urgent need for metallo- β -lactamase inhibitors: an unattended global threat. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. e28–e34, 2022.

MONTE, D. F.; LINCOPAN, N.; BERMAN, H.; CERDEIRA, L.; KEELARA, S.; THAKUR, S.; FEDORKA-CRAY, P. J.; LANDGRAF, M. Genomic features of high-priority *Salmonella enterica* serovars circulating in the food production Chain, Brazil, 2000-2016. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 11058, 2019.

MONTE, D. F.; MEM, A.; FERNANDES, M. R.; CERDEIRA, L.; ESPOSITO, F.; GALVÃO, J. A.; FRANCO, B.; LINCOPAN, N.; LANDGRAF, M. Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying *mcr-1* genes in South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. e02718-16, 2017a.

MONTE, D. F.; FERNANDES, M. R.; CERDEIRA, L.; DE SOUZA, T. A.; MEM, A.; FRANCO, B.; LANDGRAF, M.; LINCOPAN, N. Draft genome sequences of colistin-

resistant MCR-1-producing *Escherichia coli* ST1850 and ST74 strains isolated from commercial chicken Meat. **Genome Announcements**, v. 5, n. 20, p. e00329-17, 2017b.

MOURA, A.; SOARES, M.; PEREIRA, C.; LEITÃO, N.; HENRIQUES, I.; CORREIA, A. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. **Bioinformatics**, v. 25, n. 8, p. 1096–1098, 2009.

MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única**. MS. 2018. Acessado em 23 de março de 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/antimicrobianos/plano-nacional-antimicrobianos-pan-br-14fev19-isbn.pdf/view>.

MÜLLER, A.; STEPHAN, R.; NÜESCH-INDERBINEN, M. Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. **The Science of the Total Environment**, v. 541, p. 667–672, 2016.

NANG, S. C.; LI, J.; VELKOV, T. The rise and spread of *mcr* plasmid-mediated polymyxin resistance. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 131–161, 2019.

NASCIMENTO, T.; CANTAMESSA, R.; MELO, L.; FERNANDES, M. R.; FRAGA, E.; DROPA, M.; SATO, M. I. Z.; CERDEIRA, L.; LINCOPAN, N. International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban lake waters. **The Science of the Total Environment**, v. 598, p. 910-915, 2017.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 1, p. 142–201, 1998.

NATHAN, C. Antibiotics at the crossroads. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 899–902, 2004.

NCBI RESOURCE COORDINATORS. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D7–D19, 2016.

NESME, J.; CÉCILLON, S.; DELMONT, T. O.; MONIER, J. M.; VOGEL, T. M.; SIMONET, P. Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. 1096–1100, 2014.

NEUMANN, B.; RACKWITZ, W.; HUNFELD, K. P.; FUCHS, S.; WERNER, G.; PFEIFER, Y. Genome sequences of two clinical *Escherichia coli* isolates harboring the novel colistin-resistance gene variants *mcr-1.26* and *mcr-1.27*. **Gut Pathogens**, v. 12, p. 40, 2020.

NEVES, P. R.; PERDIGÃO NETO, L. V.; RUEDAS MARTINS, R. C.; RAMOS, J. F.; LEITE, G.; ROSSI, F.; SANABANI, S. S.; ROCHA, V.; BATISTA, M. V.; GUIMARAES, T.; LEVIN, A. S.; COSTA, S. F. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying *bla*_{VIM-36} assigned to ST308: Indicated non-virulence in a *Galleria mellonella* model. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 16, 92–97, 2019.

NG, L. K.; MARTIN, I.; ALFA, M.; MULVEY, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Molecular and Cellular Probes**. v. 15, n. 4, p. 209–215, 2001.

NGUYEN, Y.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 90, 2012.

NICOLAS-CHANOINE, M. H.; BERTRAND, X.; MADEC, J. Y. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 543–574, 2014.

NOPPE-LECLERCQ, I.; WALLET, F.; HAENTJENS, S.; COURCOL, R.; SIMONET, M. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. **Research in Microbiology**, v. 150, n. 5, p. 317–322, 1999.

NURK, S.; BANKEVICH, A.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; KOROBAYNIKOV, A.; LAPIDUS, A.; PRJIBELSKI, A. D.; PYSHKIN, A.; SIROTKIN, A.; SIROTKIN, Y.; STEPANAUSKAS, R.; CLINGENPEEL, S. R.; WOYKE, T.; MCLEAN, J. S.; LASKEN, R.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M. A.; PEVZNER, P. A. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. **Journal of Computational Biology**, v. 20, n. 10, p. 714–737, 2013.

O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance.** HM Government. 2016. Acessado em 21 de março de 2022. Disponível em: https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf.

OGURA, Y.; UEDA, T.; NUKAZAWA, K.; HIROKI, H.; XIE, H.; ARIMIZU, Y.; HAYASHI, T.; SUZUKI, Y. The level of antimicrobial resistance of sewage isolates is higher than that of river isolates in different *Escherichia coli* lineages. **Scientific Reports**, v. 10, p. 17880, 2020.

OKEKE, I. N.; SCALETSKY, I. C.; SOARS, E. H.; MACFARLANE, L. R.; TORRES, A. G. Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 36–44, 2004.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 643, 2014.

OLIVEIRA, C. C.; LOPES, E. S.; BARBOSA, D. R.; PIMENTA, R. L.; SOBRINHO, N. M. B. A.; COELHO, S. M. O.; Souza, M. M. S.; Coelho, I. S. Occurrence of the colistin resistance *mcr-1* gene in soils from intensive vegetable production and native vegetation. **European Journal of Soil Science**, v. 70, p. 876–881, 2019.

OLIVEIRA, F. A.; ZACCARIOTTO, T. R.; PIVETA, C.; HOFLING, C. C.; RESENDE, M. R.; LEVY, C. E.; ESPOSITO, F.; FERNANDES, M. R.; CERDEIRA, L.; LINCOPAN, N. MCR-1-positive colistin-resistant *Escherichia coli* in immunocompromised hospitalised patients. **International journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, p. 3, 438–440, 2018.

OLIVEIRA, S.; MOURA, R. A.; SILVA, K. C.; PAVEZ, M.; MCCULLOCH, J. A.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; MAMIZUKA, E. M.; SATO, M. I.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; LINCOPAN, N. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, v. 3, p. 849–852, 2014.

ORLEK, A.; STOESSER, N.; ANJUM, M. F.; DOUMITH, M.; ELLINGTON, M. J.; PETO, T.; CROOK, D.; WOODFORD, N.; WALKER, A. S.; PHAN, H.; SHEPPARD, A. E. Plasmid classification in an Era of whole-genome sequencing: Application in studies of antibiotic resistance epidemiology. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 182, 2017.

OVEJERO, C. M.; DELGADO-BLAS, J. F.; CALERO-CACERES, W.; MUNIESA, M.; GONZALEZ-ZORN, B. Spread of *mcr-1*-carrying *Enterobacteriaceae* in sewage water from Spain. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. 1050–1053, 2017.

PAIVA, Y.; NAGANO, D. S.; COTIA, A.; GUIMARÃES, T.; MARTINS, R.; PERDIGÃO NETO, L. V.; CÔRTEZ, M. F.; MARCHI, A. P.; CORSCADDEN, L.; MACHADO, A. S.; PAULA, A. I.; FRANCO, L.; NEVES, P. R.; LEVIN, A. S.; COSTA, S. F. Colistin-resistant *Escherichia coli* belonging to different sequence types: genetic characterization of isolates responsible for colonization, community- and healthcare-acquired infections. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 63, p. e38, 2021.

PALMEIRA, J. D.; FERREIRA, H.; MADEC, J. Y.; HAENNI, M. Draft genome of a ST443 *mcr-1*- and *bla*_{CTX-M-2}-carrying *Escherichia coli* from cattle in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, p. 269-270, 2018.

PARTRIDGE S. R. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p. 820–855, 2011.

PARTRIDGE, S. R.; DI PILATO, V.; DOI, Y.; FELDGARDEN, M.; HAFT, D. H.; KLIMKE, W.; KUMAR-SINGH, S.; LIU, J. H.; MALHOTRA-KUMAR, S.; PRASAD, A.; ROSSOLINI, G. M.; SCHWARZ, S.; SHEN, J.; WALSH, T.; WANG, Y.; XAVIER, B. B. Proposal for assignment of allele numbers for mobile colistin resistance (*mcr*) genes. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 10, p. 2625–2630, 2018a.

PARTRIDGE, S. R.; TSAFNAT, G.; COIERA, E.; IREDELL, J. R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. 757–784, 2009.

PARTRIDGE, S. R.; KWONG, S. M.; FIRTH, N.; JENSEN, S. O. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. e00088-17, 2018b.

PATON, A. W., PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598–602, 1998.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009.

PEIRANO, G.; AHMED-BENTLEY, J.; WOODFORD, N.; PITOUT, J. D. New Delhi metallo-Beta-lactamase from traveler returning to Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 242–244, 2011.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L.; PINTO, M. C.; GUERRA, L. R.; ASENSI, M. D. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 265–268, 2009.

PEREIRA, P. S.; DE ARAUJO, C. F.; SEKI, L. M.; ZAHNER, V.; CARVALHO-ASSEF, A. P.; ASENSI, M. D. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 312–316, 2013.

PÉREZ-ETAYO, L.; GONZÁLEZ, D.; VITAS, A. I. The aquatic ecosystem, a good environment for the horizontal transfer of antimicrobial resistance and virulence-associated factors among extended spectrum β -lactamases producing *E. coli*. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, p. 568, 2020.

PERDIGÃO NETO, L. V.; CORSCADDEN, L.; MARTINS, R.; NAGANO, D. S.; CUNHA, M.; NEVES, P. R.; FRANCO, L.; MOURA, M.; RIZEK, C. F.; GUIMARÃES, T.; BOSZCZOWSKI, Í.; ROSSI, F.; LEVIN, A. S.; STABLER, R. A.; COSTA, S. F. Simultaneous colonization by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* harboring *mcr-1* in Brazil. **Infection**, v. 47, n. 4, p.661–664, 2019.

PERRETEN, V.; BOERLIN, P. (2003). A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 1169–1172, 2003.

PERRY, J.; WAGLECHNER, N.; WRIGHT, G. The prehistory of antibiotic resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 6, p. a025197, 2016.

PHE – PUBLIC HEALTH ENGLAND. **Identification of Enterobacteriaceae**. PHE. 2014. Acessado em 24 de março de 2022. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/publications/smi-id-16-identification-of-enterobacteriaceae>.

PIETSCH, M.; IRRGANG, A.; ROSCHANSKI, N.; BRENNER MICHAEL, G.; HAMPRECHT, A.; RIEBER, H.; KÄSBOHRER, A.; SCHWARZ, S.; RÖSLER, U.; KREIENBROCK, L.; PFEIFER, Y.; FUCHS, S.; WERNER, G.; RESET STUDY GROUP. Whole genome analyses of CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food in Germany. **BMC Genomics**, v. 19, p. 601, 2018.

PIRES, J.; TARACILA, M.; BETHEL, C. R.; DOI, Y.; KASRAIAN, S.; TINGUELY, R.; SENDI, P.; BONOMO, R. A.; ENDIMIANI, A. *In vivo* evolution of CMY-2 to CMY-33 β -lactamase in *Escherichia coli* sequence type 131: Characterization of an acquired extended-spectrum AmpC conferring resistance to cefepime. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7483–7488, 2015.

PITOUT J. D. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 9, 2012.

PLOY, M. C.; DENIS, F.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2684–2688, 2000.

- PLOY, M. C.; GIAMARELLOU, H.; BOURLIOUX, P.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Detection of *aac(6)-I* genes in amikacin-resistant *Acinetobacter* spp. by PCR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 12, p. 2925–2928, 1994.
- POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 557–596, 2017.
- POIREL, L.; MADEC, J. Y.; LUPO, A.; SCHINK, A. K.; KIEFFER, N.; NORDMANN, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology spectrum**, v. 6, n. 4, p. 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017, 2018.
- POIREL, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M.; MAMMERI, H.; LIARD, A.; NORDMANN, P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3523–3525, 2005.
- POPA, O.; HAZKANI-COVO, E.; LANDAN, G.; MARTIN, W.; DAGAN, T. Directed networks reveal genomic barriers and DNA repair bypasses to lateral gene transfer among prokaryotes. **Genome Research**, v. 21, n. 4, p. 599–609, 2011.
- PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 7, p. 309–318, 2015.
- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.
- QUESADA, A.; PORRERO, M. C.; TÉLLEZ, S.; PALOMO, G.; GARCÍA, M.; DOMÍNGUEZ, L. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 71–74, 2015.
- RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 151–171, 2010.
- RAMSAY, J. P.; FIRTH, N. Diverse mobilization strategies facilitate transfer of non-conjugative mobile genetic elements. **Current Opinion in Microbiology**, v. 38, p. 1–9, 2017.
- RAU, R. B.; DE LIMA-MORALES, D.; WINK, P. L.; RIBEIRO, A. R.; MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. Emergence of *mcr-1* producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from Retail Meat: First detection in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 1, p. 58–59, 2018.
- REID, C. J.; BLAU, K.; JECHALKE, S.; SMALLA, K.; DJORDJEVIC, S. P. Whole genome sequencing of *Escherichia coli* from store-bought produce. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 3050, 2020.
- RHOUMA, M.; LETELLIER, A. Extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases and the *mcr-1* gene: is there a historical link?. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 3, p. 269–271, 2017.

- ROCHA, F. R.; PINTO, V. P.; BARBOSA, F. C. The Spread of CTX-M-Type extended-spectrum β -Lactamases in Brazil: a systematic review. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 301–311, 2016.
- ROCHELLE-NEWALL, E.; NGUYEN, T. M.; LE, T. P.; SENGTAHEUANGHOUNG, O.; RIBOLZI, O. A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: knowledge gaps and future directions. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 308, 2015.
- RODRIGUES, C.; MACHADO, E.; FERNANDES, S.; PEIXE, L.; NOVAIS, Â. Different *Escherichia coli* B2-ST131 clades (B and C) producing extended-spectrum β -lactamases (ESBL) colonizing residents of Portuguese nursing homes. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 15, p. 3303–3306, 2017.
- RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, C. W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**, v. 36, n. 2, p. 241–256, 2005.
- ROER, L.; OVERBALLE-PETERSEN, S.; HANSEN, F.; JOHANNESSEN, T. B.; STEGGER, M.; BORTOLAIA, V.; LEEKITCHAROENPHON, P.; KORSGAARD, H. B.; SEYFARTH, A. M.; MOSSONG, J.; WATTIAU, P.; BOLAND, C.; HANSEN, D. S.; HASMAN, H.; HAMMERUM, A. M.; HENDRIKSEN, R. S. ST131 *fimH22* *Escherichia coli* isolate with a *bla*_{CMY-2}/*IncI1*/ST12 plasmid obtained from a patient with bloodstream infection: highly similar to *E. coli* isolates of broiler origin. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 3, p. 557–560, 2019.
- ROER, L.; TCHESNOKOVA, V.; ALLESØE, R.; MURADOVA, M.; CHATTOPADHYAY, S.; AHRENFELDT, J.; THOMSEN, M.; LUND, O.; HANSEN, F.; HAMMERUM, A. M.; SOKURENKO, E.; HASMAN, H. Development of a Web Tool for *Escherichia coli* subtyping based on *fimH* alleles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2538–2543, 2017.
- ROSSI, F.; GIRARDELLO, R.; MORAIS, C.; CURY, A. P.; MARTINS, L. F.; DA SILVA, A. M.; ABDALA, E.; SETUBAL, J. C.; DA SILVA DUARTE, A. J. Plasmid-mediated *mcr-1* in carbapenem-susceptible *Escherichia coli* ST156 causing a blood infection: an unnoticeable spread of colistin resistance in Brazil? **Clinics (Sao Paulo)**, v. 72, n. 10, p. 642–644, 2017.
- ROZWANDOWICZ, M.; BROUWER, M.; FISCHER, J.; WAGENAAR, J. A.; GONZALEZ-ZORN, B.; GUERRA, B.; MEVIUS, D. J.; HORDIJK, J. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 5, p. 1121–1137, 2018.
- RUBIN, J. E.; PITOUT, J. D. Extended-spectrum β -lactamase, carbapenemase and AmpC producing *Enterobacteriaceae* in companion animals. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 1–2, p. 10–18, 2014.
- RUIZ, E.; SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M.; ROCHA-GRACIA, R.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; ARLET, G.; TORRES, C. *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 886–897, 2012.

- RUMI, M. V.; MAS, J.; ELENA, A.; CERDEIRA, L.; MUÑOZ, M. E.; LINCOPAN, N.; GENTILINI, É. R.; DI CONZA, J.; GUTKIND, G. Co-occurrence of clinically relevant β -lactamases and MCR-1 encoding genes in *Escherichia coli* from companion animals in Argentina. **Veterinary Microbiology**, v. 230, p. 228–234, 2019.
- SAIDENBERG, A.; STEGGER, M.; PRICE, L. B.; JOHANNESSEN, T. B.; AZIZ, M.; CUNHA, M.; MORENO, A. M.; KNÖBL, T. *mcr*-positive *Escherichia coli* ST131-H22 from poultry in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 8, p. 1951–1954, 2020.
- SALAH, F. D.; SOUBEIGA, S. T.; OUATTARA, A. K.; SADJI, A. Y.; METUOR-DABIRE, A.; OBIRI-YEBOAH, D.; BANLA-KERE, A.; KAROU, S.; SIMPORE, J. Distribution of quinolone resistance gene (*qnr*) in *ESBL*-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lomé, Togo. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 104, 2019.
- SALVERDA, M. L.; DE VISSER, J. A.; BARLOW, M. Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 6, p. 1015–1036, 2010.
- SAMREEN, A. I.; MALAK, H. A.; ABULREESH, H. H. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 27, p. 101–111, 2021.
- SAN MILLAN, A.; PEÑA-MILLER, R.; TOLL-RIERA, M.; HALBERT, Z. V.; MCLEAN, A. R.; COOPER, B. S.; MACLEAN, R. C. Positive selection and compensatory adaptation interact to stabilize non-transmissible plasmids. **Nature Communications**, v. 5, n. 5208, 2014.
- SAROWSKA, J.; FUTOMA-KOLOCH, B.; JAMA-KMIECIK, A.; FREJ-MADRZAK, M.; KSIAZCZYK, M.; BUGLA-PLOSKONSKA, G.; CHOROSZY-KROL, I. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. **Gut Pathogens**, v. 11, n. 10, 2019.
- SATO, T.; SHIRAIISHI, T.; HIYAMA, Y.; HONDA, H.; SHINAGAWA, M.; USUI, M.; KURONUMA, K.; MASUMORI, N.; TAKAHASHI, S.; TAMURA, Y.; YOKOTA, S. I. Contribution of novel amino acid alterations in PmrA or PmrB to colistin resistance in *mcr*-negative *Escherichia coli* clinical isolates, including major multidrug-resistant lineages O25b:H4-ST131-H30Rx and non-x. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 9, p. e00864-18, 2018.
- SAVIN, M.; BIERBAUM, G.; HAMMERL, J. A.; HEINEMANN, C.; PARCINA, M.; SIB, E.; VOIGT, A.; KREYENSCHMIDT, J. Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. **The Science of the Total Environment**, v. 727, n. 138788, 2020.
- SCAVUZZI, A.; BELTRÃO, E.; FIRMO, E. F.; DE OLIVEIRA, É. M.; BESERRA, F. G.; LOPES, A. Emergence of *blavim-2*, *blanDM-1*, *blaIMP-7* and *blages-1* in *bla*_{KPC-2}-harbouring *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 19, p. 181–182, 2019.

SCHAUFLE, K.; SEMMLER, T.; WIELER, L. H.; TROTT, D. J.; PITOUT, J.; PEIRANO, G.; BONNEDAH, J.; DOLEJSKA, M.; LITERAK, I.; FUCHS, S.; AHMED, N.; GROBBEL, M.; TORRES, C.; MCNALLY, A.; PICKARD, D.; EWERS, C.; CROUCHER, N. J.; CORANDER, J.; GUENTHER, S. Genomic and functional analysis of emerging virulent and multidrug-Resistant *Escherichia coli* lineage sequence type 648. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 6, p. e00243-19, 2019.

SCHAUFLE, K.; SEMMLER, T.; WIELER, L. H.; WÖHRMANN, M.; BADDAM, R.; AHMED, N.; MÜLLER, K.; KOLA, A.; FRUTH, A.; EWERS, C.; GUENTHER, S. Clonal spread and interspecies transmission of clinically relevant ESBL-producing *Escherichia coli* of ST410-another successful pandemic clone? **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 1, p. fiv155, 2016.

SCHMIDT, H.; KNOP, C.; FRANKE, S.; ALEKSIC, S.; HEESEMANN, J.; KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p.:701-705, 1995.

SCHNEIDER, T.; SAHL, H. G. An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 2-3, p. 161–169, 2010.

SCHRÖDER, G.; LANKA, E. The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. **Plasmid**, v. 54, n. 1, p. 1–25, 2005.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 5, p. 519–542, 2004.

SIGUIER, P.; GOURBEYRE, E.; CHANDLER, M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 5, p. 865–891, 2014.

SELLERA, F. P.; FERNANDES, M. R.; SARTORI, L.; CARVALHO, M. P.; ESPOSITO, F.; NASCIMENTO, C. L.; DUTRA, G. H.; MAMIZUKA, E. M.; PÉREZ-CHAPARRO, P. J.; MCCULLOCH, J. A.; LINCOPAN, N. *Escherichia coli* carrying IncX4 plasmid-mediated *mcr-1* and *bla*_{CTX-M} genes in infected migratory Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. 1255–1256, 2017.

SELLERA, F. P., FERNANDES, M. R., MOURA, Q., CARVALHO, M., & LINCOPAN, N. Extended-spectrum-β-lactamase (CTX-M)-producing *Escherichia coli* in wild fishes from a polluted area in the Atlantic Coast of South America. **Marine Pollution Bulletin**, v. 135, p. 183–186, 2018.

SELLERA, F. P.; LINCOPAN, N. Zooanthroponotic transmission of high-risk multidrug-resistant pathogens: A neglected public health issue. **Journal of Infection and Public Health**, v. 12, n. 2, p. 294–295, 2019.

- SELLERA, F. P.; FERNANDES, M. R.; RUIZ, R.; FALLEIROS, A.; RODRIGUES, F. P.; CERDEIRA, L.; LINCOPAN, N. Identification of KPC-2-producing *Escherichia coli* in a companion animal: a new challenge for veterinary clinicians. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2259–2261, 2018.
- SHAIKH, S.; RIZVI, S. M.; ANIS, R.; SHAKIL, S. Prevalence of CTX-M resistance marker and integrons among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates of clinical origin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, p. 419–427, 2016.
- SHEU, C. C.; CHANG, Y. T.; LIN, S. Y.; CHEN, Y. H.; HSUEH, P. R. Infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: An update on therapeutic options. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 80, 2019.
- SHIN, S. W.; SHIN, M. K.; JUNG, M.; BELAYNEHE, K. M.; YOO, H. S. Prevalence of antimicrobial resistance and transfer of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolates from beef cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 16, p. 5560–5566, 2015.
- SHULMAN, S. T.; FRIEDMANN, H. C.; SIMS, R. H. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician?. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 8, p. 1025–1029, 2007.
- SIEVERS, F., & HIGGINS, D. G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 135–145, 2018.
- SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das β -lactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações no agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 2, p. 91–99, 2012.
- SILVER, L. L. Fosfomycin: Mechanism and Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 2, p. a025262, 2017.
- SIGUIER, P.; PEROCHON, J.; LESTRADE, L.; MAHILLON, J.; CHANDLER, M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. D32–D36, 2006.
- SINGH, N. S.; SINGHAL, N.; VIRDI, J. S. Genetic Environment of *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CMY-42} and Characterization of integrons of *Escherichia coli* isolated from an Indian urban aquatic environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 382, 2018.
- SKÖLD, O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. **Veterinary Research**, v. 32, n. 3-4, p. 261–273, 2001.
- SKÖLD, O. Sulfonamides and trimethoprim. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2010.
- SMILLIE, C.; GARCILLÁN-BARCIA, M. P.; FRANCIÀ, M. V.; ROCHA, E. P.; DE LA CRUZ, F. Mobility of plasmids. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 434–452, 2010.

SNEHAA, K.; SINGH, T.; DAR, S. A.; HAQUE, S.; RAMACHANDRAN, V. G.; SAHA, R.; SHAH, D.; DAS, S. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in children with acute diarrhoea: Changing trend in East Delhi. **Biomedical Journal**, v. 44, n. 4, p. 471–478, 2021.

SOJO-DORADO, J.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, I.; ROSSO-FERNANDEZ, C.; MORALES, I. M.; PALACIOS-BAENA, Z. R.; HERNÁNDEZ-TORRES, A.; MERINO DE LUCAS, E.; ESCOLÀ-VERGÉ, L.; BERECIARTUA, E.; GARCÍA-VÁZQUEZ, E.; PINTADO, V.; BOIX-PALOP, L.; NATERA-KINDELÁN, C.; SORLÍ, L.; BORRELL, N.; GINER-ONCINA, L.; AMADOR-PROUS, C.; SHAW, E.; JOVER-SAENZ, A.; MOLINA, J.; ... REIPI-GEIRAS-FOREST GROUP. Effectiveness of fosfomicin for the treatment of multidrug-resistant *Escherichia coli* bacteremic urinary tract infections: A randomized clinical trial. **JAMA Network Open**, v. 5, n. 1, p. e2137277, 2022.

SULLIVAN, M. J.; PETTY, N. K.; BEATSON, S. A. Easyfig: a genome comparison visualizer. **Bioinformatics**, v. 27, n. 7, p. 1009–1010, 2011.

SUN, J.; DENG, H.; LI, L.; CHEN, M. Y.; FANG, L. X.; YANG, Q. E.; LIU, Y. H.; LIAO, X. P. Complete nucleotide sequence of *cfr*-carrying IncX4 plasmid pSD11 from *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 738–741, 2015.

SUN, J.; FANG, L-X.; WU, Z.; DENG, H.; YANG, R-S.; LI, X-P.; LI, S-M.; LIAO, X-P.; FENG, Y.; LIU, Y-H. Genetic analysis of the IncX4 plasmids: Implications for a unique pattern in the *mcr-1* acquisition. **Scientific Reports**, v. 7, p. 424, 2017.

TACCONELLI, E.; CARRARA, E.; SAVOLDI, A.; HARBARTH, S.; MENDELSON, M.; MONNET, D. L.; PULCINI, C.; KAHLMETER, G.; KLUYTMANS, J.; CARMELI, Y.; OUELLETTE, M.; OUTTERSON, K.; PATEL, J.; CAVALERI, M.; COX, E. M.; HOUCHEMS, C. R.; GRAYSON, M. L.; HANSEN, P.; SINGH, N.; THEURETZBACHER, U.; MAGRINI, N.; WHO PATHOGENS PRIORITY LIST WORKING GROUP. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.

TIEDJE, J. M.; WANG, F.; MANAIA, C. M.; VIRTA, M.; SHENG, H.; MA, L.; ZHANG, T.; TOPP, E. Antibiotic resistance genes in the human-impacted environment: A One Health perspective. **Pedosphere**, v. 29, n. 3, p. 273–282, 2019.

TOLENTINO, F. M.; BUENO, M.; FRANCISCO, G. R.; BARCELOS, D.; LOBO, S. M.; TOMAZ, F.; DA SILVA, N. S.; DE ANDRADE, L. N.; CASELLA, T.; DARINI, A.; POLOTTO, M.; DE OLIVEIRA GARCIA, D.; NOGUEIRA, M. Endemicity of the high-Risk clone *Klebsiella pneumoniae* ST340 coproducing QnrB, CTX-M-15, and KPC-2 in a Brazilian Hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 4, p. 528–537, 2019.

TOOKE, C. L.; HINCHLIFFE, P.; BRAGGINTON, E. C.; COLENSO, C. K.; HIRVONEN, V.; TAKEBAYASHI, Y.; SPENCER, J. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p. 3472–3500, 2019.

TOUATI, M.; HADJADJ, L.; BERRAZEG, M.; BARON, S. A.; ROLAIN, J. M. Emergence of *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and *mcr-3* genes in North West Algerian farmlands. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 21, p. 132–137, 2020.

TYSON, G. H.; LI, C.; HSU, C. H.; BODEIS-JONES, S.; MCDERMOTT, P. F. Diverse fluoroquinolone resistance plasmids from retail meat *E. coli* in the United States. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2826, 2019.

URŠKA, R.; DARJA, D.; MOJCA, C.; SONJA, Š. T. Hospital wastewater effluent: hot spot for antibiotic resistant bacteria. **Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development**, v. 10, n. 2, p. 171–178, 2020.

VAN DUIN, D.; PATERSON, D. L. Multidrug-resistant bacteria in the community: Trends and lessons learned. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 377–390, 2016.

VANDECRAEN, J.; CHANDLER, M.; AERTSEN, A.; VAN HOUDT, R. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. **Critical reviews in Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 709–730, 2017.

VILA, J.; SÁEZ-LÓPEZ, E.; JOHNSON, J. R.; RÖMLING, U.; DOBRINDT, U.; CANTÓN, R.; GISKE, C. G.; NAAS, T.; CARATTOLI, A.; MARTÍNEZ-MEDINA, M.; BOSCH, J.; RETAMAR, P.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; BAQUERO, F.; SOTO, S. M. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 4, p. 437–463, 2016.

WALLDEN, K.; RIVERA-CALZADA, A.; WAKSMAN, G. Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 1203–1212, 2010.

WANG, C. H.; SIU, L. K.; CHANG, F. Y.; TSAI, Y. K.; LIN, Y. T.; CHIU, S. K.; HUANG, L. Y.; LIN, J. C. A novel deletion mutation in *pmrB* contributes to concurrent colistin resistance in carbapenem-resistant *Escherichia coli* sequence type 405 of clinical origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. e00220-20, 2020.

WANG, R.; VAN DORP, L.; SHAW, L. P.; BRADLEY, P.; WANG, Q.; WANG, X.; JIN, L.; ZHANG, Q.; LIU, Y.; RIEUX, A.; DORAI-SCHNEIDERS, T.; WEINERT, L. A.; IQBAL, Z.; DIDELOT, X.; WANG, H.; BALLOUX, F. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1179, 2018.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.

WHITE, P. A.; MCIVER, C. J.; RAWLINSON, W. D. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2658–2661, 2001.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance**. WHO. 2021. Acessado em 21 de março de 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance>.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global action plan on antimicrobial resistance**. WHO. 2015. Acessado em 23 de março de 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Highest priority critically important antimicrobials**. WHO. 2019a. Acessado em 22 de março de 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528>.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ten threats to global health in 2019**. WHO. 2019b. Acessado em 21 de março de 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. WHO. 2017. Acessado em 21 de março de 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

WILLIAMS, L. E.; DETTER, C.; BARRY, K.; LAPIDUS, A.; SUMMERS, A. O. Facile recovery of individual high-molecular-weight, low-copy-number natural plasmids for genomic sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4899–4906, 2006.

WINK, P. L.; MARTINS, A. S.; VOLPATO, F.; ZAVASCKI, A. P.; BARTH, A. L. Increased frequency of *bla*_{NDM} in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 299–301, 2021.

WIRTH, T.; FALUSH, D.; LAN, R.; COLLES, F.; MENSA, P.; WIELER, L. H.; KARCH, H.; REEVES, P. R.; MAIDEN, M. C.; OCHMAN, H.; ACHTMAN, M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1136–1151, 2006.

WISE, M. G.; ESTABROOK, M. A.; SAHM, D. F.; STONE, G. G.; KAZMIERCZAK, K. M. Prevalence of *mcr*-type genes among colistin-resistant *Enterobacteriaceae* collected in 2014–2016 as part of the INFORM global surveillance program. **PloS One**, v. 13, n. 4, p. e0195281, 2018.

WOERTHER, P. L.; BURDET, C.; CHACHATY, E.; ANDREMONT, A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 744–758, 2013.

WYRES, K. L.; HOLT, K. E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 131–139, 2018.

XAVIER, B. B.; LAMMENS, C.; RUHAL, R.; KUMAR-SINGH, S.; BUTAYE, P.; GOOSSENS, H.; MALHOTRA-KUMAR, S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. **Euro Surveillance**, v. 21, n. 27, 2016.

YAMAJI, R.; FRIEDMAN, C. R.; RUBIN, J.; SUH, J.; THYS, E.; MCDERMOTT, P.; HUNG-FAN, M.; RILEY, L. W. A population-based surveillance study of shared genotypes of *Escherichia coli* isolates from retail meat and suspected cases of urinary tract infections. **mSphere**, v. 3, n. 4, p. e00179-18, 2018.

- YANG, Y. Q.; LI, Y. X.; LEI, C. W.; ZHANG, A. Y.; WANG, H. N. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1791–1795, 2018.
- YANG, F.; SHEN, C.; ZHENG, X.; LIU, Y.; EL-SAYED AHMED, M.; ZHAO, Z.; LIAO, K.; SHI, Y.; GUO, X.; ZHONG, R.; XU, Z.; TIAN, G. B. Plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from market retail fruits in Guangzhou, China. **Infection and Drug Resistance**, 12, 385–389, 2019.
- YANG, Q. E.; SUN, J.; LI, L.; DENG, H.; LIU, B. T.; FANG, L. X.; LIAO, X. P.; LIU, Y. H. IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains from animals in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 964, 2015.
- YI, L.; DURAND, R.; GRENIER, F.; YANG, J.; YU, K.; BURRUS, V.; LIU, J. H. PixR, a Novel activator of conjugative transfer of IncX4 resistance plasmids, mitigates the fitness cost of *mcr-1* carriage in *Escherichia coli*. **mBio**, v. 13, n. 1, p. e0320921, 2022.
- YIN, W.; LI, H.; SHEN, Y.; LIU, Z.; WANG, S.; SHEN, Z.; ZHANG, R.; WALSH, T. R.; SHEN, J.; WANG, Y. Erratum for Yin et al., "Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*". **mBio**, v. 8, n. 4, p. e01166-17, 2017.
- YU, D.; BANTING, G.; NEUMANN, N. F. A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 553–571, 2021.
- YU, Y.; ZHOU, Y.; WANG, Z.; TORRES, O. L.; GUO, R.; CHEN, J. Investigation of the removal mechanism of antibiotic ceftazidime by green algae and subsequent microbial impact assessment. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4168, 2017.
- ZAMPARETTE, C. P.; SCHORNER, M.; CAMPOS, E.; MOURA, Q.; CERDEIRA, L.; TARTARI, D. C.; SEREIA, A.; CUNHA, P.; FONTANA, H.; DE OLIVEIRA, L.; GRISARD, E. C.; LINCOPAN, N.; BAZZO, M. L.; SINCERO, T. IncX4 plasmid-mediated *mcr-1.1* in polymyxin-resistant *Escherichia coli* from outpatients in Santa Catarina, Southern Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 26, n. 11, p. 1326–1333, 2020.
- ZAKARIA, A. S.; EDWARD, E. A.; MOHAMED, N. M. Genomic insights into a colistin-resistant uropathogenic *Escherichia coli* strain of O23:H4-ST641 lineage harboring *mcr-1.1* on a conjugative IncHI2 plasmid from Egypt. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 799, 2021.
- ZANKARI, E.; ALLESØE, R.; JOENSEN, K. G.; CAVACO, L. M.; LUND, O.; AARESTRUP, F. M. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 10, p. 2764–2768, 2020.
- ZHANG, S.; HUANG, J.; ZHAO, Z.; CAO, Y.; LI, B. Hospital wastewater as a reservoir for antibiotic resistance genes: A meta-analysis. **Frontiers in Public Health**, v. 8, p. 574968, 2020.

ZHAO, Y.; YANG, Q. E.; ZHOU, X.; WANG, F. H.; MUURINEN, J.; VIRTA, M. P.; BRANDT, K. K.; ZHU, Y. G. Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: Status and solutions. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 19, p. 2159–2196, 2021.

ZHENG, B.; HUANG, C.; XU, H.; GUO, L.; ZHANG, J.; WANG, X.; JIANG, X.; YU, X.; JIN, L.; LI, X.; FENG, Y.; XIAO, Y.; LI, L. Occurrence and genomic characterization of ESBL-producing, MCR-1-harboring *Escherichia coli* in farming soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2510, 2017.

ZHENG, W.; YUE, M.; ZHANG, J.; RUAN, Z. Coexistence of two *bla*_{CTX-M-14} genes in a *bla*_{NDM-5}-carrying multidrug-resistant *Escherichia coli* strain recovered from a bloodstream infection in China. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 26, p. 11–14, 2021.

ZHOU, Z.; ALIKHAN, N. F.; MOHAMED, K.; FAN, Y.; AGAMA STUDY GROUP; ACHTMAN, M. The EnteroBase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia core* genomic diversity. **Genome Research**, v. 30, n. 1, p. 138–152, 2020.

ZHUGE, X.; ZHOU, Z.; JIANG, M.; WANG, Z.; SUN, Y.; TANG, F.; XUE, F.; REN, J.; DAI, J. Chicken-source *Escherichia coli* within phylogroup F shares virulence genotypes and is closely related to extraintestinal pathogenic *E. coli* causing human infections. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, p. 880–895, 2021.

ZHU, Y. G.; ZHAO, Y.; ZHU, D.; GILLINGS, M.; PENUELAS, J.; OK, Y. S.; CAPON, A.; BANWART, S. Soil biota, antimicrobial resistance and planetary health. **Environment International**, v. 131, p. 105059, 2019.

ZONG, Z.; PARTRIDGE, S. R.; IREDELL, J. R. ISEcpI-mediated transposition and homologous recombination can explain the context of *bla*_(CTX-M-62) linked to *qnrB2*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 3039–3042, 2010.

APÊNDICE

Apêndice A. Lista de artigos publicados com os dados apresentados neste estudo

1. **FURLAN, J. P. R.**; STEHLING, E. G.; SAVAZZI, E. A.; PEIXE, L.; NOVAIS, A. High occurrence of colistin- and multidrug-resistant strains carrying *mcr-1* or an underestimated *mcr-1.26* allelic variant along a large Brazilian river. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 30, p. 127–129, 2022.
2. **FURLAN, J. P. R.**; RAMOS, M. S.; ROSA, R. S.; SAVAZZI, E. A.; STEHLING, E. G. Occurrence and genetic characteristics of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates co-harboring antimicrobial resistance genes and metal tolerance genes in aquatic ecosystems. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 244, p. 114003, 2022.
3. **FURLAN, J. P. R.**; GALLO, I. F. L.; STEHLING, E. G. Genomic characterization of multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from grain culture soils. *Pedosphere*, v. 32, n. 3, p. 495–502, 2022.
4. **FURLAN, J. P. R.**; LOPES, R.; RAMOS, M. S.; SANTOS, L. D. R.; ROSA, R. S.; SAVAZZI, E. A.; STEHLING, E. G. Colistin-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli* ST1775-H137 co-harboring *bla_{CTX-M-2}* and *bla_{CMY-2}* recovered from an urban stream. *Infection Genetics and Evolution*, v. 96, p. 105156, 2021.
5. **FURLAN, J.P.R.**; STEHLING, E. G. Multiple sequence types, virulence determinants and antimicrobial resistance genes in multidrug- and colistin-resistant *Escherichia coli* from agricultural and non-agricultural soils. *Environmental Pollution*, v. 288, p. 117804, 2021.
6. **FURLAN, J.P.R.**; SAVAZZI, E. A.; STEHLING, E. G. Widespread high-risk clones of multidrug-resistant ESBL-producing *Escherichia coli* B2-ST131 and F-ST648 in public aquatic environments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 56, p. 106040, 2020.
7. **FURLAN, J.P.R.**; FERREIRA, M. E. S.; STEHLING, E. G. Genetic diversity of multidrug-resistant CMY-producing *Escherichia coli* from feces and soil in a small-scale pig farm. *Microbial Drug Resistance*, v. 26, p. 1365–1371, 2020.
8. **FURLAN, J.P.R.**, STEHLING, E. G. Draft genome sequence of a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST189 carrying several acquired antimicrobial resistance genes obtained from Brazilian soil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 17, p. 321–322, 2019.
9. **FURLAN, J.P.R.**, STEHLING, E. G. Draft genome sequence of a multidrug-resistant *tetA/IncF*- harbouring *Escherichia coli* ST906 obtained from a soil cultivated with jaboticaba (*Plinia cauliflora*). *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 16, p. 181–182, 2019.

