

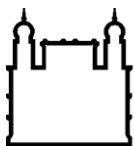
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

**Dípteros Muscoides como Veiculadores de Bactérias Resistentes
aos Antimicrobianos**

ISABEL NOGUEIRA CARRAMASCHI

Rio de Janeiro
Setembro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

ISABEL NOGUEIRA CARRAMASCHI

DÍPTEROS MUSCOIDES COMO VEICULADORES DE BACTÉRIAS RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biodiversidade e Saúde

Orientador (es): Prof. Dra. Viviane Zahner
Prof. Dra. Karyne Rangel

RIO DE JANEIRO
Setembro de 2019

Nogueira Carramaschi, Isabel .

Dípteros Muscoides como Veiculadores de Bactérias Resistentes aos Antimicrobianos / Isabel Nogueira Carramaschi. - Rio de Janeiro, 2019.
184 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2019.

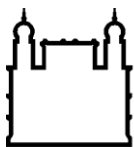
Orientadora: Viviane Zahner.

Co-orientadora: Karyne Rangel.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Dípteros Muscoides. 2. Antimicrobianos . 3. Genes de Resistência aos Antimicrobianos . I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manginhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

AUTOR: ISABEL NOGUEIRA CARRAMASCHI

DÍPTEROS MUSCOIDES COMO VEICULADORES DE BACTÉRIAS RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Viviane Zahner
Prof. Dra. Karyne Rangel**

Aprovada em: 30/09/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Ana Paula D'Allincourt Carvalho Assef (Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz)

Prof. Dra. Claudia Rezende Vieira de Mendonça Souza (Universidade Federal Fluminense)

Prof. Dr. José Mario D'Almeida (Universidade Federal Fluminense)

Prof. Dra. Teca Galvão (Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz)

Prof. Dra. Letícia Miranda Lery Santos (Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz)

Rio de Janeiro, 30 Setembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Therezinha Barros Nogueira e Victor Luiz Neves Carramaschi pelo amor, carinho, apoio, conselhos, ajuda e atenção. Agradeço ao meu irmão Victor Carramaschi, pelos momentos de preocupação de irmão mais velho. Agradeço ao meu namorado Pedro Henrique Lannes, e a sua família, pelo companheirismo e incentivo. Sem o apoio e ajuda deles, não teria realizado este trabalho.

Agradeço à minha orientadora, professora e amiga Dra. Viviane Zahner pela orientação, paciência ao longo destes anos, além do incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho. Agradeço por todos seus ensinamentos e conselhos. À minha co-orientadora, Karyne Rangel, por toda ajuda e apoio durante a realização deste trabalho. Agradeço à Dra Maria Helena Villas Boas por ter permitido a utilização de equipamentos e reagentes no Laboratório de Saneantes do INCQS, Fiocruz, obrigada também por ter aceitado ser a revisora deste trabalho. À professora e chefe do Laboratório de Entomologia Médica e Forense, Dra. Margareth Queiroz, pelos conselhos e incentivos. Agradeço à Marina Braga, pesquisadora do laboratório, por ter-me ajudado em vários momentos.

Agradeço às estagiárias Nahara Leite, Jéssica Albuquerque, Sophia Manhães e Larissa, por terem trabalhado diretamente e se empenhado neste projeto. Muito obrigada!

Agradeço aos meus amigos de laboratório que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho: Lorrane, Andreia, Jonathan, Isadora, Thiany, Lucas, Raquel, Alexandre, Paloma, Rodrigo, Luiz e Carlos por todos os momentos e conversas compartilhadas no laboratório.

Agradeço ao Vagner Lopes e Otávio Padula, pelo livre acesso ao laboratório de Bioprodutos em Farmanguinhos e por terem possibilitado o uso de diversos equipamentos. Agradeço à Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS – FIOCRUZ, IOC. Agradeço à Dra. Polyana Pereira, da plataforma de sequenciamento da Unidade Multidisciplinar de Genômica Darcy Fontoura de Almeida, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Agradeço ao Vitor

Baía e à equipe do Laboratório de Virologia Molecular (UFRJ), pela realização do sequenciamento genômico e ajuda na interpretação dos dados.

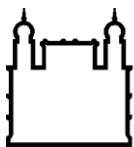
Agradeço à equipe do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica, especialmente à Dra. Laís Lisboa, Dra. Larissa Botelho e à pesquisadora Dra. Renata Picão por terem me permitido realizar os ensaios de conjugação e a identificação bacteriana pelo MALDITOF MS. Agradeço à Dra. Ana Paula Assef e Dra. Melise Chaves do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do IOC, por todo o auxílio com a técnica de PFGE e pela ajuda em bioinformática. Agradeço ao Msc. Marcos Tavares da ENSP, pela ajuda com estatística.

Agradeço ao Dr. Eduardo Ribeiro Castro, chefe da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do Hospital Municipal na Zona Norte, por nos ter permitido realizar as coletas, por ter cedido os isolados de origem clínica, além de nos ter fornecido os dados sobre infecção do hospital. Muito obrigada.

Agradeço aos membros da banca por terem aceitado o convite de participar da banca de avaliação deste trabalho. Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, especialmente à secretária Luciana Mara e ao coordenador Cleber Galvão. Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa e ao Instituto Oswaldo Cruz.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância” (John F. Kennedy).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DÍPTEROS MUSCOIDES COMO VEICULADORES DE BACTÉRIAS RESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS

RESUMO

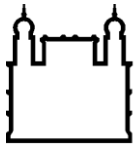
TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Isabel Nogueira Carramaschi

Dípteros muscoides desempenham papel significativo na disseminação de microrganismos. O principal objetivo deste estudo foi isolar bactérias resistentes aos antimicrobianos, a partir de dípteros muscoides, coletados em 5 pontos diferentes: no entorno e no lixo de um hospital municipal, na Zona Norte do Rio de Janeiro, assim como na Fiocruz e Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro. As moscas foram capturadas utilizando armadilhas de garrafa *pet* contendo isca atrativa, levadas ao Laboratório de Entomologia Médica e Forense, IOC/Fiocruz, e identificadas utilizando chaves dicotômicas. Após esse procedimento foram maceradas em salina 0,85% estéril. Este extrato foi diluído e plaqueado em diferentes meios de cultura, contendo ou não antibiótico (ceftriaxona e polimixina, a 1 mg/L e 8 mg/L, respectivamente). Foram realizados o isolamento, a purificação das colônias e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) por disco difusão, utilizando os antibióticos cefepime, ceftazidima, cefoxitina, meropenem, gentamicina, tetraciclina e ciprofloxacina, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazol (Sensifar). Foram realizadas 16 coletas, e um total de 197 isolados bacterianos foram obtidos a partir dos 117 dípteros muscoides. Os isolados foram identificados por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e por MALDITOF-MS (Brucker). Do total, 46 isolados apresentaram perfil de não sensibilidade (perfil resistente e intermediário) a pelo menos dois antimicrobianos diferentes, enquanto dez isolados foram classificados como multirresistentes. Análise de *cluster* feita pelo programa Statistica revelou diferença significativa entre o Ponto 5 e os demais pontos, quanto ao número de isolados não sensíveis. Setenta e três amostras foram submetidas para detecção de genes de resistência aos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e colistina, através de PCR. Destas, apenas sete foram positivas. Três cepas de importância foram encontradas: *Raoultella ornithinolytica* positiva para o gene bla_{KPC-2} , e para os principais elementos do transposon Tn4401, além dos grupos de incompatibilidade plasmideal IncK; *Escherichia coli* positiva para o gene bla_{NDM-1} , Inc A/C, a partir da qual foram obtidas transconjugantes utilizando *E. coli* J53 como receptora e *K. pneumoniae* positiva para bla_{NDM-1} e grupo IncY. Todas as três cepas foram $aac(6')-Ib$ e *Int1* (integron de classe 1)

positivas. O sequenciamento total da cepa 23 (*K. pneumoniae* ST 3997 *bla*_{NDM-1} positiva) revelou a presença de diversos genes de resistências. A não hibridização com sonda específica e não obtenção de transconjugantes sugerem a presença cromossomal de *bla*_{NDM-1}. Através da técnica de PFGE, analisamos o perfil genético dos isolados de origem clínica (urinocultura e hemocultura) e os isolados obtidos a partir de mosca, pertencentes à espécie *K. pneumoniae*, porém não foi detectado o mesmo clone nos dois ambientes. Nesse sentido, destaca-se a importância das moscas na disseminação (e reservatórios) de bactérias resistentes aos antimicrobianos.

Palavras chave: Dípteros Muscoides, Antimicrobianos e Genes de resistência aos Antimicrobianos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MUSCOID DIPTERS AS VEHICLERS OF ANTIMICROBIAN RESISTANT BACTERIA

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Isabel Nogueira Carramaschi

Muscoid dipters play a significant role in the spread of microorganisms. The main objective of this study was to isolate antimicrobial-resistant bacteria from Diptera collected nearby and waste-free of a municipal hospital in the North Zone of Rio de Janeiro, as well as in Fiocruz and Quinta da Boa Vista in Rio de Janeiro. The flies were caught using bottle traps containing attractive bait, taken to the Laboratório de Entomologia Médica e Forense, IOC / Fiocruz, and identified using dichotomous keys. The flies were macerated in 0.85% saline. This extract was diluted and coated in different culture media, including or not antibiotic (ceftriaxone and polymyxin, 1mg/L and 8mg/L, respectively). After isolation and purification of the colonies, antimicrobial susceptibility testing (TSA) was performed with antibiotics cefepime, ceftazidime, ceftazidime, ceftazidime, ceftazidime, meropenem, gentamicin, tetracycline, ciprofloxacin, chloramphenicol and trimethoprim-sulfamethoxazole. 16 collections were done, and a total of 197 bacterial strains were obtained from 117 dipterous muscoids. Identification were performed by partial sequencing of the 16S rRNA gene and by MALDI TOF MS (Brucker). In total, 46 strains were identified as non-sensitiv for less than two different antimicrobials, while 10 were classified as multidrug resistant (MDR). Cluster analysis by the Statistics program revealed significant difference between Point 5 and the other collecting points. 73 strains were submitted for detection of β -lactam, aminoglycoside and colistin resistance genes by PCR. Of these, only 7 were positive. Three types of importance were found: *Raoultella ornithinolytica* positive for *bla*_{KPC-2}, and for the major elements of the Tn4401 transposon, in addition to IncK plasmid incompatibility group; *Escherichia coli* positive for the *bla*_{NDM-1} gene, Inc A/C, from which transconjugants were obtained using *E. coli* J53 as receptors; and *K. pneumoniae* *bla*_{NDM-1} and IncY positive. All three were positive to *aac*(6')-Ib and *INT1* (class 1 integration). Whole genome sequencing of strain 23 (*K. pneumoniae* ST 3997 *bla*_{NDM-1} positive) revealed the presence of several resistance genes. Non-hybridization with specific probe and no transconjugants suggests the chromosomal presence of *bla*_{NDM-1}. Using the PFGE technique, we analyzed the genetic profile of clinical strains (urine culture and blood culture) and environmental strains (isolated from flies), to the species *K. pneumoniae*, but the samed clone was not detected in

both environments. In this sense, we highlight the importance of flies in the dissemination (and reservoirs) of antimicrobial resistant bacteria.

ÍNDICE

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Antimicrobianos	24
1.1.1 Sulfonamidas.....	26
1.1.2 Beta-lactâmicos.....	27
1.1.2.1 Inibidores de Beta-lactamase.....	28
1.1.3 Bacitracina.....	29
1.1.4 Aminoglicosídeos.....	30
1.1.5 Cloranfenicol.....	30
1.1.6 Tetraciclinas.....	31
1.1.7 Quinolonas.....	31
1.1.8 Glicopeptídeos.....	32
1.1.9 Polimixinas.....	32
1.2 Antimicrobianos críticos para a medicina humana.....	33
1.3 Resistência aos antimicrobianos.....	34
1.3.1 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos.....	36
1.3.1.1 Resistência intrínseca.....	37
1.3.1.2 Modificações da molécula antimicrobiana.....	39
1.3.1.2.1 Modificação enzimática do antimicrobiano.....	40
1.3.1.2.2 Hidrólise do antimicrobiano.....	41
1.3.1.3 Diminuição da permeabilidade.....	46
1.3.1.4 Bombas de Efluxo.....	48
1.3.1.5 Modificação do Sítio Alvo.....	50
1.3.1.5.1 Proteção do Alvo.....	50
1.3.2 A resistência em bactérias Gram-negativas.....	52
1.4 A Origem dos genes de resistência aos antimicrobianos e sua presença no ambiente extra-hospitalar.....	55
1.5 A relação entre virulência e resistência em bactérias.....	59

1.6	Dípteros muscoides sinantrópicos como veiculadores de bactérias resistentes.....	60
1.7	Mecanismos moleculares de disseminação dos genes de resistência.....	62
1.8	Métodos de identificação bacteriana.....	67
2	OBJETIVOS	70
2.1	Objetivo Geral	70
2.2	Objetivos Específicos.....	70
3	MATERIAL E MÉTODOS	72
3.1	Método de coleta dos dípteros muscoides, pontos de coleta, triagem e identificação.....	72
3.2	Isolamento bacteriano.....	77
3.3	Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	78
3.3.1	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) por disco difusão.....	79
3.3.2	Determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos de acordo com o sistema automatizado.....	79
3.3.3	Análise de perfil de multirresistência.....	79
3.4	Teste de inativação de carbapenema modificado (mCIM).....	80
3.5	Teste de inativação do carbapenema com EDTA (eCIM)	80
3.6	Identificação bacteriana.....	81
3.6.1	MALDITOF-MS.....	81
3.6.2	Extração de DNA por Kit (Promega).....	83
3.6.3	Identificação bacteriana por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	84
3.7	Detecção molecular dos genes de resistência.....	85
3.8	Detecção molecular das regiões flancoadoras dos genes codificadores de carbapenemases.....	88
3.9	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	89

3.10	Tipagem molecular através de <i>Multi Locus Sequence Typing</i> (MLST).....	91
3.11	Análise plasmideal.....	93
3.11.1	Determinação do grupo de incompatibilidade plasmideal.....	93
3.11.2	Extração plasmideal pelo método de Kadu e Liu (1981).....	94
3.11.3	Transferência de DNA para membranas de Nylon.....	95
3.11.4	Hibridização com sondas complementares aos genes codificadores de carbapenemases (<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>).....	95
3.12	Ensaio de Conjugação bacteriana.....	97
3.13	Sequenciamento Genômico.....	98
3.13.1	Sequenciamento <i>Whole Genome Shotgun</i> (WGS).....	98
3.13.2	Montagem e Anotação dos Genomas.....	99
3.14	Análises estatísticas.....	100
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
4.1	Coleta e identificação dos dípteros muscoides	101
4.2	Isolamento bacteriano, identificação bacteriana e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	105
4.2.1	Isolamento bacteriano.....	105
4.2.2	Identificação bacteriana e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	106
4.3	Análise de perfil de multirresistência.....	120
4.4	Detecção de genes de resistência por PCR e análise do perfil de sensibilidade das amostras de origem clínica.....	122
4.4.1	Cepa 71 – <i>R. ornithinolytica</i>	133
4.5	Cepas <i>bla_{NDM}</i> positivas.....	136
4.6	Análise dos genótipos de <i>Klebsiella</i> spp.....	142
4.7	Sequenciamento genômico da cepa 23 <i>K. pneumoniae</i> , isolada a partir de mosca, e determinação do seu <i>sequence type</i> (ST).....	146
5	CONCLUSÕES	154
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos beta-lactâmicos: penicilina (composto 1), cefalosporina de amplo espectro (composto 2), monobactâmico (composto 3) e carbapenemas (composto 4 ao 7). Adaptado de Three Decades of β -Lactamase Inhibitors, Sarah M. Drawz, Robert A. Bonomo. *Clinical Microbiology Reviews* Jan 2010, 23 (1) 160-201. **28**

Figura 2: Linha do tempo dos antimicrobianos, relacionando as datas aproximadas da introdução destes compostos, e a posterior seleção e disseminação de mecanismos de resistência. Abreviações: AmpC – cefalosporinases de classe C; ESBL – β -lactamases de espectro estendido; KPC- *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; MRSA – *Staphylococcus* resistente à metilicina; NDM-1 – Nova Delhi β -lactamase tipo 1; PRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à penicilina; VRE- *Enterococcus* resistente à vancomicina; VRSA- *Staphylococcus* resistente à vancomicina. Figura modificada de Molton e colaboradores (2013) (28). **35**

Figura 3: Ponto 1 de coleta - Caçamba de resíduos sólidos na Comunidade do Amorim. Fonte: Lorrane Andrade Pereira. **74**

Figura 4: Ponto 2 de coleta – Interior de um prédio de um Instituto da Fiocruz. **74**

Figura 5: Ponto 3, Quinta da Boa Vista. Foto retirada do site <https://oglobo.globo.com/rio/ibama-diz-que-rave-na-quinta-da-boja-vista-pode-matar-animais-do-zoo-20239552>. **75**

Figura 6: A: Ponto de Coleta 4 - Área aberta de destinação de resíduos sólidos (orgânico, comum e hospitalar) do hospital municipal secundário, Zona Norte do Rio de Janeiro. B: Área de acomodação de resíduo sólido comum, momentos antes da retirada dos resíduos. Fonte: Acervo pessoal. **75**

Figura 7: Local onde ocorre acúmulo de resíduo sólido doméstico, localizado no Ponto 5. Imagem de satélite retirada do Google Maps em 12 de agosto de 2019. **76**

Figura 8: Ponto 5 externo ao hospital (100 metros de distância), mostrando a coleta de dípteros muscoides e a armadilha feita de garrafa plástica. Fonte: acervo pessoal. **76**

Figura 9: Análise de *cluster* gerada pelo programa Statistica versão 7.0, considerando o número de isolados não sensíveis por ponto de coleta e por antimicrobiano testado, ponderando-se o número total de isolados por ponto. Foram consideradas apenas as cepas isoladas a partir de placas de AN, e não foram consideradas as resistências intrínsecas. **120**

Figura 10: Esquerda: Eletroforese em gel de agarose da extração plasmidial de cepa controle (*K. pneumoniae*) positiva para o gene *bla*_{KPC} e a cepa 71 *Raoultella*

ornithinolytica. Direita: Membrana após hibridização com sonda específica para o gene. Asterisco vermelho ressalta a marcação do gene *bla_{KPC}*. Poço 1 – DNA Molecular – weight marker III digoxigenin labeled (Merck), Poço 2 – cepa controle de *K. pneumoniae bla_{KPC}* positiva e Poço 3- Cepa 71 *R. ornithinolytica*. **121**

Figura 11: Esquerda: Eletroforese em gel de agarose da extração plasmideal de cepa controle (*K. pneumoniae* CCBH25645) positiva para o gene *bla_{NDM}* e as cepas 23 *K. pneumoniae* e 26 *E. coli*. Direita: Membrana após hibridização com sonda específica para o gene. Asterístico vermelho ressalta a marcação do gene *bla_{NDM}*. Poço 1 – DNA Molecular – weight marker III digoxigenin labeled (Merck), Poço 2 – cepa controle de *K. pneumoniae* CCBH 25645, Poços 3 e 5 - Cepa 23 *K. pneumoniae*, Poço 4 – Cepa 26 *E. coli* e Poços 6, 7 e 8 – Produto de PCR para o gene *bla_{NDM}* obtido das cepas 23, 26 e CCBH25645, respectivamente. **121**

Figura 12: Dendrograma gerado através do Programa Gel Compar, utilizando o coeficiente de DICE a partir do perfil obtido após eletroforese em campo pulsado, PFGE. **121**

Figura 13: Distribuição de categorias de subsistemas da cepa 23 *K. pneumoniae*, de acordo com a anotação feita pelo *Rapid Annotation using subsystem technology (RAST)* a partir do arquivo fastQ da montagem do genoma total. Cada cor do gráfico representa uma categoria de subsistema (grupo funcional de genes), e as características de cada grupo estão listadas no lado direito. **121**

Figura 14: Contexto genético hipotético do gene *bla_{NDM-1}* da cepa 23 isolada a partir de mosca, após montagem por referência utilizando a cepa KP64. A montagem foi realizada utilizando a licença do programa *Geneious Prime* versão 2019.0.4, e a anotação foi realizada manualmente. **121**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies e gêneros da Ordem Enterobacterales e sua resistência intrínseca aos antimicrobianos.....	39
Tabela 2: Esquemas de classificação para β -lactamases, de acordo com revisão feita por Bush e Jacoby (45).....	45
Tabela 3: Alguns exemplos de sequências de inserção e transposons compostos associados a genes de resistência em bactérias Gram-negativas.	64
Tabela 4: Descrição de cada ponto de coleta e material utilizado para a coleta.....	73
Tabela 5: Reagentes utilizados na PCR e suas respectivas concentrações finais na reação.	84
Tabela 6: <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos genes de resistência, respectivo produto gerado em pares de bases e referência.....	86
Tabela 7: Espécies bacterianas utilizadas como controles positivos para os genes investigados e suas respectivas origens.....	87
Tabela 8: Sequências flanqueadoras de <i>bla</i> _{KPC-2} e <i>bla</i> _{NDM1} , seus iniciadores, tamanho do produto gerado, temperatura de anelamento e referência.....	88
Tabela 9: Genes alvo, iniciadores e tamanho dos produtos em pares de base para a técnica de MLST.....	91
Tabela 10: Nomes dos iniciadores, sequências de DNA e tamanho do produto gerado em pares de bases das regiões de controle de replicação plasmideal.....	93
Tabela 11: Ponto, data e métodos utilizados em cada coleta e identificação dos dípteros muscoides.....	102
Tabela 12: Quantitativo de isolados inicial e final do estudo, por ponto de coleta.....	106
Tabela 13: Cepas isoladas durante o estudo, identificação (MALDITOF-MS ou sequenciamento do gene 16S rRNA) e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.	111

Tabela 14: Número de isolados não sensíveis para cada antimicrobiano testado, por ponto de coleta.....	118
Tabela 15: Cepas de enterobactérias, isoladas a partir de moscas, classificadas como multirresistentes, de acordo com Magiorakos e colaboradores (2012) (40).....	121
Tabela 16: Perfil de identificação e susceptibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos de origem clínica isolados no hospital municipal, nos anos de 2016, 2017 e 2018.....	123
Tabela 17: Número de isolados positivos para os genes de resistência estudados através da técnica de PCR, por ponto de coleta.....	125
Tabela 18: Cepas isoladas a partir de moscas e de material clínico, positivas para genes de resistência e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de acordo com o <i>Phoenix</i>	131

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µL	microlitro
AmpC	Tipo de beta-lactamase cromossomal
AK	Amicacina
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
ATCC	<i>American Type and Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>
CAZ	Ceftazidima
CC	Complexo clonal
CCBH	Coleção de Culturas de Bactérias Hospitalares
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CTX	Cefotaxima
CTX-M	Beta-lactamase Cefotaximase
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleotídeos
EMB	<i>Eosin Methylene- blue Agar</i>
ERT	Ertapenem
ESBL	Beta-Lactamase de Espectro Estendido
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FEP	Cefepime
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOX	Cefoxitina
FOSF	Fosfomicina/trometranol
GES	<i>Guiana extended spectrum beta-lactamase</i>
GN	Gentamicina

INCQS	Instituto Nacional de Controle Qualidade em Saúde
IPM	Imipenem
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IR	Sequência repetitiva invertida
IRAS	Infecções relacionadas à assistência em saúde
IS	Sequência de inserção
kb	kilo bases (mil pares de base)
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
L	litro
LAPIH	Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar
LEMEF	Laboratório de Entomologia Médica e Forense
LIMM	Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica
LPS	Lipopolissacarídeo
M	molar
MALDITOF- MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
MEM	Meropenem
min	minutos
Mg	magnésio
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mL	mililitro
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MRSA	Methicilin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> / <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND	não determinado
NDM	New Delhi Metalobetalactamase
ng	nanogramas
NI	não identificado
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OXA	Oxacilinase

PABA	ácido para-amino-benzoico
pb	Pares de bases
PBPs	Proteínas ligadoras de penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
POL	Polimixina B
PTZ	Piperacilina/ Tazobactam
rpm	rotações por minuto
rpoB	subunidade beta da RNA polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Sodium dodecil sulfate/ Dodecil sulfato de sódio
SHV	Beta-lactamase <i>Sulphydryl variable</i>
SIM	“Seoul imipenemase”
SPM	São Paulo metalo- β -lactamase
ST	<i>Sequence type</i>
SXT	Sulfametoxazole/ Trimetropima
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampão Tris- Borato EDTA
TIG	Tigeciclina
TE	Tampão Tris-EDTA
TEM	Beta-lactamase Temoneira
TSA	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
UTI	Unidade de terapia intensiva
V	volt
VIM	“Verona integron-encoded metallo- β -lactamase”
VRE	Vancomycin-resistant enterococci/ <i>Enterococcus</i>

resistente à vancomicina

1. INTRODUÇÃO

1.1 Antimicrobianos

Os efeitos curativos de cogumelos, leveduras e mofos no tratamento de feridas infectadas já são conhecidos há muitos anos (aproximadamente 1500 anos antes de Cristo). No entanto, os praticantes não eram capazes de explicar o porquê do efeito observado (1). O médico austríaco Theodor Billroth (1829-1894) constatou em seus experimentos que a presença de *Penicillium*, em um mesmo meio de cultura, inibia o crescimento de bactérias. O médico sugeriu que o fungo modificava o meio, tornando-o incapaz de permitir o crescimento bacteriano (2).

O médico inglês Joseph Lister (1827–1912) foi o pioneiro na realização de cirurgias de forma asséptica, utilizando substâncias químicas, como o fenol. Além disso, postulou que o fungo *Penicillium glaucum* apresentava atividade antimicrobiana (3). No entanto, seus resultados não foram publicados.

Anteriormente aos estudos de Fleming (médico microbiologista escocês, que descobriu a lisozima em 1923 e a penicilina em 1928), Ernest Duchesne (1874–1912), médico francês, relatou a sobrevivência de porcos infectados com *Escherichia coli* ou *Salmonella typhi*, após serem tratados com suspensão de mofo, e propôs a utilização terapêutica de compostos antimicrobianos produzidos por fungos (4). No entanto, sua tese não foi aceita pelo Instituto Pasteur. Duchesne foi homenageado postumamente pela *Académie Nationale de Médecine*, em 1949, quatro anos depois de Fleming e seus colegas terem recebido o Prêmio Nobel pela redescoberta do efeito antimicrobiano da penicilina (4).

Após a Primeira Guerra Mundial, a pesquisa e o desenvolvimento de compostos antimicrobianos foram intensificados substancialmente, em função dos terríveis ferimentos gerados nas batalhas e sua consequente infecção (4).

Após mais de 70 anos da descoberta dos compostos antimicrobianos e de sua intensa utilização, a resistência antimicrobiana foi considerada a maior ameaça e um grande desafio no campo da saúde no século 21 (5). Além disso, estima-se que a resistência antimicrobiana poderá causar milhões de mortes no mundo inteiro, o que levou a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2015, a traçar um plano de ação global no combate à resistência aos antimicrobianos (6).

O uso adequado de qualquer composto terapêutico é comprometido pelo potencial desenvolvimento de sua resistência pelo organismo alvo, especialmente no caso de tratamento contra bactérias, vírus, fungos e outros parasitas (7). Os antimicrobianos, como produtos naturais, são moléculas complexas e surpreendem em relação a sua estrutura química, vias biossintéticas, evolução e mecanismos de ação (8).

A definição de “antibiótico”, inicialmente proposta por Selman Waksman em 1947, ganhador do prêmio Nobel pela descoberta da estreptomicina, é simplesmente “Um composto químico produzido por um microrganismo que mata ou inibe o crescimento de outro microrganismo (9). Posteriormente, ele percebeu que se tratava de uma visão antropocêntrica e afirmou que os antibióticos não desempenham um papel em modificar ou influenciar os processos vivos que ocorrem na natureza (9).

Atualmente, o termo “antibiótico” apresenta várias definições, como: (i) um composto químico orgânico, de origem natural ou sintética, que inibe ou mata bactérias patogênicas, (ii) qualquer substância antimicrobiana, ou (iii) substância antimicrobiana de origem microbiana (4). De acordo com Davies e Davies (2010) (7), antibiótico é qualquer classe de molécula orgânica que inibe ou mata microrganismos, por interações específicas com alvos bacterianos, independente da fonte, do composto ou de sua classe.

No entanto, uma definição amplamente aceita, é a aquela em que o termo antimicrobiano se refere a qualquer substância utilizada no tratamento de doenças infecciosas, quer pela inibição ou morte do patógeno. Tais agentes antimicrobianos podem ser de origem natural (denominados antibióticos),

produzidos por microrganismos, como a penicilina e a cefalosporina, sintético quando sintetizado em laboratório, ou ainda, semissintético, quando apresenta origem natural e é modificado quimicamente em laboratório (4).

1.1.1 Sulfonamidas

A descoberta e o desenvolvimento das sulfonamidas, classe de antimicrobianos sintéticos, por Paul Gerhard Domagk, em 1930, consistiu em mais um marco da história dos antibióticos (4). O médico alemão tratava de feridas de guerra, e, na época, foi encarregado pelas grandes empresas alemãs de testar corantes azo com propriedade antibacteriana. Em 1932 foi encontrado um corante vermelho com alta atividade protetora, quando administrado em ratos desafiados com uma dose letal de estreptococos. Este composto com nome comercial de Prontosil era uma pró-droga, precursora da sulfonamida, sua forma ativa, com ação contra cocos Gram-positivos (3).

As sulfonamidas atuam como inibidores competitivos da enzima bacteriana dihidroperato sintetase, pois são análogas ao seu substrato, o ácido para-aminobenzóico (PABA). A enzima catalisa uma reação necessária à síntese de ácido fólico (utilizado na síntese de precursores de DNA e RNA) nas bactérias. Consequentemente, o DNA bacteriano não é replicado e proteínas não são sintetizadas. As células humanas obtêm ácido fólico a partir da dieta e não possuem a enzima dihidroperato sintetase; portanto, não são afetadas (10). As sulfonamidas apresentam efeito bacteriostático contra Gram-positivos e alguns Gram-negativos (4).

Atualmente, as sulfonamidas são pouco utilizadas, em parte devido à resistência desenvolvida nos microrganismos (10), inicialmente observada em 1942 (11). A resistência a esse composto é baseada na capacidade do microrganismo de utilizar fontes externas de ácido fólico. Hoje em dia, sulfonamidas são utilizadas em combinação com trimetoprim, que inibe uma

etapa posterior de síntese do ácido fólico (inibidor da diidrofolato redutase). Em combinação com sulfamidas trimetoprim, mostra um efeito bactericida (4).

1.1.2 Beta-lactâmicos

A penicilina e seus derivados pertencem à classe dos antibióticos β -lactâmicos, que incluem as cefalosporinas, carbapenemas e monobactâmicos (Figura 1). Os antibióticos desse grupo apresentam um anel β -lactâmico em sua estrutura química e são potentes inibidores da biossíntese da parede celular (4). Essa classe possui propriedade tempo-dependente, em que sua eficácia aumenta conforme maior o tempo de exposição, acima da concentração inibitória mínima (CIM) (12).

O efeito bactericida dos β -lactâmicos deve-se à inibição das enzimas envolvidas na síntese da parede celular. Esta estrutura bacteriana é essencial para manter a forma das células em um ambiente hipertônico e hostil, e é composta por unidades alternadas de ácido N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetilglicosamina (NAG), e são unidas pelas transglicosidases. Um pentapeptídeo é ligado a cada unidade de NAM e a ligação de dois pentapeptídeos de NAM de d-alanina-d-alanina é catalisada por Proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), que atuam como transpeptidases (13)(14).

O anel β -lactâmico é estericamente similar à d-alanina-d-alanina do pentapeptídeo NAM, e as PBPs usam erroneamente o β -lactâmico como um “bloco de construção” durante a síntese da parede celular (14). Isto resulta em acilação da PBP, o que torna a enzima incapaz de catalisar mais reações de transpeptidação. À medida que a síntese da parede celular diminui, a autólise constitutiva do peptidoglicano continua. Dessa forma, a inibição da transpeptidação por β -lactâmicos causa a lise celular (14).

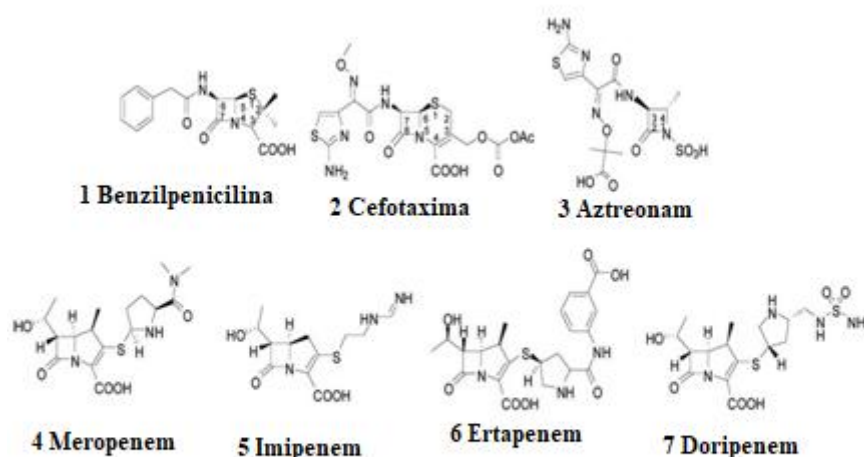


Figura 1: Estrutura química dos beta-lactâmicos: penicilina (composto 1), cefalosporina de amplo espectro (composto 2), monobactâmico (composto 3) e carbapenemas (composto 4 ao 7). Adaptado de *Three Decades of β -Lactamase Inhibitors*, Sarah M. Drawz, Robert A. Bonomo. *Clinical Microbiology Reviews* Jan 2010, 23 (1) 160-201.

O primeiro antibiótico β -lactâmico, a penicilina G, foi principalmente eficaz contra bactérias Gram-positivas, pois a parede celular da maioria dos Gram-negativos é impermeável para este agente. Posteriormente, penicilinas semissintéticas foram desenvolvidas (metecilina, oxacilina, ampicilina, carbenicilina) com atividade de amplo espectro, incluindo ação contra Gram-negativos (4).

1.1.2.1 Inibidores de β -lactamase

A produção de enzimas do tipo β -lactamase é considerada um dos principais mecanismos de resistência para essa classe de antimicrobianos. Uma estratégia bem-sucedida para combater a resistência mediada por β -lactamases é o uso de compostos que se ligam ao sítio ativo da enzima. Os inibidores podem atuar de duas formas: (i) como substratos que se ligam

reversivelmente e/ou irreversivelmente com alta afinidade às enzimas, e formam interações estéricas desfavoráveis ou (ii) como inibidores “suicidas”, que se ligam de forma irreversível às enzimas. Os primeiros seriam as cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos, que formam enzimas cataliticamente incompetentes (14).

Os inibidores irreversíveis “suicidas” inativam permanentemente as enzimas β -lactamase através de reações químicas no sítio ativo da enzima. Exemplos comercializados destes inibidores para enzimas de classe A são ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (14).

O ácido clavulânico foi o primeiro inibidor de β -lactamase a ser introduzido na prática clínica e foi isolado de *Streptomyces clavuligerus* em 1970 (15). O clavulanato (sal formado do ácido em solução) possui baixa atividade antimicrobiana, mas quando combinado com amoxicilina, reduz significativamente as CIMs de amoxicilina contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *E. coli* (16).

Sulbactam e tazobactam são sulfonas penicilinas que foram desenvolvidas pela indústria farmacêutica como compostos sintéticos em 1978 e 1980, respectivamente (14). Os três compostos inibidores de β -lactamases compartilham semelhança estrutural com a penicilina; são eficazes contra muitos organismos susceptíveis que expressam β -lactamases de classe A (CTX-M e os derivados de ESBL, TEM-1, TEM-2 e SHV-1); e são geralmente menos eficazes contra as β -lactamases de classe B, C e D (17).

1.1.3 Bacitracina

A bacitracina foi originalmente isolada de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* e descrita em 1945 por Johnson e colaboradores (18). Este composto é formado por um complexo polipeptídico e apresenta largo espectro, inibe bactérias Gram-positivas (estreptococos e estafilococos) e bactérias anaeróbicas (*Clostridium difficile*), pois impede a síntese da parede celular (4).

A bacitracina comercializada é formada por uma mistura de polipeptídeos, com a bacitracina B como principal componente. Devido ao fato de apresentar toxicidade sistêmica, este composto é utilizado localmente, no tratamento de infecções superficiais, queimaduras e enxertos de pele (4).

1.1.4 Aminoglicosídeos

A classe dos aminoglicosídeos foi descoberta através de triagem sistemática de Actinobactérias isoladas de solo, em 1940, e é composta pelos antimicrobianos estreptomicina, neomicina, gentamicina, tobramicina, neomicina e canamicina (19). O primeiro a ser isolado foi a estreptomicina, por Schatz e colaboradores em 1944, a partir da espécie *Streptomyces anulatus* subsp. *griseus* (20).

Os aminoglicosídeos apresentam largo espectro de ação e inibem a síntese proteica bacteriana, ao se ligarem no sítio A de reconhecimento de aminoacil-tRNA, na porção 30S da subunidade ribossomal (19)(4). São amplamente utilizados no tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos, principalmente em terapias combinadas com outros antimicrobianos (4).

1.1.5 Cloranfenicol

Classe de antimicrobianos que apresenta largo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, anaeróbias, espiroquetas, rickettsia, clamídias e micoplasmas (4). Este composto foi inicialmente isolado por John Ehrlich e colaboradores em 1947, a partir de *Streptomyces venezuelae* (21). Cloranfenicol exerce sua ação ligando-se à porção 50S da subunidade ribossomal bacteriana, inibindo a síntese proteica (4)(22).

1.1.6 Tetraciclina

As tetraciclina formam uma classe de antimicrobianos que também foi descoberta a partir de caldos fermentados de espécies de *Streptomyces* (4). Estes compostos atuam de forma bacteriostática, ligando-se à subunidade ribossômica 30S e bloqueando a entrada de aminoacil t-RNA no sítio A do ribossomo, impedindo a síntese proteica (4). Estes antimicrobianos apresentam amplo espectro de ação e atuam contra patógenos Grampositivos, Gramnegativos, rickettsia, clamídias, micoplasmas e até protozoários (4).

A ausência de efeitos colaterais adversos levou ao uso extensivo das tetraciclina no tratamento de infecções humana e animal; porém, o surgimento de resistência microbiana limitou sua eficácia (23).

1.1.7 Quinolonas

Os antimicrobianos pertencentes à classe das quinolonas atuam de forma bactericida, inibindo a enzima bacteriana DNA girase (topoisomerase II). Esta enzima catalisa mudanças na topologia do DNA e o interconverte entre as formas relaxadas e superenroladas, introduzindo e removendo voltas na molécula de DNA. As topoisomerases II de eucariotos são grandes enzimas formadas por uma única subunidade, já as enzimas procariontes; como a girase e a topoisomerase IV, são compostas por duas subunidades (24).

A primeira quinolona clínica, o ácido nalidíxico, foi descoberta acidentalmente como um subproduto da síntese do importante medicamento antimalárico, a cloroquina. Já a ciprofloxacina, em comparação ao ácido nalidíxico, apresenta amplo espectro de ação (4)(24). A síntese das fluoroquinolonas e a sua melhoria ao longo de várias gerações, como norfloxacina e ciprofloxacina (segunda geração), levofloxacina (terceira geração) e moxifloxacina e gemifloxacina (quarta geração) resultaram em uma

gama potente de compostos antibacterianos, que são amplamente utilizados na terapia clínica (25).

1.1.8 Glicopeptídeos

Os glicopeptídeos foram descobertos em 1950, a partir de actinomicetos isolados do solo. Estes antimicrobianos atuam no último estágio de síntese da parede celular de peptidoglicano, exclusivamente em bactérias Grampositivas (4).

Atualmente, os glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) são utilizados no tratamento de infecções severas causadas por bactérias Gram-positivas resistentes aos β -lactâmicos, *S. aureus* resistente à meticilina, *Staphylococcus* resistente à oxacilina e *Enterococcus* resistentes à ampicilina (4).

1.1.9 Polimixinas

As polimixinas formam um grupo de antimicrobianos ativo contra diversas bactérias Gram-negativas, no entanto, algumas espécies, como: *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Serratia* spp. apresentam resistência intrínseca a estes compostos (26). Estes antimicrobianos são sintetizados por *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa* e foram descritos em 1947 por pesquisadores norte-americanos e ingleses. Esta categoria é formada por cinco substâncias relacionadas, denominadas polimixinas A, B, C, D e E. A polimixina E é denominada colistina e é produzida pela espécie *Bacillus colistinus*. Apenas as polimixinas B e E são utilizadas na clínica, em função da alta toxicidade das demais (27) (28).

A estrutura química das polimixinas é formada por decapeptídeos policatiônicos cíclicos, caracterizados por um anel heptapeptídico. A colistina (polimixina E) diferencia-se da polimixina B pela presença do aminoácido D-leucina no lugar de D-fenilalanina na posição 6 (27) (26).

As polimixinas são antimicrobianos anfipáticos, que atuam nas membranas externa e citoplasmática da bactéria, de forma semelhante aos detergentes catiônicos simples. Estes compostos ligam-se aos fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (LPS) de membrana, competindo por íons Ca^{2+} e Mg^{2+} que estabilizam a membrana, causando ruptura desta estrutura e perda de conteúdo celular, levando a célula bacteriana à morte (27).

Na década de 90, com o aparecimento das bactérias multirresistentes aos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, e em função da falta de opções terapêuticas, as polimixinas voltaram a ser utilizadas na prática clínica. No entanto, os efeitos adversos deste grupo de antimicrobianos são a nefrotoxicidade e a neurotoxicidade. Além disso, inúmeros patógenos Gram-negativos já apresentam mecanismos de resistência, tanto cromossomais quanto plasmideais a esta classe de antimicrobianos (29).

1.2 Antimicrobianos críticos para a medicina humana

A OMS desenvolveu critérios para eleger antimicrobianos de acordo com a sua importância para a saúde humana, em reuniões em diferentes lugares do mundo. Essa lista oferece suporte a estratégias de manejo de risco, informando quais antimicrobianos, utilizados na criação de animais, apresentam risco potencial no desenvolvimento de resistência bacteriana, visando a preservar a eficiência dos antimicrobianos atualmente disponíveis (30).

O *ranking* atualizado dos antimicrobianos permite que os diferentes setores da sociedade, como o setor agrícola e as agências reguladoras, concentrem esforços no manejo de antimicrobianos usados na produção de

alimentos, e que são de grande importância para a medicina humana. Dessa forma, o uso de fluoroquinolonas, macrolídeos, cefalosporinas de terceira geração, glicopeptídeos e carbapenêmicos precisa ser tratado com urgência (30).

1.3 Resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos já foi detectada em animais selvagens e até em comunidades humanas remotas, com pouca ou nenhuma exposição aos antimicrobianos. Além disso, genes de resistência já foram detectados em amostras de gelo do Ártico, datadas de 30.000 anos, e em cavernas subterrâneas, com mais de 4 milhões de anos. No entanto, a produção e a utilização em massa de compostos antimicrobianos resultaram em uma pressão de seleção sem precedentes (31).

A cada introdução e uso de um composto antimicrobiano na prática clínica, foi observada, em seguida, geralmente no ambiente clínico, a emergência global da resistência. *S. aureus* resistente à meticilina se disseminou a partir dos EUA e Reino Unido para a Europa e, posteriormente, para a Ásia, em uma década. Após 20 anos, *K. pneumoniae* produtora de KPC obedeceu a um processo semelhante de disseminação. A enzima New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1) foi detectada em quase todos os continentes, um ano após sua emergência, na Índia (32).

A Figura 2 apresenta a linha do tempo com a data aproximada com que alguns antimicrobianos ou classes foram introduzidos na prática clínica. As datas com que organismos resistentes foram identificados estão representadas no centro da linha do tempo. O aumento acentuado da resistência antimicrobiana entre patógenos bacterianos está colocando em risco o sucesso do tratamento de graves infecções. Dessa forma, a OMS declarou a resistência aos antimicrobianos uma das três maiores ameaças à saúde pública do século XXI (33) (34). O Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC)/EUA estimou que pelo menos 23.000 pessoas morrem anualmente nos Estados Unidos, em decorrência de uma infecção causada por um microrganismo

resistente (35). Além disso, de acordo com relatório recente, estima-se que a resistência aos antimicrobianos causará cerca de 300 milhões de mortes prematuras até 2050, com uma perda de até US \$ 100 trilhões de dólares para a economia mundial (36).

A OMS desenvolveu um projeto de plano de ação global sobre a resistência antimicrobiana, visando a garantir a continuidade do sucesso do tratamento e prevenção de doenças infecciosas com medicamentos eficazes, de qualidade e seguros, utilizados de forma responsável e acessível (37).

Já no Brasil, em 2013, foi publicado o primeiro relatório da Rede

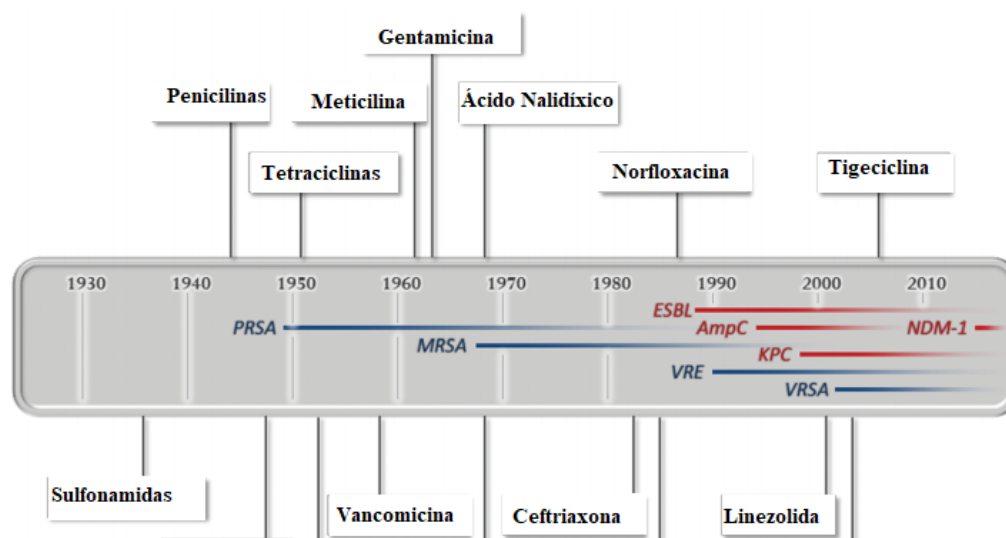


Figura 2: Linha do tempo dos antimicrobianos, relacionando as datas aproximadas da introdução destes compostos, e a posterior seleção e disseminação de mecanismos de resistência. Abreviações: AmpC – cefalosporinas de classe C; ESBL – β -lactamases de espectro estendido; KPC- *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; MRSA – *Staphylococcus* resistente à metilina; NDM-1 – Nova Delhi β -lactamase tipo 1; PRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à penicilina; VRE- *Enterococcus* resistente à vancomicina; VRSA- *Staphylococcus* resistente à vancomicina. Figura modificada de Molton e colaboradores (2013) (28).

Nacional de Monitoramento de Resistência, que reuniu informações de 908 hospitais de 26 das 27 unidades federativas brasileiras, com dados dos fenótipos de resistência de 19.009 microrganismos responsáveis por causarem infecções primárias de corrente sanguínea (IPCS) em unidades de terapia intensiva (UTIs). Dessa forma, concluiu-se que a resistência microbiana é um problema de saúde pública em todas as regiões do Brasil (37).

De acordo com o documento *WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption 2016 – 2018*, o Brasil apresenta média de consumo de

antimicrobianos superior aos países da Europa, ocupando a liderança nas Américas. Segundo o relatório, o Brasil consome 22,75 doses diárias para cada mil habitantes (38). Sampaio e Gales afirmaram que a resistência em enterobactérias no Brasil é considerado um sério problema, e que necessita ações urgentes, como o maior controle no uso de antimicrobianos, assim como medidas de controle de infecções (39).

Magiorakos e colaboradores (2012) organizaram os conceitos sobre resistência antimicrobiana. Segundo os autores, cepas multirresistentes (*multidrug-resistant*, MDR) foram definidas como não suscetíveis a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas. Cepas extensivamente resistentes (*extensively drug-resistant*, XDR) foram definidas como não suscetíveis a pelo menos um agente em todos, exceto duas ou menos categorias antimicrobianas, enquanto cepas pan-resistentes (*pandrug-resistant*, PDR) foram classificadas como não suscetíveis a todos os agentes, em todas as categorias antimicrobianas. A aplicação correta dessas definições depende de que os isolados bacterianos sejam testados contra todos ou quase todos os agentes antimicrobianos dentro das categorias antimicrobianas (40).

1.3.1 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos é antiga e resulta da interação de diversos microrganismos com o ambiente. Compostos antimicrobianos são moléculas de origem natural e são produzidos por bactérias, ou fungos, que apresentam mecanismos que superam sua ação, a fim de sobreviver. Dessa forma, estes microrganismos produtores de antibióticos são considerados intrinsecamente resistentes a um ou mais compostos antimicrobianos (33).

Entretanto, no ambiente clínico, a “resistência adquirida” apresenta grande importância, pois refere-se a uma população bacteriana originalmente sensível e que se torna resistente a determinado antimicrobiano. Este tipo de

resistência pode ser resultado de mutação em genes cromossomais ou através da aquisição de determinantes genéticos externos de resistência, oriundos de microrganismos ambientais intrinsecamente resistentes. A partir de uma perspectiva evolutiva, as bactérias apresentam estas duas principais estratégias genéticas como formas de sobrevivência na presença de antimicrobianos (33) (41).

As mutações que resultam em resistência alteram a ação antimicrobiana através de um dos seguintes mecanismos: i) modificações do alvo antimicrobiano (diminuindo a afinidade pelo fármaco), ii) diminuição da permeabilidade do fármaco, iii) expulsão da molécula por bombas de efluxo, ou iv) modificação das moléculas de antimicrobianos (33) (41).

A resistência adquirida via transferência lateral de genes é um importante mecanismo de evolução bacteriana. Esta aquisição de genes externos pode ocorrer de três formas principais, como: i) transformação (incorporação de DNA externo), ii) transdução (mediada por fago) e iii) conjugação (transferência de genes célula a célula) (42).

A conjugação ocorre via transferência lateral de elementos genéticos móveis (EGM), como plasmídeos e transposons, que contêm os genes de resistência. Já os integrons são sistemas de recombinação sítio-específico, capazes de recrutar genes cassetes, adicionando possíveis genes de resistência ao cromossomo bacteriano ou aos plasmídeos (33) (42).

1.3.1.1 Resistência intrínseca

Os mecanismos de resistência bacterianos podem ser intrínsecos (já presentes em todas as amostras de determinada espécie) ou adquiridos (devido à presença de mutações, aquisição de plasmídeos etc). Os padrões de resistência intrínsecos a determinados antimicrobianos já são sabidamente conhecidos para cada espécie bacteriana e, portanto, não há necessidade de se testarem ou reportarem estes antimicrobianos.

A resistência intrínseca existe em certas espécies bacterianas, independente da pressão de seleção exercida pelo uso constante de antimicrobianos. Especialmente em bactérias Gramnegativas, a base molecular do fenômeno é a presença da membrana externa, impermeável a muitas moléculas, e a expressão de inúmeras bombas de efluxo, que reduzem de forma efetiva a concentração intracelular de antimicrobianos e outros compostos (43) (44). Além disso, estudos recentes relataram outros mecanismos moleculares, como a inativação de genes e inserção de transposons, como mecanismos que contribuem para o resistoma intrínseco (45).

A Tabela 1 apresenta o grupo denominado CESP (*Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. e *Proteus* spp.), ou de acordo com a nomenclatura atual, o grupo designado como ESCPM (*Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Providencia* spp. e *Morganella morganii*), formado por bactérias Gram-negativas produtoras de β -lactamases cromossomais, denominadas cefalosporinases do tipo AmpC (Classe C de Ambler e grupo 1, de acordo com Bush–Jacoby–Medeiros) (46). Estas enzimas são expressas em grande quantidade de forma induzida, e geralmente reversível, em função da presença do β -lactâmico, ou em função de mutações, podendo hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro, penicilinas e monobactâmicos (47).

A produção de AmpC pode tornar-se constitutiva através de mutações nos genes regulatórios *ampD* e *ampR*, levando a desrepressão dos níveis normais de expressão de *ampC*. Estes mutantes podem ser selecionados durante a terapia antimicrobiana, especialmente com a utilização de β -lactâmicos (47).

Além disso, os grupos *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., e *M. morganii* exibem resistência intrínseca às polimixinas, em função de modificações do seu Lipídeo A e resíduos de LPS da membrana externa, reduzindo a ligação ao antimicrobiano (48).

Tabela 1: Espécies e gêneros da Ordem Enterobacterales e sua resistência intrínseca aos antimicrobianos.

Gênero ou Espécie	Resistência aos antimicrobianos
<i>Citrobacter freundii</i> e <i>Enterobacter</i> spp.	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de 1ª geração, cefoxitina, cefoletam e cefuroxima
<i>Citrobacter diversus</i> (<i>koseri</i>)	Ampicilina e cefalotina
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Ampicilina
<i>Serratia marcescens</i>	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de 1ª geração, cefoxitina, colistina e cefuroxima
<i>Proteus mirabilis</i>	Polimixina, colistina e tetraciclina
<i>Proteus vulgaris</i>	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de 1ª geração, cefoxitina, colistina e cefuroxima
<i>Morganella morganii</i>	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de 1ª geração, colistina e cefuroxima
<i>Providencia</i> spp.	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de 1ª geração, cefuroxima, colistina, polimixina, gentamicina e tobramicina
<i>Providencia stuartii</i>	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de 1ª geração, gentamicina, polimixina e colistina
<i>Providencia rettigeri</i>	Ampicilina, cefalotina, tetraciclina, polimixina e colistina

1.3.1.2 Modificação da molécula antimicrobiana

Uma das estratégias bacterianas mais eficientes contra os antimicrobianos é a produção de enzimas que inativam o fármaco, adicionando moléculas químicas específicas ao composto, ou a destruição do antimicrobiano, tornando-o incapaz de interagir com o alvo (33).

1.3.1.2.1 Modificação enzimática do antimicrobiano

A produção de enzimas que inativam os antimicrobianos ocorre tanto em bactérias Gram-negativas quanto em Gram-positivas. Muitas enzimas modificadoras de antimicrobianos já foram descritas, mas a maioria apresenta um dos seguintes mecanismos bioquímicos: i) acetilação (aminoglicosídeos, cloranfenicol, estreptogaminas), ii) fosforilação (aminoglicosídeos, cloranfenicol), iii) adenilação (aminoglicosídeos, lincosamidas). Todas as modificações resultam em impedimento estérico, diminuindo a afinidade do medicamento pelo alvo, o que causa aumento da CIM bacteriana (33).

As enzimas modificadoras de aminoglicosídeos são um dos maiores exemplos deste grupo, e estas são responsáveis por modificar covalentemente o grupo amino ou o grupo hidroxila destes antimicrobianos (33). Estas enzimas tornaram-se o principal mecanismo de resistência a estes antimicrobianos e, geralmente, seus genes estão inseridos em elementos genéticos móveis, ou como parte do cromossomo em algumas espécies bacterianas, como *Providencia stuartii*, *Enterococcus faecium* e *S. marcescens* (49).

A nomenclatura para classificação destas enzimas considera sua atividade bioquímica (acetiltransferase [ACC], adeniltransferase [ANT], ou fosfotransferase [APH]), o sítio da modificação, que é representado por um número de 1 a 6 correspondente ao número do carbono no anel de açúcar, e um apóstrofe simples ou duplo para simbolizar que a reação ocorre na primeira ou segunda porção do açúcar, respectivamente (49).

As enzimas da família APH são amplamente distribuídas em bactérias Gram-negativas e em Gram-positivas, e atuam principalmente sobre canamicina e estreptomicina (50).

Existem duas subclasses principais de enzimas AAC (6') que conferem resistência a vários aminoglicosídeos e diferem em sua atividade contra a

amicacina e gentamicina. O subgrupo AAC (6') - I mostra alta atividade contra amicacina e gentamicina, enquanto AAC (6') - II é responsável pela acetilação de todas as formas de gentamicina, mas não de amicacina. Uma outra enzima, que inclui as fluoroquinolonas como substrato pode ser considerada uma terceira classe e foi nomeada como AAC (6') - Ib-cr (49).

Outro exemplo de alteração enzimática de antimicrobiano é a modificação química de cloranfenicol, codificada pela expressão de acetiltransferases conhecidas como *chloramphenicol acetyltransferases* (CATs). Os genes *cat* já foram descritos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e divididos em tipo A (conferem altos níveis de resistência) e tipo B (conferem baixo nível de resistência), podendo estar presentes em plasmídeos, transposons ou como parte do cromossomo (33) (51).

1.3.1.2.2 Hidrólise do antimicrobiano

O principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos consiste na ação de enzimas do tipo β -lactamases que destroem estes compostos antimicrobianos. Estas enzimas degradam a ligação amida do anel β -lactâmico, tornando-o inativo. As β -lactamases foram inicialmente descritas no início de 1940, um ano antes de a penicilina ter sido introduzida no mercado (33). No entanto, há relatos que evidenciam sua existência há milhões de anos (52).

Infecções causadas por *S. aureus* resistente à penicilina tornaram-se clinicamente relevantes após ampla disponibilização deste antimicrobiano. Penicilinas codificadas por plasmídeos foram amplamente disseminadas entre cepas de *S. aureus* (53). Em função disso, novos compostos β -lactâmicos com amplo espectro de ação e menor susceptibilidade às penicilinas (como a ampicilina) foram desenvolvidos. No entanto, durante 1960, uma nova β -lactamase, capaz de hidrolisar ampicilina e codificada por plasmídeo, foi detectada em bactérias Gram-negativas. A enzima foi nomeada como TEM-1,

em função do nome da paciente em que foi originalmente encontrada (Temoneira) (46).

Atualmente, mais de 1.000 diferentes β -lactamases foram descritas e muitas ainda estão sendo descobertas, como parte do processo normal de evolução bacteriana (33). Dois esquemas principais de classificação foram propostos, a fim de agrupar estas enzimas. A classificação de Ambler é baseada na identidade da sequência de aminoácidos e separa as β -lactamases em 4 grupos (A, B, C e D). Por outro lado, a classificação de Bush-Jacoby as divide em 4 categorias (cada uma dividida em subgrupos), de acordo com sua função bioquímica e especificidade do substrato (54) (33) (46).

Embora a classificação de Ambler pareça mais fácil de acompanhar, a falta de correlação com características funcionais enzimáticas pode levar a confusões. A classe A de Ambler agrupa enzimas com diferentes perfis funcionais, desde β -lactamases de espectro estreito a enzimas capazes de hidrolisar todos os β -lactâmicos, incluindo carbapenemas (33). Além disso, enzimas classificadas originalmente dentro de um grupo podem evoluir para novas enzimas, com novo perfil de substratos, em função de mutações ocorridas em seu sítio ativo. Um exemplo disso é a enzima TEM-3 que evoluiu da enzima original TEM-1 (penicilinase), adquirindo a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de 3ª geração e aztreonam, passando a ser classificada como uma β -lactamase de espectro estendido (ESBL) (33).

Enzimas do tipo ESBL hidrolisam penicilinas, cefalosporinas de 3ª geração, monobactâmicos e possuem pouca ação (ou nenhuma) sobre carbapenemas e cefamicinas. A maioria das ESBLs faz parte da classe A de Ambler, possuem resíduo de serina em seu sítio ativo e geralmente são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. Esta propriedade as distingue das enzimas do tipo AmpC, que fazem parte da classe C de Ambler, apresentam serina em seu sítio ativo, também hidrolisam cefalosporinas de 3ª geração, mas não são inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam (54).

Espécies dos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Morganella* e isolados de *Proteus vulgaris* são reconhecidamente produtores de β -

lactamases do tipo AmpC. Estas enzimas são codificadas pelo gene *AmpC* e sua produção pode ser induzida quando estes isolados clínicos são expostos a agentes β -lactâmicos. A hiperprodução desta enzima pode acarretar hidrólise de cefalosporinas, como ceftazidima e ceftriaxona, ocasionando falência e prejuízo terapêutico durante tratamento com estes agentes. As cefalosporinas de quarta geração e os carbapenemas são mais estáveis à hidrólise por AmpC (39).

A classe A de Ambler inclui tanto enzimas do tipo penicilinases (TEM-1 e SHV-1), quanto ESBLs, como CTX-M (cefotaximase). CTX-M é uma ESBL plasmideal, comumente encontrada em espécies da família Enterobacteriaceae, no mundo todo (33). Cefotaximases cromossomais intrínsecas em *Kluyvera* spp. são descritas como a principal fonte e origem de enzimas do tipo CTX-Ms, enquanto os elementos *ISEcp1*, *ISCR1* estão intimamente associados à sua mobilização e disseminação (55).

Enzimas do tipo carbapenemase (grupo diverso de β -lactamases que hidrolisam carbapenemas) são divididas em serino carbapenemases (sítio ativo contém resíduos de serina) e fazem parte das classes A e D de Ambler, e metalo carbapenemases (enzimas que necessitam de zinco como cofator), pertencentes a classe B de Ambler (33).

Até o momento foram descritas cinco famílias de carbapenemases de classe A, das quais três são cromossomais, como as enzimas IMI (*imipenem-hydrolyzing enzyme*), SME (*Serratia marcescens enzyme*) e NMC (*not-metallo-enzyme carbapenemase*), e KPC e GES, geralmente codificadas por plasmídeos ou elementos genéticos móveis. Todas são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam, hidrolisam aztreonam, mas não hidrolisam cefamicinas (33).

Carbapenemases de classe B utilizam o zinco como cofator para o ataque nucleofílico do anel β -lactâmico e são inibidas por agentes quelantes de íons, como EDTA. Estas enzimas não são inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam. Em 1990, carbapenemases do tipo IMP e VIM começaram a ser relatadas em amostras clínicas de enterobactérias, *Pseudomonas* spp. e

Acinetobacter spp. As enzimas do tipo IMP apresentam 20 variantes e geralmente estão presentes em grandes plasmídeos, como parte de integron de classe 1 (33).

Enzimas do tipo VIM (*Verona integron-encoded metallo β -lactamase*) foram descritas pela primeira vez em Verona, na Itália, em cepas de *P. aeruginosa*, também associadas a plasmídeos e integron de classe 1. Entre as muitas variantes de VIM descritas, VIM-2 é a enzima mais amplamente distribuída, com relatos na Europa, Ásia, África e Américas (56).

A enzima NDM, também pertencente à classe B, compartilha baixa identidade de aminoácidos com outros membros da classe (32% com VIM-1), porém seu perfil hidrolítico é semelhante (56). Além disso, já foi encontrada em bactérias de diferentes origens, como solo, água de consumo humano, praia, o que sugere a alta disseminação deste gene (33).

As β -lactamases da classe D de Ambler constituem uma ampla gama de enzimas com capacidade de hidrolisar oxacilinas e são fracamente inibidas por ácido clavulânico. Dentro deste grupo há enzimas que degradam cefalosporinas de 3ª geração (ESBLs como OXA-11 de *P. aeruginosa*) e carbapenemas (OXA-23 em *A. baumannii*). Embora as enzimas da classe D sejam prevalentes em *A. baumannii*, estas já foram encontradas em muitos outros organismos clinicamente relevantes, como *E. coli*, *Enterobacter* spp., *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (33).

Embora a classificação estrutural (molecular) seja uma das maneiras mais simples de classificar β -lactamases, a classificação funcional, baseada na proposta de 1995 de Bush, Jacoby e Medeiros, e revista por Bush e Jacoby em 2010 (57), permite relacionar a variedade de enzimas com o seu papel na resistência fenotípica observada na clínica. A classificação funcional leva em consideração o substrato e os perfis de inibição para agrupar as enzimas, de modo que essas características podem ser relacionadas com o perfil fenotípico de isolados clínicos. A Tabela 2, baseada na revisão de Bush e Jacoby (57), resume os esquemas de classificação destas enzimas

Tabela 2: Esquemas de classificação para β -lactamases, de acordo com revisão feita por Bush e Jacoby (45).

Grupo funcional Bush-Jacob (57)	Classificação de acordo com Bush-Jacoby-Medeiros (58)	Classe molecular	Exemplos de enzimas	Características (substratos e inibidores)
1	1	C	<i>E. coli</i> AmpC, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1 GC1, CMY-37	Hidrolisam cefalosporinas e cefamicinas. Não são inibidas por ácido clavulânico, tazobactam ou EDTA.
1e	NI	C		Intensa hidrólise de ceftazidima. Não são inibidas por ácido clavulânico, tazobactam ou EDTA.
2a	2a	A	PC1	Intensa hidrólise de benzilpenicilina em relação à cefalosporina. Podem ser inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam, e não são inibidas por EDTA.
2b	2b	A	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Hidrólise semelhante de benzilpenicilina e cefalosporina. Podem ser inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam, e não são inibidas por EDTA.
2be	2be	A	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1	Hidrólise aumentada para oximino β -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, aztreonam). Podem ser inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam, e não
2br	2br	A	TEM-30, SHV-10	Resistência ao ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam.
2ber	NI	A	TEM-50	Hidrólise aumentada para oximino β -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, aztreonam). Resistência ao ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam.
2c	2c	A	PSE-1, CARB-3	Hidrólise aumentada para carbenicilina. Inibida por ácido clavulânico, tazobactam e não inibida por EDTA.
2ce	NI	A	RTG-4	Hidrólise aumentada para carbenicilina e cefepima. Inibida por ácido clavulânico, tazobactam e não inibida por EDTA.
2d	2d	D	OXA-1, OXA-10	Hidrólise aumentada de cloxacilina ou oxacilina. Pode ser inibida por ácido clavulânico e tazobactam e não inibida por EDTA.
2de	NI	D	OXA-11, OXA-15	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e oximino β -lactâmicos. Pode ser inibida por ácido clavulânico e tazobactam e não inibida por EDTA.
2df	NI	D	OXA-23, OXA-48	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e carbapenemas. Pode ser inibida por ácido clavulânico e tazobactam e não inibida por EDTA.
2e	2e	A	CepA	Hidrolisa cefalosporinas. Inibida por ácido clavulânico, não inibida por EDTA ou Aztreonam
2f	2f	A	KPC-2, IMI-1, SME-1	Hidrólise aumentada de carbapenemas, oximino β -lactâmicos e cefamicinas. Pode ser inibida por ácido clavulânico e tazobactam e não inibida por EDTA.
3a	3	B(B1)	IMP-1, VIM-1, NDM-1	Hidrólise de carbapenemas e não hidrólise de monobactâmicos. Inibida por EDTA e não inibida por ácido clavulânico ou tazobactam.

1.3.1.3 Diminuição da permeabilidade

Muitos antimicrobianos utilizados na clínica apresentam alvo bacteriano intracelular ou, no caso de bactérias Gram-negativas, o alvo pode estar na membrana citoplasmática interna. Nesse sentido, o composto precisa penetrar pela membrana externa e pela membrana citoplasmática, para exercer seu efeito antimicrobiano (33). Por outro lado, bactérias, principalmente, as Gram-negativas desenvolveram mecanismos os quais evitam que o antimicrobiano alcance seu alvo intracelular ou periplasmático, diminuindo a captação deste (33).

A membrana externa atua como uma primeira barreira de defesa contra a entrada de compostos químicos ou tóxicos para a célula, o que inclui os antimicrobianos. Moléculas hidrofílicas, como β -lactâmicos, tetraciclinas e fluoroquinolonas são afetadas por mudanças na permeabilidade da membrana externa, uma vez que estas utilizam canais de difusão hidrofílicos como as porinas, para atravessar as membranas hidrofóbicas (59).

Um exemplo de eficiência desta “barreira natural” é o fato de a vancomicina (glicopeptídeo) não apresentar atividade contra microrganismos Gram-negativos, em função da baixa penetração pela membrana externa. *Pseudomonas* e *A. baumannii* apresentam baixa susceptibilidade aos β -lactâmicos, em comparação às enterobactérias, pela expressão diferencial ou reduzida de porinas (60).

As porinas, em bactérias Gram-negativas, formam canais hidrofílicos, localizadas na membrana externa, tornando-as semipermeáveis. Diversos tipos de porinas foram descritas e estas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura (trimérica ou monomérica), sua seletividade e a regulação de sua expressão. Existem quatro tipos principais de porinas: porinas gerais/não específicas, porinas substrato-específicas, porinas fechadas dependentes de íons e porinas efluxo (33).

Em *P. aeruginosa* são encontradas três grandes famílias destas moléculas, como família OprD, família OprM e família TonB (60). Em outras espécies Gram-negativas (como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella*), a susceptibilidade aos β -lactâmicos está intimamente relacionada com a presença de porinas que pertencem aos grupos OmpC e OmpF. Estudos clínicos relataram que enterobactérias resistentes podem exibir uma mudança no tipo de porina que expressam uma redução no nível de expressão de porinas ou mutações que levam a uma modificação na porina (59).

E. coli produz três grandes grupos de porinas triméricas: OmpF, OmpC e PhoE, caracterizadas pela baixa especificidade ao substrato. OmpF e OmpC possuem ligeira preferência por cátions, enquanto PhoE seleciona ânions e fosfato inorgânico (59).

Cepas de *K. pneumoniae* de diferentes pacientes durante tratamento com antimicrobianos exibiram uma mudança em relação a permeabilidade da membrana. A porina OmpK35, que pertence ao grupo OmpF e apresenta largo canal, foi substituída por OmpK36, pertencente ao grupo OmpC, que possui um canal mais estreito. O nível de susceptibilidade aos β -lactâmicos em cepas expressando OmpK35 é 4-8 vezes mais alta do que quando OmpK36 é expressa (61).

A perda absoluta de permeabilidade em enterobactérias é alcançada através da perda total da porina OmpC em isolados resistentes e este fato representa um passo extremo na resposta adaptativa. Tal perda pode resultar em uma queda do *fitness* bacteriano, em função da absorção restrita de nutrientes, porém aumenta as chances de sobrevivência da célula em ambiente com alta concentração de antimicrobianos (59). Nesta situação, em *K. pneumoniae*, pode ocorrer a expressão de outra porina, a OmpK37 membro da família OmpN, que permite a aquisição normal de nutrientes e diminuição da susceptibilidade aos β -lactâmicos (62).

A progressiva alteração da permeabilidade da membrana, em função da modificação das porinas em bactérias Gram-negativas, pode levar a um fenótipo multirresistente (59). Este mecanismo de resistência consiste em um

complexo processo, que é finamente regulado em resposta às condições do ambiente, como: choque osmótico, pH, temperatura, antimicrobianos e *stress* químico. Além disso, a diminuição da concentração interna de antimicrobiano, pela modificação de porinas, pode fornecer tempo para o desenvolvimento de outros mecanismos de resistência, como a modificação do alvo ou hidrólise do antimicrobiano (59).

1.3.1.4 Bombas de Efluxo

A produção de um maquinário bacteriano complexo capaz de expulsar compostos tóxicos para fora da célula também pode resultar em resistência aos antimicrobianos (33). A primeira descrição de um sistema de efluxo, capaz de retirar tetraciclina do citoplasma de isolados de *E. coli*, ocorreu em 1980 (63). Desde então, muitas classes de bombas de efluxo foram descritas, tanto em bactérias Gram-negativas quanto em Gram-positivas. Este mecanismo de resistência afeta uma ampla categoria de antimicrobianos, como fluoroquinolonas, β -lactâmicos e polimixinas. Os genes que codificam para as bombas de efluxo podem estar localizados em elementos genéticos móveis (ex: gene *tet*), ou em cromossomos, o que explica a resistência intrínseca de algumas bactérias a alguns antimicrobianos, como *Enterococcus faecalis* a estreptogramina A (33).

Os sistemas de efluxo podem ser substrato-específicos ou não específicos, atuando sobre uma ampla gama de antimicrobianos(64). Genes e proteínas de bombas de efluxo podem estar presentes, tanto em bactérias sensíveis quanto resistentes, e alguns sistemas podem ser induzidos pela presença de seu substrato. O perfil de resistência relacionado às bombas de efluxo pode ocorrer de duas formas: a super expressão de proteínas de efluxo ou mutações as quais conferem substituições na proteína que aumentam sua eficiência de exportação (65).

Atualmente, são conhecidas cinco grande famílias de bombas de efluxo, incluindo: i) família MFS (*major facilitator superfamily*), ii) família SMR (*small multidrug resistance family*), iii) família RND (*resistance-nodulation-celldivision family*), iv) família ABC (*ATP-binding cassette family*) e v) família MATE (*multidrug and toxic compound extrusion family*). Essas famílias diferem em função da conformação estrutural, fonte de energia, gama de substrato que são capazes de expulsar da célula e as bactérias nas quais estão presentes (65).

Um dos mecanismos de resistência às tetraciclinas é mediado pelas bombas de efluxo Tet (família MFS), cuja expulsão do antimicrobiano ocorre por troca de prótons como fonte de energia. Atualmente, já foram descritos mais de 20 genes *tet*, grande parte associado a elementos genéticos móveis, a maioria presente em bactérias Gram-negativas, com exceção de tet(K) e tet(L) presentes em Gram-positivos (64). Além de sistemas transportadores específicos, outras famílias de bombas de efluxo, como AcrAB-TolC em enterobactérias e MexAB-OprM em *P. aeruginosa* (ambas da família RND e a maioria codificada por genes cromossomais) são capazes de exportar tetraciclina para fora da célula, contribuindo para o fenótipo de resistência (66).

O sistema de efluxo AcrAB-TolC é composto por uma proteína transportadora localizada na membrana interna (AcrB), uma proteína ligadora localizada no espaço periplasmático (AcrA) e uma proteína canal localizada na membrana externa (TolC). Esta bomba funciona como uma proteína transportadora antiporte de prótons e confere resistência às tetraciclinas, cloranfenicol, alguns β -lactâmicos e fluoroquinolonas, e é capaz de exportar alguns compostos tóxicos como sais de bile e desinfetantes (33).

As bombas de efluxo codificadas pelos genes *mef* (*mefA* e *mefE*) expulsam antimicrobianos da classe dos macrolídeos (ex: eritromicina), levando a um fenótipo de resistência. Estas bombas são encontradas em *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e outros organismos Gram-positivos. O gene *mefA* é geralmente carregado pelo transposon Tn 1207 localizado no cromossomo, enquanto *mefE* encontra-se localizado no elemento MEGA (*macrolide efflux genetic assembly*), também inserido no cromossomo (67).

Nesse sentido, podemos concluir que o aumento da expressão de bombas de efluxo causa o aumento das CIMs bacterianas a muitos antimicrobianos, biocidas (desinfetantes) e detergentes. No entanto, estas CIMs aumentadas nem sempre ocorrem para antimicrobianos clinicamente relevantes ou mesmo acima das concentrações recomendadas. A maioria das bactérias possui inúmeras bombas de efluxo, mas apenas parte delas confere resistência aos agentes utilizados na prática clínica (65).

1.3.1.5 Modificação do sítio alvo

As bactérias desenvolveram diferentes estratégias, que resultam na modificação do alvo do antimicrobiano, levando a um fenótipo de resistência. Estas estratégias incluem: a proteção do alvo, impedindo a ligação do antimicrobiano com seu sítio alvo e modificações no sítio ativo que levam a uma diminuição da afinidade pela molécula antimicrobiana (33).

1.3.1.5.1 Proteção do alvo

A maioria dos genes de importância clínica envolvidos neste mecanismo de resistência está localizada em elementos genéticos móveis. Os genes que conferem resistência às tetraciclinas, *tet(M)* e *tet(O)*, foram inicialmente descritos em *Streptococcus* spp. e em *Campylobacter jejuni*, porém, atualmente estão amplamente distribuídos em diferentes espécies bacterianas, pois já foram encontrados em diferentes plasmídeos e em transposons conjugativos (68).

A proteína TetM desloca e libera a molécula de tetraciclina do ribossomo através de uma interação entre o domínio IV do 16S rRNA e o sítio de ligação à tetraciclina. Além disso, essa interação modifica a conformação do ribossomo,

impedindo uma nova ligação do antimicrobiano (69). De forma similar, TetO também compete com a tetraciclina no ribossomo e também altera a geometria do sítio de ligação do antimicrobiano (69).

Outro exemplo de proteção do alvo são as proteínas de resistência às quinolonas Qnr, que são codificadas por genes plasmideais frequentemente encontrados em isolados clínicos. Estas proteínas foram inicialmente descritas em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, em 1990, e atuam como homólogos de DNA que competem pelo sítio de ligação do DNA às enzimas DNA girase e topoisomerase IV. A redução da interação entre DNA e girase reduz as chances de interação entre as moléculas de quinolona com seu alvo (33).

As modificações dos alvos dos antimicrobianos podem ocorrer de diversas formas: i) através de mutações pontuais nos genes que codificam o sítio alvo, ii) alteração enzimática do sítio ativo, ou iii) substituição do alvo. Independente do mecanismo, o resultado final é sempre a diminuição da afinidade do antimicrobiano com o seu sítio ativo (33).

1.3.2 A resistência em bactérias Gram-negativas

A porcentagem de cepas Gram-negativas resistentes tem crescido globalmente nos últimos 10 anos (70). Um terço das infecções, adquiridas em hospitais, e mais de 40% de infecções adquiridas em unidades intensivas são causadas por patógenos prioritários, de acordo com a OMS, como o complexo *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, resistentes aos carbapenemas e a outros antimicrobianos. Essas infecções são mais difíceis de tratar e causam maior mortalidade e morbidade do que infecções relacionadas às cepas sensíveis aos antibióticos (70) (71).

K. pneumoniae resistente às cefalosporinas de terceira geração, fluoroquinolonas e aos aminoglicosídeos alcança taxas de infecção que vão até 60% na Europa, semelhante ao que ocorre com a taxa de resistência aos carbapenemas nesse continente (72). O mecanismo de resistência aos carbapenemas mais relatado é a produção de carbapenemases do tipo KPC-2 ou KPC-3 (73). Na Índia é relatada alta incidência desta espécie resistente aos carbapenemas, em torno de 60% (74). Já em países como Argentina e Brasil, a resistência a essa mesma classe é menor que 15%, porém isso se deve ao fraco sistema de vigilância, o que dificulta a construção de um cenário fiel da epidemiologia da resistência (75).

A resistência antimicrobiana no Brasil, especialmente em enterobactérias, é considerada um sério problema que necessita de ações urgentes, as quais incluem maiores medidas de controle de infecção e o uso mais criterioso dos antimicrobianos (39). Cepas de *E. coli* isoladas de pacientes com infecção urinária apresentaram frequência de 1,8% de AmpC (enzimas que degradam cefalosporinas e cefamicinas) plasmideal, sendo estas do tipo *bla*CMY-2 e *bla*CMY-4 (76). Em relação aos carbapenemas, KPC-2 é a variante mais disseminada pelo Brasil, sendo *K. pneumoniae* ST11 e ST437 (pertencentes ao complexo clonal 258) a espécie predominante (39).

A coprodução de NDM-1 e KPC-2 já foi descrita em espécies como *Providencia rettgeri* e *Enterobacter cloacae*, no Rio de Janeiro (77) (78). BKC-1, a carbapenemase descrita no Brasil (78), foi encontrada até o momento em espécies de *K. pneumoniae*, com seu respectivo gene localizado em um plasmídeo instável, pequeno (10 kb) e não conjugativo (79). De acordo com o nosso conhecimento, não foram realizados mais estudos investigando a presença dessa enzima em isolados clínicos e ambientais.

O gene da KPC geralmente está localizado em um transposon móvel de 10 kb, o *Tn4401*, localizado em plasmídeos conjugativos (80). *Tn4401* é composto por *bla_{KPC}*, o gene da transposase (*tnpA*), o gene da resolvase (*tnpR*) e duas sequências de inserção *ISKpn6* e *ISKpn7*, flanqueadas por duas sequências repetidas invertidas de 32 pb (80). Atualmente, existem sete isoformas do *Tn4401* já descritas (a-g), em função de deleções em regiões não codificantes *upstream* de *bla_{KPC}* (81) (82) (83). Uma nova isoforma recém-descrita, o *Tn4401h*, contém uma deleção de 188 pb na região promotora do gene, o que confere aumento nos níveis de expressão da carbapenemase (84).

A importância de *K. pneumoniae* é ressaltada por Wyres e Holt (85), ao afirmarem que essa espécie, além de representar um grande problema clínico, possui grande diversidade de genes de resistência e virulência, apresenta ampla distribuição ecológica, e é a espécie em que vários novos genes de resistência foram descobertos primeiramente (ex: KPC, OXA-48 e NDM-1). É sugerido que o gene que codifica para CTX-M, uma importante ESBL, foi mobilizado por *K. pneumoniae* a partir da bactéria ambiental *Kluyvera* (86) (87), e atualmente este gene encontra-se altamente disseminado no clone pandêmico ST131 de *E.coli* (88). Dessa forma, *K. pneumoniae* é considerada uma espécie chave que desempenha importante papel na aquisição, amplificação e disseminação de genes de resistência clinicamente importantes.

A colistina foi reintroduzida na prática clínica recentemente e tem sido utilizada como um antibiótico de “última escolha” no tratamento de infecções severas (89). Em 2015, Liu e colaboradores (90) descreveram a resistência plasmideal e mobilizável à colistina, através do gene *mcr-1*, em *E. coli* e *K. pneumoniae* isolados de porcos e humanos. Posteriormente, este gene foi

encontrado em diferentes plasmídeos, como IncI2, IncHI2 e IncX4 (91). Além disso, *mcr-1* já foi detectado em amostras clínicas de enterobactérias no Brasil, em coocorrência com outros genes de resistência, como KPC-2 (92), e já foi relatada sua presença em cepas de *E.coli* isoladas de praias do Brasil (93).

Além dos mecanismos enzimáticos descritos, *K. pneumoniae* conta com outras estratégias que contribuem para resistência aos antimicrobianos. Os sistemas de bombas de efluxo diminuem a concentração intracelular do antimicrobiano e os sistemas AcrAB e MdtK são os mais bem caracterizados nesta espécie (94). A bomba AcrAB-TolC é responsável pela resistência à quinolona, tetraciclina e cloranfenicol (95).

Já as porinas, como OmpK35 e OmpK36, são importantes para a passagem de compostos antimicrobianos hidrofílicos, através da membrana externa hidrofóbica, para atuarem em seus alvos intracelulares. Dessa forma, a perda das duas porinas leva a um aumento na resistência aos carbapenemas, ciprofloxacina e cloranfenicol (94).

O gênero *Raoultella*, pertencente à família Enterobacteriaceae, é composto pelas espécies *Raoultella terrigena*, *Raoultella planticola* e *Raoultella ornithinolytica*, das quais *R. planticola* e *R. ornithinolytica* são associadas à ação patogênica (96). A determinação da incidência desse gênero em infecções ainda é subestimada, em função da sua proximidade com *Klebsiella* spp. (97) (96). Na França, *R. ornithinolytica* foi agente causador de infecções graves, como meningites, osteomielite, pneumonia e abscessos cerebrais, apresentando alta resistência à ceftriaxona, e 5% de taxa de mortalidade associada à infecção e está associada a procedimentos invasivos(98).

No Brasil, amostras clínicas de *R. planticola* e *R. ornithinolytica* de um hospital maranhense foram todas positivas para o gene *bla*_{KPC} (99). Infecções nosocomiais na Turquia foram causadas por *R. planticola* produtora de ESBLs e carbapenemase do tipo *bla*_{OXA-48} (97). Os autores alertaram que a disseminação desses patógenos emergentes e multirresistentes é preocupante. Na China, foi detectada a presença do gene *mcr-1* em plasmídeo IncHI2 de *R. ornithinolytica* isolada de alface (100), além de ter sido feito o primeiro relato

de *mcr-1* em plasmídeo IncI2 em *R. planticola*, isolada de *swab* anal de cachorro e também em moscas (101).

1.4A origem dos genes de resistência aos antimicrobianos e sua presença no ambiente extra-hospitalar

A descoberta dos antibióticos há mais de 70 anos deu início a um período de desenvolvimento de novas drogas que aprimoraram não apenas a medicina humana, como também a criação de animais e a agricultura (52). A emergência de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, geralmente, é interpretada como um fenômeno moderno. Este conceito é reforçado pelo fato de que coleções de microrganismos isolados da era pré-antibiótica são altamente sensíveis a esses compostos (102). No entanto, estudos metagenômicos evidenciam a presença de genes de resistência (aos β -lactâmicos, tetraciclina e aminoglicosídeos) em sedimentos congelados de 30.000 anos atrás (52).

Genes putativos de resistência aos antimicrobianos são onipresentes no ambiente natural. Moléculas antimicrobianas apresentam inúmeras fontes, como: produto da degradação natural de polímeros, produtos de plantas, moléculas antibióticas produzidas por plantas e fungos. Além disso, o homem produz e libera no ambiente contaminantes orgânicos e inorgânicos, como: petróleo, solventes, resíduos da atividade industrial, lixo, metais pesados (mercúrio e arsênio) que, em larga escala, resultam na seleção de sistemas de efluxo bacterianos (103).

Os genes que codificam enzimas do tipo β -lactamases provavelmente apresentam distribuição mundial (7). Mutações dos genes que codificam essas enzimas levam à modificação de sua propriedade catalítica, aumentando o espectro de resistência (104). Um exemplo deste processo é a β -lactamase codificada pelo gene *bla*_{TEM} plasmideal que, através de mutações, gerou uma família de enzimas relacionadas (7).

Actinomicetos produtores de antibióticos possuem genes que codificam resistência aos compostos que eles produzem (7). Streptomicetos são conhecidos por serem produtores de uma variedade de β -lactamases que pode ser fonte de uma das formas de resistência clínica aos β -lactâmicos (105).

Os genes de resistência aos antibióticos (GRAs) naturais podem ser adquiridos a partir do contato com os microrganismos produtores destas substâncias, presentes no solo ou em outros ambientes (52) (106), ou podem ter evoluído no solo, a partir de um ancestral comensal humano (107). No entanto, a resistência a antibióticos recentes, sintéticos, pode ser devida à resistência cruzada ou aos genes constitutivos, que assumem essa função em um novo contexto de regulação (108).

Os GRAs são tão antigos quanto os antibióticos produzidos por bactérias, pelo simples fato de que bactérias produtoras de antibióticos devem ser resistentes às próprias moléculas que produzem (7). Um dos estudos mais antigos sobre resistoma revelou que bactérias formadoras de esporos isoladas de solo podem apresentar resistência até mesmo a antibióticos sintéticos, como trimetoprim e daptomicina (109), e também compartilham dos mesmos GRAs com patógenos humanos (106), com perfeita identidade nucleotídica.

O estudo sobre o resistoma oral e fecal de população isolada e sem contato prévio com antibióticos (Yanomamis na Venezuela) demonstrou a presença de 28 genes de resistência funcionais, como a ESBL *cbIA*, que confere resistência à cefalosporinas de quarta geração e monobactâmico sintético. O fato de populações sem contato prévio com antibióticos possuírem genes de resistência a antibióticos sintéticos em seu microbioma pode explicar a rapidez do surgimento da resistência clínica após a introdução de um novo composto (107).

A microbiota do solo representa uma origem evolutiva ancestral da resistência aos antimicrobianos e tem sido proposta como um reservatório disponível para intercâmbio de genes entre bactérias ambientais e patógenos clínicos (106). Dois exemplos bem documentados são os gêneros *Kluyvera* e *Shewanella* ambientais, que apresentam os genes *bla*_{CTX-M} (resistência aos β -

lactâmicos) e genes *qnrA* (resistência as quinolonas), respectivamente, com 100% de identidade aos mesmos genes presentes em patógenos, como *K. pneumoniae* (110).

A ESBL do tipo CTX-M foi detectada em amostras resistentes de origem clínica em 1990 e, na época, foi a primeira enzima capaz de hidrolisar de forma eficaz cefalosporinas de amplo espectro (111). Os genes codificadores dessas enzimas e suas variantes (cerca de 100 diferentes substituições de aminoácidos já foram identificadas) apresentam alto sucesso nas taxas de transferência horizontal, representando uma ameaça global (111).

As fluoroquinolonas foram introduzidas em 1987 e alguns especialistas afirmaram que a resistência a essa classe de inibidores de girase era improvável, pois, pelo menos 2 mutações deveriam ocorrer para gerar um fenótipo de resistência significativo (7). Entretanto, cepas com mutações no sítio alvo e com bombas de efluxo passaram a ser detectadas com maior frequência (112), além de cepas produtoras de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (*aminoglycoside N-acetyltransferases*) (113). Outro mecanismo transferível, não previsto, de resistência a esses antibióticos são as proteínas ligadoras de DNA, da família Qnr (114).

Os GRAs já foram amplamente explorados em ambientes aquáticos, como: esgotos, águas residuais hospitalares, de produção de animais e até água potável (115). Os genes mais comumente encontrados são *tet*, que conferem resistência a tetraciclina, *aac*, *aph*, e *ant*, que conferem resistência aos aminoglicosídeos e genes *bla*, que conferem resistência aos β -lactâmicos (116)(117). Esses dados sugerem o potencial de bactérias ambientais como um reservatório de genes de resistência e sua capacidade de influenciar patógenos humanos.

A microbiota intestinal de animais de criação de fazendas é certamente um reservatório de GRAs ainda mais complexo que o solo e os ambientes aquáticos, em função da maior frequência de exposição aos antimicrobianos (116). Muitos países, inclusive o Brasil, utilizam toneladas de antibióticos de última escolha na criação de animais. Estes compostos são usados de forma

terapêutica para tratar infecções clínicas, mas também são usados de forma profilática para prevenir doenças comuns (principalmente em animais criados em confinamento) e também são usadas doses subterapêuticas para estimular o crescimento animal (118)(119)(120).

Diversos estudos realizados no exterior, principalmente na China, evidenciaram a presença de bactérias resistentes em fazendas. Entre os principais mecanismos encontrados estão as bombas de efluxo, inativação do antibiótico e proteção celular (121)(122). No Brasil, pesquisas recentes mostraram bactérias multirresistentes isoladas de fezes de animais e água em fazendas, positivas para os genes *bla*_{CMY-M2}, *bla*_{TEM-1} e *qnrS* (123), bem como amostras isoladas de leite e fezes de animais produtoras de AmpC de amplo espectro (ESAC) (124).

Desde 1940, quantidades crescentes de antibióticos são sintetizadas, usadas clinicamente, liberadas no ambiente e amplamente disseminadas, promovendo constante pressão de seleção e manutenção de populações de cepas resistentes (7). Além disso, o descarte em larga escala de resíduos tóxicos, metais, desinfetantes, biocidas e antibióticos formam quantidades inestimáveis de xenobióticos, que são liberados no meio ambiente. O fato de muitos destes compostos químicos serem resistentes à biodegradação agrava ainda mais o problema (7).

A disseminação de genes de resistência no ambiente extra-hospitalar ocorre através da troca de plasmídeos, tanto entre bactérias Gram-positivas e entre bactérias Gram-negativas (125). Experimentos sugerem que a transferência de genes por conjugação ocorre em taxas muito mais elevadas do que as que ocorrem em laboratório, especialmente no trato digestório humano e animal (126).

Acinetobacter spp. é altamente competente em adquirir DNA do ambiente e pode intermediar a transmissão dos genes adquiridos para cepas clínicas (127). Além dos mecanismos de evolução e transmissão de genes de resistência descritos, outros também podem ocorrer, como a fusão bacteriana célula-célula em comunidades microbianas mistas, como os biofilmes (128).

Nesse sentido, torna-se claro que a resistência aos antimicrobianos é inevitável. Muitas medidas de controle têm sido propostas por órgãos de saúde internacionais, como OMS e CDC. Dentre estas, o controle restrito de utilização humana dos antimicrobianos, a prescrição controlada de receitas (não prescrição em casos de resfriados e infecções virais) e o uso terapêutico controlado na criação de animais e na agricultura (7).

1.5 A relação entre resistência e virulência em bactérias

Apesar de os mecanismos moleculares de virulência e resistência a antimicrobianos serem diferentes, há interseções entre eles. Alguns fatores de virulência e genes de resistência são codificados pelos mesmos elementos genéticos móveis; em outros casos, respostas bacterianas como a ativação do sistema SOS ativam e/ou facilitam a disseminação de mecanismos de resistência e virulência. Ainda, o acúmulo de determinados metabólitos bacterianos está associado tanto à formação de biofilmes (virulência), quanto à tolerância a beta-lactâmicos (resistência) (129).

A resistência elevada é associada, na maioria dos casos, à diminuição da virulência e do *fitness* bacteriano. No entanto, evidências têm mostrado o oposto: em que essa associação é benéfica ao patógeno, o que aumenta o problema de saúde pública (129). Um grande arsenal de fatores de virulência pode coexistir em clones de *E. coli* produtores de ESBLs, como CTX-M, e carbapenemases, como NDM-1 (130) (131). Estudos que relacionam resistência e virulência em isolados clínicos e ambientais ainda são escassos, principalmente no Brasil.

A multirresistência e hipervirulência simultâneas têm sido relatadas, principalmente na China. Tais trabalhos relataram cepas do sorotipo K1, produtoras de ESBL, como CTXM-15, causando infecções e abscessos hepáticos graves (132). Ademais, Yao e colaboradores (133) mostraram a presença de KPC-2 em cepas hipervirulentas (hipermucoviscosas) adquiridas

na comunidade, enquanto Gu e colaboradores (134) relataram a presença do gene *mcr-1* em cepa hvKp, proveniente de diarreia infantil, também na China.

No Brasil, amostras de pacientes e de dispositivos clínicos revelaram que a maioria dos isolados de *K. pneumoniae* é multirresistente, em função da produção de bomba de efluxo (AcrAB), perda de porinas como OmpK35 e OmpK36, e produção de blaKPC e *bla*_{OXA-1}. Além disso, genes de virulência como *fimh-1* e *mrkD* (codificam adesinas das fímbrias do tipo 1 e 3) também foram encontrados (135).

Outros estudos ressaltaram a importância de se estudar isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos β -lactâmicos e carbapenemas e com perfil hipervirulento (hipermucoviscoso), uma vez que estão associados a altas taxas de mortalidade (136) (137).

1.6 Dípteros muscoides sinantrópicos como veiculadores de bactérias resistentes

Na literatura científica, percebe-se que vem crescendo o número de estudos que evidenciam a relação entre espécies de moscas sinantrópicas, especialmente aquelas pertencentes aos gêneros *Chrysomya* sp. (Diptera: Calliphoridae) e *Musca* sp. (Diptera: Muscidae), e problemas de saúde pública, principalmente em populações mais pobres e com condições sanitárias deficientes. Moscas varejeiras e domésticas são os primeiros insetos a colonizarem uma carcaça em decomposição. Além disso, alimentam-se, reproduzem-se e depositam seus ovos nesse ecossistema efêmero (138). Conseqüentemente, adquirem grande parte dos microrganismos desses ambientes e ainda causam sua dispersão em função de sua sinantropia (139) (140) e grande alcance de voo (141) (142).

Os antimicrobianos são extremamente utilizados, tanto na saúde humana quanto na criação de animais (34). Em função disso, a resistência é disseminada para os mais diversos ambientes interligados, tais como: solo,

esgotos sanitários, residências, restaurantes, comunidade em geral, sendo os dípteros muscoides aqueles que frequentam todos esses ambientes e por isso podem atuar como um dos principais agentes de disseminação e dispersão (143).

A presença de bactérias portadoras de resistência aos antimicrobianos em insetos começou a ser pesquisada com maior interesse na última década no contexto rural, onde essas drogas estão presentes em excretas de animais (144). Literak e colaboradores (145) encontraram cepas de *E. coli* multiresistentes próximas à criação de porcos e Blaak e colaboradores (146) detectaram *E. coli* produtoras de ESBL em moscas de aviários. Zhang e colaboradores (147), por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) quantitativa, revelaram a presença do gene *mcr-1* em moscas domésticas e varejeiras coletadas em uma universidade chinesa.

Amostras resistentes à cefalosporina foram isoladas de moscas e fezes de gado, sendo parte das cepas positivas para o gene *bla*_{CTX-M-15}, contido em plasmídeos transferíveis; destas, todas pertenciam aos mesmos grupos filogenético e clonal (148).

Songe e colaboradores (149) coletaram moscas em mercados de peixe, em Zâmbia, e isolaram *Salmonella* spp. e *E. coli* enteropatogênica, produtora de ESBLs, dos insetos. No Irã, *Musca domestica* foi coletada em alta quantidade em locais como: cozinhas residenciais, fazendas de gado e de frango, hospitais veterinário e humano. Dos insetos coletados, 11,3% eram positivos para *K. pneumoniae*, resistente aos antibióticos ampicilina, amoxicilina, cefotaxima e piperaciclina e em menor grau ao imipenem (150). Moscas coletadas em ambientes hospitalares no Irã apresentaram maior taxa de resistência aos antibióticos quando comparadas às bactérias provenientes de ambientes não hospitalares, alertando para a necessidade do controle do uso dos antibióticos e também para o controle desses insetos (151).

Nessa perspectiva, a proliferação de espécies bacterianas (*E. coli*, *E. faecalis*, *Aeromonas hydrophila* e *P. aeruginosa*) no trato digestório de moscas sinantrópicas, após sua alimentação, foi relatada (152) (153) (154). Ademais,

foi observada a transferência de genes de toxinas e genes de resistência a certos antimicrobianos (toxina Shiga e gene *tetM*, respectivamente) no intestino de moscas domésticas (155) (156).

De acordo com a Fundação Americana de Veterinária Médica, a definição básica do conceito de Saúde Única (*One Health*) seria o esforço colaborativo de múltiplas disciplinas para o alcance de ótima saúde para os humanos, os animais e para o meio ambiente (157). Nesse sentido, a resistência aos antimicrobianos está claramente conectada a esses três objetivos, sendo os insetos agentes de dispersão dessa resistência entre diferentes ambientes.

Na literatura científica, há inúmeros relatos de bactérias portadoras de genes de resistência. Isso sugere que os problemas de resistência em hospitais podem ter suas origens no ambiente extra-hospitalar. As amostras de bactérias ambientais, em países em desenvolvimento e carentes em relação a saneamento básico, como o Brasil, podem ser tão importantes quanto as amostras hospitalares.

Doses longas e subterapêuticas de antibióticos usadas na criação animal produzem condições ideais para que as bactérias adquiram, fixem e repassem genes de resistência, podendo chegar a patógenos humanos ou à microbiota humana, através de comida contaminada e, inclusive, através de insetos (143) (158). Assim, pesquisas que integrem homem, animal e ambiente são essenciais para o rastreamento da resistência e para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle.

1.7 Mecanismos moleculares de disseminação dos genes de resistência

Bactérias resistentes aos antimicrobianos são a maior causa de infecções associadas às internações no mundo. Além das infecções relacionadas com a assistência à saúde (IRAS), a resistência também é

encontrada no ambiente extra-hospitalar (7) (159). A captura, o acúmulo e a disseminação dos genes de resistência ocorrem em função dos elementos genéticos móveis (*mobile genetic elements - MGE*), que podem promover a mobilidade intracelular do DNA (do cromossomo para o plasmídeo ou entre plasmídeos), ou de forma intercelular (159).

Sequências de inserção (IS) e Transposons (Tn) são sequências de DNA capazes de se mobilizarem pelo genoma, no mesmo local ou em locais diferentes, podendo carrear genes de resistência associados. Já os integrons (In) promovem a aquisição de genes cassetes através da recombinação sítio específica. Estes elementos genéticos, por serem móveis, podem estar presentes em múltiplas cópias e em diferentes locais ao longo do genoma e, podem promover a recombinação homóloga (troca de sequências entre segmentos idênticos ou relacionados) (159).

A troca genética entre células diferentes (intercelular) pode ocorrer através de: conjugação/mobilização (mediada por plasmídeos e elementos integrativos conjugativos), transdução (mediada por bacteriófagos) e transformação (aquisição de DNA extracelular). A integração entre todos esses mecanismos garante a evolução microbiana e facilita o desenvolvimento da resistência antimicrobiana (159).

1.7.1 Sequências de inserção e transposons compostos

Sequências de inserção (IS) geralmente são pequenos elementos que carregam um ou dois genes de transposase (*tnp*) que podem ser classificados em grupos, de acordo com os motivos (aminoácidos) do sítio ativo das transposases. Estes elementos também podem ser classificados em relação à forma como ocorre a transposição: de forma conservativa (mecanismo “corta e cola”, em que a IS sai do genoma doador e se insere no genoma receptor), de forma replicativa (mecanismo “copia e cola”, em que IS é replicada do doador para o receptor na forma de um cointegrado, que depois é resolvida, originando uma nova cópia do elemento) e, ainda, um mecanismo “copia, cola e cola”, em

que a IS é replicada em um intermediário circular dupla fita, que se integra ao receptor (160) (161).

A maioria destes elementos é flanqueada por repetições invertidas (IR), denominadas IR esquerda e IR direita. Além das IS únicas que mobilizam um ou mais genes adjacentes, especialmente em bactérias Gram-negativas, estes elementos podem mover genes de resistência, como parte de um transposon composto, flanqueado por duas cópias da mesma (ou semelhante) IS. As IS carregam um promotor forte, que garante a expressão dos genes mobilizados (162) (163). As principais IS e transposons compostos responsáveis pela disseminação de genes de resistência em bactérias Gram-negativas estão representadas na Tabela 3 (159).

Tabela 3: Alguns exemplos de sequências de inserção e transposons compostos associados a genes de resistência em bactérias Gram-negativas.

IS	Tn	Gene de resistência	Resistência
IS1	Tn9	<i>catA1</i>	Cloranfenicol
IS10	Tn10	<i>tet(B)</i>	Tetraciclina
IS26	Tn4352	<i>aphA1</i>	Canamicina
IS256		<i>Cfr</i>	Fenicols, lincosamidas e oxazolidinonas
IS50	Tn5	<i>aph(3=)-Ila-ble-aph(6)-Ic</i>	Canamicina, bleomicina, estreptomicina
IS903	Tn903	<i>aphA1</i>	Canamicina
IS199	Tn1999	<i>bla_{OXA-48-like}</i>	Carbapenemas
IS <i>Apl1</i>	Tn6330	<i>mcr-1</i>	Colistina
IS <i>Aba1</i>	Tn2006	<i>bla_{OXA-23}</i>	Carbapenemas
IS <i>Aba125</i>	Tn125	<i>bla_{NDM}</i>	Carbapenemas
IS3000	Tn3000	<i>bla_{NDM}</i>	Carbapenemas

1.7.2 Transposons únicos

Transposons únicos são tradicionalmente caracterizados como elementos maiores que os elementos IS, flanqueados por um par de IR ao invés de um par de IS, um gene de transposase e genes de resistência associados. No entanto, essa distinção entre elementos IS/Tn está se tornando

mais problemática, pois existem IS carreando genes de resistência com nomenclatura de elementos Tn, e existem elementos Tn, que não carregam genes, que recebem nomenclatura de IS (159).

Genes de resistência aos antimicrobianos geralmente estão associados a uma grande família do elemento, denominada família Tn3, que geralmente se encontra associado a IR terminais de 38pb e a uma transposase que geralmente é maior do que as de elementos IS, além de gene de resolvase (*tnpR*), um sítio de resolução (*res*), e a transposição ocorre via mecanismos replicativo (159).

O Tn4401, que carrega variantes do gene *bla_{KPC}*, faz parte da família Tn3, porém apresenta uma composição diferente, uma vez que é flanqueado pelas sequências IS*Kpn7* (*upstream*) e IS*Kpn6* (*downstream*), entre as sequências IR. Diversas isoformas desse transposon já foram descritas (164) (159).

1.7.3 Integrons e genes cassetes

Um gene cassette é um pequeno elemento móvel (0,5 a 1kb), formado por um ou dois genes, sem promotor e associado a um sítio de recombinação *attC*. Genes cassetes podem existir de forma circular e livre, mas na maioria das vezes estão associados a um integron, formado por um gene de integrase (*intI*), um sítio de recombinação (*attI*) e um promotor (Pc). A integrase (tirosina recombinase) insere o gene cassette no integron, seguindo uma orientação para que este possa ser expresso pelo promotor Pc. Diferentes genes cassetes podem ser inseridos ao integron, geralmente associados a resistência antimicrobiana (159) (165).

1.7.4 Plasmídeos de resistência aos antimicrobianos

Plasmídeos são importantes elementos genéticos extra cromossomais, que podem carrear ampla diversidade de elementos genéticos móveis e genes de resistência aos antimicrobianos, tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (166). Possuem capacidade de autorreplicação e podem ser

passados a uma população bacteriana por transferência vertical e por transferência horizontal (conjugação) (159).

Plasmídeos conjugativos possuem mecanismos genéticos complexos que permitem sua transferência, como genes *tra* (transferência), genes para proteínas *mating pair* (proteínas MPF), assim como proteínas DTR (*DNA transfer replication*), que fazem o processamento do DNA plasmideal. Alguns plasmídeos não conjugativos podem ser horizontalmente transferidos utilizando este aparato de outro plasmídeo, presente na mesma célula (166). Em enterobactérias, por exemplo, plasmídeos de resistência pode ser grandes, de 200Kb e geralmente conjugativos, ou pequenos, geralmente mobilizáveis (159).

Já os plasmídeos epidêmicos são de grande importância, pois, além de carregarem diversos genes de resistência, são encontrados em diferentes países, em bactérias de diferentes origens e fontes. Atualmente, *Inc/rep typing* é o esquema mais utilizado para tipagem plasmideal, baseado nos grupos de incompatibilidade. Foram descritos 28 grupos Inc em enterobactérias, 14 em *Pseudomonas* e, aproximadamente 18 em *Staphylococcus* (167).

De acordo com Dolejska e colaboradores (2018), plasmídeos de importância clínica, carregando genes de resistência aos carbapenemas, aminoglicosídeos e polimixinas estão amplamente disseminados em bactérias de origem ambiental, como animais de companhia e animais selvagens (168).

1.8 Métodos de identificação bacteriana

1.8.1 Sequenciamento do gene 16S rRNA

O gene 16S rRNA é utilizado em taxonomia e filogenia bacteriana por três motivos, tais como sua presença em quase todas as bactérias, existindo em operons ou famílias multigênicas; sua função inalterada ao longo da evolução; e o seu tamanho (1500 pb), que é suficiente para o uso de ferramentas informáticas. Este gene possui regiões variáveis suficientes que permitem o seu uso na identificação de bactérias, propriedade também vista no gene *rpoB* (169).

O sequenciamento do gene 16S rRNA é uma ferramenta muito útil na taxonomia de bactérias que não são facilmente identificadas pelos métodos convencionais, com taxas de identificação de >90% em nível de gênero e 65-83% em nível de espécie. Além disso, é um método que reduz o tempo necessário para a identificação de bactérias de crescimento lento, como as micobactérias, que podem levar de 6 a 8 semanas para crescer em meios de cultura convencionais, e que possibilita a identificação de microrganismos não cultiváveis (170).

1.8.2 Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz com análise de tempo de voo

A técnica de *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDITOF-MS) permite identificação microbiana, caracterização e tipagem. A partir de uma única colônia bacteriana, é possível obter um perfil proteico para um determinado microrganismo, em pouco tempo. É uma ferramenta que requer um alto custo inicial, mas que reduz o tempo necessário na identificação bacteriana reduzindo, conseqüentemente, o custo de análise por amostra (171).

Esta técnica consiste num sistema no qual uma colônia isolada de um microrganismo é colocada sobre uma placa de matriz polimérica, a qual receberá uma radiação por laser, vaporizando a amostra e ionizando várias

moléculas. Estas moléculas são aspiradas num tubo de vácuo e levadas a um detector: o tempo de chegada ao detector (tempo de voo - *time of flight*) varia de acordo com a molécula. As variações são registradas graficamente como picos, que são específicos para cada espécie bacteriana. Os resultados são interpretados com o auxílio de uma base de dados computadorizada (171).

Diagnósticos microbiológicos complexos, como de estafilococos coagulase negativos ou dos sorovares de *Salmonella enterica* são facilitados por este método. Os bancos de dados tendem a ficar mais completos quanto mais esta técnica for utilizada. Uma desvantagem é que estes bancos de dados não são públicos, porém apresentam uma melhor acurácia nas suas atualizações (172). Esta técnica já foi utilizada na identificação de bactérias ambientais nas mais variadas amostras, como: esponjas-do-mar, água, solo, lama, raízes e rizosfera (171).

1.8.3 Tecnologias de sequenciamento de nova geração

Tecnologias de sequenciamento de DNA existem desde 1970; entretanto, a complexidade da técnica, o elevado custo de sua elaboração na época e a utilização de reagentes tóxicos limitaram seu uso (173). O método de terminação de cadeia, desenvolvido posteriormente por Sanger, consolidou a base da primeira geração de sequenciamento de DNA automatizado, utilizado nos laboratórios de microbiologia clínica. Este método é capaz de gerar fragmentos de 500 a 1.000 pb com alta qualidade (174). No entanto, o sequenciamento total (*whole genome sequencing* –WGS), através desta técnica, seria inviável, em função do alto custo e do tempo que levaria para ser feito. Nesse sentido, a necessidade de tecnologias de sequenciamento de alta vazão surgiu e foi intensificada com o início do Projeto Genoma Humano, em 1990 (173).

A partir dos anos 2000, novas metodologias de sequenciamento foram desenvolvidas e passaram a ser utilizadas pelos laboratórios de microbiologia clínica, reduzindo os custos e o tempo, inerentes à técnica. Além disso,

eventos drásticos, como a epidemia de Cólera no Haiti em 2010 (175) e o surto internacional de *E. coli* O104:H4, associado ao consumo de brotos de feno em 2011 (176), aumentaram ainda mais a necessidade não apenas da identificação taxonômica, mas também de entender as dinâmicas de transmissão e aspectos da virulência destes patógenos.

A introdução do pirosequenciamento, através da plataforma 454 *Life Sciences* (Branford, CT, USA) em 2005, iniciou a segunda geração de sequenciadores automáticos. Essa tecnologia permitiu a geração de milhares a milhões de fragmentos em uma única corrida, sem a necessidade de clonagem. A plataforma *Illumina* ocupa a maior parte do mercado relacionado a NGS no mundo e é baseada no sequenciamento por síntese da fita complementar, e na detecção por fluorescência de nucleotídeos terminadores de cadeia. Os equipamentos MiniSeq e MiSeq oferecem médio rendimento por amostra, preço acessível e fluxo de trabalho considerado moderado (173).

A plataforma *IonTorrent Thermo Fisher* (Waltham, MA, USA) também é baseada no sequenciamento por síntese, porém a detecção é feita através da detecção do pH, em função da liberação dos íons hidrogênio durante a polimerização do DNA. Esta plataforma gera fragmentos *single-ends*, que são maiores do que os fragmentos gerados pelo *Illumina* (173).

As plataformas de sequenciamento de terceira geração foram desenvolvidas para superar as limitações das plataformas de segunda, como o pequeno tamanho dos fragmentos gerados. Essas tecnologias analisam diretamente uma molécula de DNA, sem a necessidade de prévia amplificação por PCR, como, por exemplo, a plataforma *PacBio RSII* (Menlo Park, CA, USA), que utiliza tecnologia de sequenciamento, em tempo real, de uma única molécula. São gerados fragmentos de 20 Kb, e até maiores, em corridas que duram poucas horas. No entanto, o rendimento por amostra é baixo e seu custo é elevado (173).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigação do potencial de dípteros muscoides sinantrópicos como veiculadores de bactérias resistentes aos antibióticos β -lactâmicos de importância clínica, assim como aos aminoglicosídeos e colistina.

Objetivos Específicos

- Isolar, a partir de dípteros muscoides sinantrópicos, coletados próximos à Fiocruz, à Quinta da Boa Vista e a um hospital municipal, bactérias resistentes aos antibióticos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e polimixina;
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras bacterianas isoladas;
- Identificar, por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e MALDITOF-MS, as espécies bacterianas presentes em dípteros muscoides;
- Investigar a presença de genes de resistência, ambiente genético dos genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} e, ainda, integrase de integron de classe 1 nas amostras resistentes aos antimicrobianos avaliados;

- Determinar o polimorfismo genético das amostras resistentes através das técnicas de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e tipagem por sequenciamento de múltiplos *loci* (MLST);
- Caracterizar os plasmídeos carreadores dos genes de resistência, através de técnicas moleculares, como extração plasmideal e hibridização.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Método de coleta dos dípteros muscoides, pontos de coleta, triagem e identificação:

Os insetos foram coletados com o auxílio de recipiente plástico, rede entomológica e/ou armadilha feita a partir de garrafa plástica, contendo isca atrativa (carne bovina putrefata, com mais de 24 h de decomposição em temperatura ambiente) em seu interior. As coletas foram realizadas nos anos de 2014, 2015, 2016 e 2017 em diferentes pontos da cidade do Rio de Janeiro. Os pontos de coleta foram selecionados em função das distâncias entre eles e de sua proximidade, ou não, a hospitais públicos e privados do Rio de Janeiro. Os pontos selecionados foram: **Ponto 1**- Comunidade do Amorim, em Manguinhos, próxima ao Campus da Fiocruz (Figura 3), **Ponto 2** – Interior do prédio de um Instituto no campus da Fiocruz (Figura 4), **Ponto 3** - Quinta da Boa Vista, em frente ao Hospital Quinta D'Or e **Ponto 4** - Interior de um hospital municipal secundário, localizado na Zona Norte da cidade (Figura 5).

A coleta no Ponto 4 foi realizada no interior do hospital em questão, em um pátio onde havia três *containers* para armazenar os resíduos comuns, resíduo orgânico e o resíduo hospitalar, separadamente. Além disso, também foi feita a coleta em um ponto externo ao hospital (**Ponto 5**), a 100 metros de distância aproximadamente, onde havia uma caçamba de resíduo doméstico utilizada pelos moradores do local. A Tabela 4 resume os pontos de coleta estudados, os materiais utilizados para coleta e suas coordenadas geográficas.

As coletas foram realizadas utilizando-se pote plástico sem isca atrativa e pote plástico contendo em seu interior outro pote menor com isca atrativa, este coberto por escaline. Os potes foram posicionados próximos às caçambas de resíduos, para que as moscas pousassem e, em seguida, fossem aprisionadas dentro deles. A rede entomológica foi utilizada nas caçambas onde havia alta concentração de insetos sobrevoando. Após a captura, os insetos foram individualmente alocados em tubos de ensaio de vidro

autoclavados. Também foram utilizadas armadilhas feitas de garrafa plástica, pintadas de preto, para evitar a passagem de luz, uma vez que dípteros possuem fototaxia positiva. Pequenos cortes na parte lateral foram feitos para possibilitar a entrada dos insetos e, na parte superior, foi amarrado um saco plástico transparente, para imobilização dos dípteros. Estas armadilhas foram posicionadas nos Pontos de coleta e retiradas após 24h.

Imediatamente após a coleta dos insetos, estes foram alocados individualmente em tubos de ensaio previamente esterilizados e nomeados de acordo com o ponto de coleta. Os insetos foram transportados ao Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF) do Instituto Oswaldo Cruz, anestesiados a 0°C em *freezer*, identificados e manipulados apenas através do tubo de ensaio de vidro, com o auxílio de microscópios de campo claro e estereoscópicos, utilizando-se chaves dicotômicas para a identificação de Dípteros (177). As coletas nos pontos 1, 2 e 3 foram realizadas pelos alunos Jéssica Gonçalves e Jonathan Lopes, e as coletas nos pontos 4 e 5 foram realizadas pelas alunas Nahara Leite e Isabel Carramaschi.

Tabela 4: Descrição de cada ponto de coleta e material utilizado para a coleta.

Pontos	Descrição do Ponto de coleta	Material utilizado para coleta
1 Comunidade do Amorim	Caçamba de resíduo doméstico aberta, localizada na Comunidade do Amorim, próxima a um dos acessos à Fiocruz.	Pote plástico com isca atrativa, armadilha de garrafa <i>pet</i> contendo isca atrativa e rede entomológica
2 Fiocruz	Prédio de um Instituto no campus da Fiocruz.	Pote plástico sem isca atrativa
3 Quinta da Boa Vista	Quinta da Boa Vista, em frente ao Hospital Quinta D'or.	Pote plástico com isca atrativa
4 Hospital municipal secundário	Hospital localizado na Zona Norte. Foram realizadas coletas em área aberta dentro do hospital, nas caçambas de resíduo comum e resíduo hospitalar.	Armadilha de garrafa <i>pet</i> contendo isca atrativa e rede entomológica
5 Ponto externo ao Hospital municipal secundário	Caçamba de resíduo doméstico aberta, localizada a aproximadamente 100 metros do Hospital municipal secundário.	Armadilha de garrafa <i>pet</i> contendo isca atrativa e rede entomológica

Os pontos de coleta podem ser visualizados nas figuras abaixo.



**Figura 3: Ponto 1 de coleta - Caçamba de resíduos sólidos na Comunidade do Amorim.
Fonte: Lorrane Andrade Pereira.**



Figura 4: Ponto 2 de coleta – Interior de um prédio de um Instituto da Fiocruz.



Figura 5: Ponto 3, Quinta da Boa Vista. Foto retirada do site <https://oglobo.globo.com/rio/ibama-diz-que-rave-na-quinta-da-boa-vista-pode-matar-animais-do-zoo-20239552>.

A



A



B

Figura 6: A: Ponto de Coleta 4 - Área aberta de destinação de resíduos sólidos (orgânico, comum e hospitalar) do hospital municipal secundário, Zona Norte do Rio de Janeiro. B: Área de acomodação de resíduo sólido comum, momentos antes da retirada dos resíduos. Fonte: Acervo pessoal.



Figura 7: Local onde ocorre acúmulo de resíduo sólido doméstico, localizado no Ponto 5. Imagem de satélite retirada do Google Maps em 12 de agosto de 2019.



Figura 8: Ponto 5 externo ao hospital (100 metros de distância), mostrando a coleta de dipteros muscoides e a armadilha feita de garrafa plástica. Fonte: acervo pessoal.

3.2 Isolamento bacteriano

Após a identificação dos dípteros muscoides provenientes dos pontos 1, 2 e 3, estes foram macerados em microtubos estéreis do tipo *Eppendorf* 1,5mL contendo tampão PBS, com o auxílio de pistilos estéreis e descartáveis. Esta etapa foi realizada em cabine de segurança biológica. Após macerados, estes foram diluídos até 10^{-4} (diluição seriada), plaqueados em meio Ágar Nutriente (Merck) sem antimicrobiano e, paralelamente, foram plaqueados no mesmo meio contendo ceftriaxona (1 mg/L).

O isolamento bacteriano a partir dos dípteros muscoides provenientes dos Pontos 4 e 5 foi feito de duas formas diferentes. Na primeira coleta, os dípteros identificados foram macerados em tampão PBS, diluídos até 10^{-4} e plaqueados em AN, AN contendo ceftriaxona (1mg/L), Ágar Sangue (AS) e Ágar MacConkey (AM). Já na segunda coleta realizada no Ponto 4, após a identificação, os dípteros foram transferidos para tubos contendo 1 mL de tampão PBS; então, foram homogeneizados em agitador, para a realização de análise de perfil bacteriológico presente na superfície externa das moscas. A partir deste extrato, foram feitas diluições em série até 10^{-4} , tendo sido esta última inoculada em placas de AN contendo ceftriaxona (1 mg/L), ágar *Eosin Methylene Blue* (EMB) e ágar EMB contendo polimixina B (8 mg/L), e incubadas aerobicamente a 37°C.

Comumente a todas as etapas, após o crescimento foi feita a quantificação das colônias, através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Representantes das diferentes colônias foram subcultivados no mesmo meio para obtenção de culturas puras. As diferentes colônias isoladas foram purificadas, em seu respectivo meio de isolamento e estocadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI - Merck) com 20% de glicerol (Sigma) a -20°C. Para análise das características morfotintoriais das colônias purificadas foi realizada a coloração de Gram (178).

Além das amostras isoladas a partir de dípteros muscoides, foram utilizadas neste estudo amostras provenientes de material clínico, isoladas de pacientes internados no mesmo hospital municipal, onde foram feitas as coletas dos insetos. As amostras de origem clínica nos foram cedidas pela equipe do Laboratório de Bacteriologia do Hospital. Um total de 16 cepas foi incluído neste estudo e, foram isoladas durante o ano de 2019, a partir de materiais clínicos como sangue, urina e *swab* retal. As cepas foram previamente identificadas pela equipe do Laboratório de Bacteriologia do Hospital e, tiveram seu perfil de resistência aos antimicrobianos determinado pelo equipamento *Vitek*.

3.3 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos.

3.3.1 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) por disco difusão

A partir de cultura recente em AN (Merck) foram selecionadas de uma a duas colônias para obtenção de uma suspensão padronizada, em solução de salina fisiológica, com turbidez equivalente ao padrão 0,5 na escala de MacFarland. Esta suspensão foi semeada em toda a superfície do meio Agar Mueller-Hinton (AMH), para obtenção de crescimento semi-confluyente. Após no máximo 15 min, foram aplicados os discos de antimicrobianos, mantendo-se um espaço de, no mínimo, 2,5 cm entre eles. Após aplicação dos discos, as placas foram incubadas em estufa a 37°C, em aerobiose por 18-24 h e, após esse período, foram avaliados os diâmetros dos halos de inibição para cada antimicrobiano, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2017(179) e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), 2019 (44). Como controle do teste, foi utilizada a cepa *E. coli* ATCC 25922.

De acordo com O CLSI 2017 (179), foram utilizados os valores de corte para Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp.,

Stenotrophomonas maltophilia, *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. A análise das cepas identificadas como *Pseudomonas* spp. (não *aeruginosa*) foi realizada utilizando-se os valores de corte para os halos de inibição, de acordo com o EUCAST, 2019 (44). As espécies bacterianas que não possuem parâmetros de acordo com estes documentos não foram classificadas.

3.3.2 Determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos através de sistema automatizado

As amostras bacterianas isoladas de dípteros muscoides, que apresentaram perfil de resistência aos antimicrobianos através do TSA e positividade para algum gene de resistência estudado, foram submetidas à análise automatizada pelo BD Phoenix Automated Microbiology System (BD Diagnostics), para determinação da CIM. O painel de antimicrobianos analisado por esse sistema é formado por: Amicacina, Ampicilina, Ampicilina-Sulbactam, Cefazolina, Cefepima, Cefoxitina, Ceftazidima, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Colistina, Ertapenem, Gentamicina, Imipenem, Levofloxacina, Meropenem, Piperaciclina-Tazobactam, Tigeciclina, Trimetropim-Sulfametoxazol (180). As amostras foram enviadas ao Departamento de Patologia, do Hospital Antônio Pedro (Universidade Federal Fluminense), onde foram analisadas.

3.3.3 Análise de perfil de multirresistência

O critério de multirresistência utilizado foi o definido por Magiorakos e colaboradores em 2012 (40), no qual é definida como multirresistente a enterobactéria com resistência a pelo menos um antimicrobiano em três classes diferentes a seguir: aminoglicosídeos, cefalosporinas de amplo espectro, penicilinas associadas a inibidores de beta-lactamases, carbapenemas, fluoroquinolonas, inibidores da via do folato, glicilciclina e ácidos fosfônicos, com base nos resultados obtidos no teste de difusão em Ágar.

3.4 Teste de inativação de carbapenema modificado (mCIM)

Amostras de Enterobacteriaceae, isoladas a partir de dípteros muscoides e a partir de material clínico, que apresentaram perfil de resistência aos antimicrobianos através do TSA e positividade para algum gene de resistência estudado, foram submetidas ao *CIM Test* modificado. Após crescimento por uma noite em meio de cultura em placa, uma alça do crescimento foi inserida em 2 mL de meio TSB (Caldo *Tryptic Soy*) e agitado em agitador por 10 - 15 seg. Depois, um disco de meropenem (10 µg – Sensifar) foi inserido no tubo, com auxílio de uma pinça estéril, e esse foi incubado a 37°C por 2 h. Uma suspensão 0,5 na escala McFarland da cepa *E. coli* ATCC® 25922 (cepa controle suscetível ao meropenem) foi preparada em salina estéril e inoculada em placas de AMH, de modo a permitir a formação de um tapete após o crescimento. Posteriormente, o disco de meropenem foi retirado da suspensão e colocado na placa de AMH contendo a cepa controle e, esta foi incubada por uma noite a 37°C. Após o crescimento, os halos de inibição foram medidos e interpretados, de acordo com o CLSI (179), sendo amostras positivas para carbapenemase, as que resultaram em um halo de 6-15mm ou apresentaram colônias em um halo de 16-18mm.

3.5 Teste de inativação do carbapenema com EDTA (eCIM)

As amostras bacterianas positivas para o teste mCIM foram submetidas ao método do eCIM. Cada amostra, após crescimento por uma noite a 37°C foi inoculada em um tubo contendo 1 mL de caldo TSB, no qual foram adicionados 10 µL de quelante EDTA 0,5 M. A partir da semeadura das colônias em *Tryptic Soy Agar*, uma alçada das colônias foi transferida para o tubo. Posteriormente, um disco contendo 10 µg de meropenem (Sensifar) foi imerso na suspensão e incubado a 37°C por 4 h. Após incubação, o disco foi removido da suspensão e colocado numa placa de AMH inoculada com a cepa *E. coli* sensível (ATCC 29522) e, subsequentemente, incubada a 37°C por 18 a 24h. A suspensão

contendo a cepa de *E. coli* sensível foi ajustada ao padrão de turvação 0,5 da escala de McFarland.

De acordo com o CLSI (2019), o teste eCIM só deve ser interpretado caso o mCIM apresente resultado positivo para a produção de carbapenemases. Dessa forma, o isolado submetido ao eCIM será considerado produtor de metalo-beta-lactamase, caso apresente uma diferença maior ou igual a 5 mm de diâmetro entre o halo do teste mCIM e o halo do teste eCIM, ignorando-se a presença de colônias em qualquer região do halo do teste eCIM. A amostra produtora de metalo-beta-lactamase terá sua enzima inativada pela ação do EDTA, e o meropenem presente no disco não será hidrolisado. Dessa forma, o halo produzido pelo antimicrobiano na *E. coli* sensível deve ser maior do que o encontrado na ausência de EDTA.

3.6 Identificação bacteriana

3.6.1 MALDITOF-MS

Os perfis proteicos foram obtidos em duplicata, a partir das culturas bacterianas puras. Aproximadamente, 10^5 células microbianas foram depositadas em cada poço amostral na placa metálica fornecida pelo fabricante do equipamento MALDITOF MicroflexLT (Bruker Daltonics). A placa inoculada foi mantida em fluxo laminar até a completa secagem do material depositado. Posteriormente, 1,0 µL de ácido fórmico foi aplicado sobre as colônias, seguido de secagem. Após, foi adicionado 1 µl da matriz composta por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA - Sigma, USA) preparada em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2.5% (Sigma, USA). Como calibrante para as análises e controle do processamento das amostras, foi empregada a cepa *E. coli* DH5 α , processada da mesma maneira conforme as amostras teste. Após secagem da mistura e formação dos cristais, a placa metálica foi inserida no aparelho para a leitura das amostras. Os espectros de massa das amostras foram obtidos no

modo linear, observando os seguintes parâmetros: frequência do laser 20 Hz; voltagem das fontes iônicas 1 e 2, 20 kV e 18,6 kV, respectivamente; faixa de peso molecular 2.000 a 20.000 Da.

Os espectros de massa foram coletados através da somatória de 240 disparos do laser, adquiridos através de 4 grupos de 60 disparos lançados em regiões distintas, aleatoriamente selecionadas, em um poço amostral na placa metálica. Os espectros das amostras foram calibrados internamente, utilizando-se como referência o espectro das proteínas ribossômicas da cepa *E. coli* DH5 α .

Os espectros obtidos foram processados pelo *software* Biotyper versão 3.1 (Bruker Daltonics) em modo operacional padrão, o qual realiza a pesquisa em sua biblioteca de espectros de referência, de maneira a encontrar o espectro que mais se assemelha ao obtido com a amostra.

Como resultado, foi apresentada uma tabela contendo a designação de dez microrganismos que apresentaram os espectros semelhantes aos da amostra testada, organizados em ordem decrescente de pontuação, ou *scores*, que variaram entre 0,0 e 3,0. Valores de *scores* superiores a 1,7 expressam identificação microbiana, entre 1,7 e 2,0 indicam possível identificação do gênero (representado pela cor amarela), valores entre 2,0 e 2,3 indicam certeza de gênero (representado pela cor amarela) e possível identificação de espécie, e quanto a valores de *score* superiores a 2,3, foi considerado que a identificação de gênero e espécie obtida foi confiável (representada pela cor verde).

A técnica de MALDI TOF-MS foi realizada no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM), no Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, na UFRJ, com o auxílio da funcionária Dra. Larissa Alvarenga Botelho, responsável pelo equipamento.

3.6.2 Extração de DNA por Kit (Promega)

As amostras bacterianas foram inoculadas em Caldo Nutriente (CN - Merck) e incubadas em estufa por 24 h a 37°C, sob agitação a 120 rpm. O crescimento bacteriano foi centrifugado por 5 min a 14.000 rpm, após descarte do sobrenadante, o *pellet* bacteriano foi lavado uma vez em tampão PBS 1X estéril. Em seguida foi realizada mais uma etapa de centrifugação (3 min, 14.000 rpm) em tubo tipo *ependorf* 1,5 mL. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 150 µL de tampão de lise (fornecido pelo kit) e homogeneizadas por pipetagem.

Em seguida, foi realizada a montagem do conjunto (tubo de coleta + minicoluna) fornecido pelo kit e transferiu-se o lisado para o conjunto. O conjunto contendo a amostra foi levado a centrífuga por 3 min, a 14.000 rpm. Em seguida, retirou-se a coluna do tubo coletor, descartou-se o líquido do tubo e a coluna foi novamente colocada no tubo. Adicionaram-se 650 µL de solução de lavagem (fornecida pelo kit) à minicoluna e procedeu-se a centrifugação por mais 1 min a 14.000 rpm. Em seguida, descartou-se novamente o líquido do tubo coletor e esta etapa, com a solução de lavagem seguida de centrifugação, foi repetida quatro vezes. Terminada a última etapa de lavagem, esvaziou-se o tubo coletor, e este foi centrifugado para secagem. A coluna foi transferida para um tubo tipo *ependorf* estéril, e foram adicionados 2 µL de solução de RNase (fornecida pelo kit) para remover o RNA que foi co-purificado junto com o DNA. Posteriormente, foram adicionados 250 µL de água livre de nucleases e a amostra foi centrifugada durante 1 min a 14.000 rpm para eluição do DNA purificado. Após a eluição do DNA, este foi quantificado em *NanoDrop Lite* (Thermo Scientific), e armazenado a -20°C. A quantificação do DNA foi realizada no Laboratório de BioProdutos, de Farmanguinhos (Fiocruz), sob o auxílio do Dr. Vagner Lopes. Posteriormente, foi feita a eletroforese em gel de agarose 1%, para visualização da qualidade do DNA extraído. Após a obtenção do DNA genômico este foi utilizado para realização de reações de PCR.

3.6.3 Identificação bacteriana por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

As amostras bacterianas não identificadas pela técnica de MALDI TOF-MS foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. O DNA destas amostras foi extraído por *kit* (Promega), conforme já descrito, e foi utilizada uma concentração final de 25 ng. A amplificação parcial do gene 16S rRNA foi feita com os *primers* 515-F e 806-R, que se anelam na região V5 do gene, gerando um *amplicon* de 240 pb (182). As reações de PCR foram realizadas no termociclador GeneAmp™ PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific). As concentrações finais dos reagentes para a realização da PCR estão descritas na Tabela 5: Reagentes utilizados na PCR e suas respectivas concentrações finais na reação.

Tabela 5: Reagentes utilizados na PCR e suas respectivas concentrações finais na reação.

Reagente	Concentração final
<i>Primer F</i>	10 pmoles
<i>Primer R</i>	10 pmoles
Taq <i>Buffer</i> 10X	10X
MgCl ₂ 50 mM	50 mM
dNTP (Cellco)	2 mM
Taq (Platinum Taq- Invitrogen)	1U
Água Milli-Q (Invitrogen)	q.s.p
DNA total	25 ng
Volume total	25 µl

Após amplificação da região alvo, foi realizada eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1,0% em TBE 0,4X (EDTA 0,5M pH 8,0; Tris 1M pH 8,0; Ácido Bórico 0,035 M), sob uma corrente de 80 Volts, durante 1 h. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5g/L), observado sob luz ultravioleta em transiluminador (KASVI) e fotografado.

Em seguida, os produtos da reação foram purificados com o *Kit* de purificação de produtos de PCR (*illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit - GE Healthcare*) e foram confirmados através de nova eletroforese, conforme descrito. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se 3,2 pmoles de cada iniciador (*Foward* e *Reverse*), o amplicon purificado na concentração final de 3 a 10 ng e água MiliQ, até completar o volume final de 7,5 µL. As reações foram enviadas para a Plataforma de Sequenciamento DNA-PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do IOC-FIOCRUZ, que utiliza o sequenciador 3730 DNA Analyser (*Applied Biosystems*).

As sequências de DNA geradas foram analisadas com o *software BioEdit Sequence Alignment Editor*, posteriormente em *BLAST* e comparadas no *Genbank*.

3.7 Detecção molecular dos genes de resistência

Após a obtenção do DNA, este foi diluído para concentração de 5 ng/µL a fim de ser utilizado na PCR convencional. A investigação dos genes de resistência foi feita com reações a um volume final variável de 25 µl ou 50 µl, dependendo do gene pesquisado, utilizando-se DNA a uma concentração final de 25 ng. As concentrações finais dos reagentes para a PCR foram as mesmas descritas na Tabela 5.

As PCR foram realizadas no termociclador GeneAmp™ PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) para amplificação dos genes utilizando-se programas específicos, de acordo com as temperaturas de anelamento de cada par de *primer* e número de ciclos correspondente.

A pesquisa foi feita para os genes de resistência plasmideal à colistina (*mcr-1* e *mcr-2*), genes codificadores de β-lactamases (*bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SPM}* e *bla_{CTX-M}*) de carbapenemases (*bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{GES}*, *bla_{SIM}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA48}*, *bla_{OXA143}*), gene codificador de enzima modificadora de aminoglicosídeo (*aac(6)-Ib*) e gene codificador de integrase de integron de

classe 1 (*Int1*). Os *primers* utilizados para detecção dos genes foram anteriormente descritos em artigos científicos e publicados na literatura, como exemplificados na Tabela 6. Os controles positivos correspondentes a cada gene foram utilizados para padronização das reações e estão descritos na Tabela 7.

Após amplificação da região alvo, foi realizada eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1,0% em TBE 0,4X (EDTA 0,5 M pH 8,0; Tris 1 M pH 8,0; Ácido Bórico 0,035 M), sob uma corrente de 80 Volts, durante uma hora. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5g/L), observado sob luz ultravioleta em transiluminador (KASVI) e fotografado. As amostras positivas para os genes de resistência investigados foram submetidas às mesmas metodologias de purificação do produto de PCR, eletroforese, preparo de reação de sequenciamento e análise das sequências geradas, conforme descrito no item 3.6.3.

Tabela 6: Primers utilizados para amplificação dos genes de resistência, respectivo produto gerado em pares de bases e referência.

Gene	Iniciadores	Produto	Referência
<i>bla_{IMP}</i>	F: 5'-TTGACACTCCATTTACDG-3' R: 5'-GATYGAGAATTAAGCCACYCT-3'	139 pb	(183)
<i>bla_{NDM}</i>	F: 5'-GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC-3' R: 5'-CGGAATGGCTCATCACGATC-3'	621 pb	(184)
<i>bla_{SPM}</i>	F: 5'-CGGATCATGTGCGACTTGCCCTAC-3' R: 5'-CGACGACATTATCGGGCGAGTG-3'	513 pb	Dr. Otávio Padula
<i>bla_{VIM}</i>	F: 5'-GATGGTGTGGTTCGCATA-3' R: 5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'	390 pb	(183)
<i>bla_{OXA-23}</i>	F: 5'-TGACACCAGCGTAGGGCTT-3' R: 5'-GCTCATCCAGAAGCGTCCGG-3'	402 pb	Dr. Otávio Padula
<i>bla_{OXA-48}</i>	F: 5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' R: 5'-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3'	438 pb	(184)
<i>bla_{OXA-143}</i>	F: 5'-TGGCACTTTCAGCAGTTCCT-3' R: 5'-TAATCTTGAGGGGGCCAACC-3'	149 pb	(185)
<i>bla_{GIM}</i>	F: 5'-TCGACACACCTTGGTCTGAA-3' R: 5'-AACTTCCAACCTTGCCATGC-3'	477 pb	(184)
<i>bla_{SIM}</i>	F: 5'-TACAAGGGATTCGGCATCG-3'	570 pb	(184)

	R: 5'-TAATGGCCTGTTCCCATGTG-3'		
bla_{KPC}	F: 5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3' R: 5'-CTTGTCATCCTTGTAGGCG-3'	798 pb	(184)
bla_{TEM}	F: 5'-CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC-3' R: 5'-CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC-3'	800 pb	(183)
bla_{SHV}	F: 5'-AGCCGCTTGAGCAAATTAAC-3' R: 5'-ATCCCGCAGATAAATCACCAC-3'	713 pb	(183)
bla_{CTX-MU}	F: 5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGT-3' R: 5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGA-3'	593 pb	(186)
bla_{GES}	F: 5'-ATGCGCTTCATTCACGCAC-3' R: 5'-CTATTTGTCCGTGCTCAGG-3'	860 pb	(187)
aac(6')-Ib	F: 5'-TTGCGATGCTCTATGAGTGG-3' R: 5'-CTCGAATGCCTGGCGTGTTT-3'	482 pb	(188)
mcr-1	F: 5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTTC-3' R: 5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3'	309 pb	(120)
mcr-2	F: 5'-TGGTACAGCCCCTTTATT-3' R: 5'-GCTTGAGATTGGGTTATGA-3'	567 pb	(189)

Tabela 7: Espécies bacterianas utilizadas como controles positivos para os genes investigados e suas respectivas origens.

Gene	Espécie bacteriana	Origem
bla_{NDM}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LAPIH- Fiocruz
bla_{KPC}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFRJ
bla_{OXA-23}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	INCQS
bla_{OXA-48}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFRJ
bla_{OXA-143}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	INCQS
bla_{VIM}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	INCQS
bla_{IMP}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFRJ
bla_{SIM}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	UFRJ
bla_{SPM}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFRJ
bla_{GIM}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFRJ
bla_{GES-16}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFRJ
bla_{GES-5}	<i>Enterobacter asburiae</i>	UFRJ
bla_{CTX-M}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFRJ
bla_{SHV/TEM}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFRJ
mcr-1	<i>Escherichia coli</i>	INCQS
aac6-Ib	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFF
Int1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFF

LAPIH = Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar; Fiocruz = Fundação Oswaldo Cruz; INCQS = Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; UFRJ = Universidade Federal do Rio de Janeiro; UFF = Universidade Federal Fluminense.

3.8 Detecção molecular das regiões flanqueadoras dos genes codificadores de carbapenemases

A detecção da região flanqueadora dos genes codificadores de carbapenemases (*bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*) foi realizada através de PCRs, nas amostras produtoras dessas carbapenemases, utilizando-se iniciadores para a região do Tn4401, IS3000, IS*Aba125* e *ble_{MBL}*. Para a detecção do transposon Tn4401, comumente associado ao gene *bla_{KPC-2}* e responsável por sua dispersão, foram utilizados os iniciadores para as regiões IS*Kpn6*, IR direita, TnpA e IR esquerda (80) e a região IS*Kpn7* (190). Para a detecção da região flanqueadora do gene *bla_{NDM}* foi desenhado um par de iniciadores pelo Dr. Douglas McIntosh, para a região do Tn3000 e também foi investigada a presença das regiões IS*Aba125* e *ble_{MBL}* (191). As sequências dos *primers*, seus respectivos produtos em pares de bases, temperaturas de anelamento e referências estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8: Sequências flanqueadoras de *bla_{KPC-2}* e *bla_{NDM}*, seus iniciadores, tamanho do produto gerado, temperatura de anelamento e referência.

Gene	Iniciadores	Produto	Referência
IS <i>Kpn6</i>	F: 5'-GGCACGGCAAATGACTA-3' R: 5'-GAAGATGCCAAGGTCAATGC-3'	649 pb	(80)
IR direita	F: 5'-ACGACCACGCACGCACAAAC-3' R: 5'-GCATCAAACGGAAGCAAAAG-3'	220 pb	(80)
TnpA	F: 5'-GCGACCGGTCAGTTCCTTCT-3' R: 5'-CACCTACACCACGACGAACC-3'	198 pb	(80)
IR esquerda	F: 5'-TCACCGGCCCTCACCTTTGG-3' R: 5'-CTTAGCAAATGTGGTGAACG-3'	462 pb	(80)
IS <i>Kpn7</i>	F: 5'-TGACCCTGAGCGGCGAAAGC-3' R: 5'-CACAGCGGCAGCAAGAAAGC-3'	703 pb	(190)
IS3000	F: 5'-CGGCATGTCGAGATAGGAAG-3' R: 5'-CGGCATGTCGAGATAGGAAG-3'	900 pb	Dr. Douglas McIntosh

A detecção das regiões flanqueadoras foi feita através de PCR, em um volume final de 25 µL, conforme as condições descritas no item 3.6.3

3.9 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

As amostras identificadas como *K. pneumoniae*, provenientes do isolamento a partir de dípteros muscoides e também de pacientes, foram submetidas à análise de polimorfismo genético, através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (192). As amostras foram semeadas em AN e incubadas durante 24 h a 37°C. Após o crescimento, foi feita uma suspensão em 1,0 mL de tampão BSC (EDTA 0,5 M pH 8,0, TRIS-HCl 1 M pH 8) equivalente a um padrão 3 da escala Mac Farland. Após, 200 µL da suspensão foram transferidos para um tubo tipo *Eppendorf*, juntamente com 200 µL de agarose 1% (0,1 g de agarose *low melting* [Seaken gold], 0,5 ml de SDS 1%, 9,4 ml de TE [TRIS-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM pH 8,0]) com 5 µL de proteinase K (50 mg/µL - Sigma). A mistura para a preparação dos blocos foi homogeneizada rapidamente por pipetagem, para evitar a formação de bolhas, e distribuída nos moldes fornecidos pelo fabricante do equipamento (BioRad).

Os blocos foram solidificados durante 10 min em geladeira (5°C), e posteriormente foram transferidos para um tubo Falcon esterilizado contendo 2 mL de solução de lise (Trisma base 1,0 M pH 8,0, EDTA 0,5 M pH 8,0, N-Lauril Sarcosil 10% e água miliQ) e 5 µL de proteinase K (50 mg/ µL). Os tubos foram incubados a 50°C durante 3 h. Após a lise, os blocos foram lavados 4 vezes com 10 mL de água miliQ a 50°C durante 15 min e uma vez com 10 mL de tampão TE a 50°C durante 15 min. Os blocos de agarose foram armazenados em geladeira (4°C) em 2 mL de tampão TE.

Um terço de cada bloco de agarose foi transferido para um microtubo tipo *Eppendorf* para a realização da digestão enzimática. Inicialmente, os

blocos foram incubados em geladeira (4°C) durante 30 min com 5 µL do tampão da enzima XbaI (Promega), 0,5 µL de BSA e 44,5 µL de água MiliQ. Posteriormente, os mesmos foram incubados com nova solução de tampão adicionando-se 2,5 µL de enzima (30 U/plug), durante 3 h a 37 °C. A reação enzimática foi interrompida adicionando-se 100 µL de tampão TBE 0,75X.

Para a corrida eletroforética, foi preparado um gel de agarose 1,0% (Seaken gold), em TBE 0,4X (TRIS 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1mM pH 8.3). A separação dos fragmentos ocorreu através de eletroforese em gel de campo pulsado, utilizando o sistema CHEF-DRIII e CHEF- DRII (BioRad, Richmond, EUA). As seguintes condições para a eletroforese foram utilizadas: tempo de pulso crescente de 0,5 a 35 seg, por 23 h a 6V/cm, na temperatura de 14°C. Foram utilizados padrões de peso molecular Lambda DNA Ladder Pulse (0,5-200 Kb - Sigma). A corrida eletroforética foi realizada no Setor de Saneantes, do INCQS, Fiocruz, RJ.

Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 g/L), visualizados e fotografados sob luz ultravioleta utilizando-se o fotodocumentador Lpix EX- Loccus Biotecnologia e fotografado utilizando o *software* Loccus LPix Image EX (versão 2.7). A fotodocumentação dos géis foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz.

As análises dos géis e a confecção do dendrograma foram realizadas através do *software* GelCompar II (versão 1.50, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os agrupamentos foram realizados utilizando o coeficiente de Dice, e os valores de otimização e tolerância utilizados para análise foram fornecidos pelo próprio programa, através de ferramenta específica para esta análise.

3.10 Tipagem molecular através de *Multi Locus Sequence Typing* (MLST)

A técnica de MLST foi realizada para apenas um isolado de *K. pneumoniae*, proveniente de díptero muscoide. Os iniciadores utilizados foram descritos por Diancourt e colaboradores (2005) (193) e estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9: Genes alvo, iniciadores e tamanho dos produtos em pares de base para a técnica de MLST.

Gene Alvo	Iniciadores	Tamanho do produto (pb)
<i>rpoB</i>	Vic3F 5'-GGCGAAATGGCWGAGAACCA-3' Vic2R 5'-GAGTCTTCGAAGTTGTAACC-3'	1075
<i>gapA</i>	gapA173F 5'-TGAAATATGACTCCACTCACGG-3' gapA181F 5'-CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT-3'	662
<i>mdh</i>	mdh130F 5'-CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG-3' mdh867R 5'-CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG-3'	756
<i>pgi</i>	pgi1F 5'-GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC-3' pgi1R 5'-CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT-3'	566
<i>phoE</i>	phoE604.1F 5'-ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG-3' phoE604.2R 5'-TGATCAGAACTGGTAGGTGAT-3'	602
<i>infB</i>	infB1F 5'-CTCGCTGCTGGACTATATTCG-3' infB1R 5'-CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC-3'	462
<i>tonB</i>	tonB1F 5'-CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT-3' tonB2R 5'-ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG-3'	539

A amplificação dos sete genes foi realizada conforme descrito em 3.6.3, com a diferença que para o gene *tonB*, a concentração final de MgCl₂ foi de 50 mM, enquanto para os outros genes foi de 25 mM. As condições de amplificação para os genes foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 seg, anelamento a 50°C (para os genes *rpoB*, *pgi*, *mdh*, *phoE* e *infB*) por 20 seg, extensão a 72°C por 20 seg, seguido

de extensão final a 72°C por 5 min. Para o gene *gapA* a temperatura de anelamento foi de 60°C e para o gene *tonB* foi de 45°C.

Após a amplificação dos genes e visualização em eletroforese em gel, os produtos de PCR foram purificados e novamente submetidos à eletroforese para confirmação da purificação. Depois, as reações de sequenciamento foram preparadas, utilizando-se os mesmos *primers* na concentração de 1 pmol/μL, com exceção de: infB2F (5'-ACTAAGGTTGCCTCCGGCGAAGC-3'), pgi2F (5'-CTGCTGGCGCTGATCGGCAT-3') e pgi2R (5'-TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT-3'), que foram utilizados apenas para as reações de sequenciamento. As reações foram enviadas para o sequenciador 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems), na Plataforma de Sequenciamento DNA-PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do IOC-Fiocruz, conforme descrito no item 3.6.3, e também para a plataforma Multidisciplinar de Genômica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, na UFRJ.

Posteriormente, as sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor e comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados de MLST de *K. pneumoniae*, para a determinação de cada um dos números de alelo e conseqüentemente a discriminação de cada ST, com a ajuda do website <http://bigsdb.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>. Utilizando o software Eburst (disponível em <http://eburst.mlst.net/>), avaliamos a relação filogenética entre os ST observados. Para tal, consideramos amostras pertencentes ao mesmo Complexo Clonal (CC) aquelas que apresentaram diferença em apenas um alelo do MLST.

3.11 Análise plasmideal

3.11.1 Determinação do grupo de incompatibilidade plasmideal

O esquema de determinação do grupo foi proposto por Carattoli e colaboradores (2005) (194) e se baseia na amplificação por PCR das regiões que controlam a replicação destes plasmídeos, que é diferente para cada uma das classes. O esquema é composto por cinco reações de PCR multiplex e 3 reações simples de PCR, para a identificação dos seguintes grupos: FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1, L/M, N, P, W, T, A/C,K, B/O, X, Y, F, e FIIA. As sequências dos *primers* utilizados estão demonstradas na Tabela 10.

Tabela 10: Nomes dos iniciadores, sequências de DNA e tamanho do produto gerado em pares de bases das regiões de controle de replicação plasmideal.

Primer	Sequência de DNA	Fragmento (pb)
HI1	F: 5'-GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC-3' R: 5'-TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA-3'	471
HI2	F: 5'-TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC-3' R: 5'-GGCTCACTACCGTTGTCATCCT-3'	644
I1	F: 5'-CGAAAGCCGGACGGCAGAA-3' R: 5'-TCGTCTCGTTCCGCCAAGTTCGT-3'	139
X	F: 5'-AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT-3' R: 5'-TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC-3'	376
L/M	F: 5'-GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG-3' R: 5'-CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG-3'	785
N	F: 5'-GTCTAACGAGCTTACCGAAG-3' R: 5'-GTTTCAACTCTGCCAAGTTC-3'	559
FIA	F: 5'-CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG-3' R: 5'-GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG-3'	462
FIB	F: 5'-GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG-3' R: 5'-CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT-3'	702
W	F: 5'-CCTAAGAACAACAAGCCCCCG-3' R: 5'-GGTGC GCGGCATAGAACCGT-3'	242
Y	F: 5'-AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG-3' R: 5'-GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTTT-3'	765
P	F: 5'-CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA-3' R: 5'-TCACGCGCCAGGGCGCAGCC-3'	534
FIC	F: 5'-GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG-3' R: 5'-TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT-3'	262
A/C	F: 5'-GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA-3' R: 5'-ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT-3'	465
T	F: 5'-TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT-3' R: 5'-CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC-3'	750
FII _s	F: 5'-CTGTCGTAAGCTGATGGC-3'	270

	R: 5'-CTCTGCCACAAACTTCAGC-3'	
F _{repB}	F: 5'-TGATCGTTTAAGGAATTTTG-3'	270
	R: 5'-GAAGATCAGTCACACCATCC-3'	
K/B	F: 5V-GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC-3V	160
	K R: 5'-TCTTTCACGAGCCCGCCAAA-3'	
	B/O R: 5'-TCTGCGTTCGCCAAGTTCGA-3'	159

3.11.2 Extração plasmideal pelo método de Kadu e Liu (1981)(195)

As amostras isoladas a partir de moscas e positivas para os genes *bla_{NDM}* e *bla_{KPC}* foram submetidas à metodologia de extração plasmideal por Kado e Liu (1981) (195). As amostras foram semeadas em placa de AMH (Oxoid) e incubadas por 18-24 h a 37°C. Uma porção das colônias foi retirada com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril e foi suspensa em microtubos contendo 200 µL de solução de lise com pH ajustado (SDS 0,1 M; TRIS 0,05 M; pH12,6). Essa solução foi, então, incubada em banho-maria a 55°C por 1 h. A cada 20 min de incubação, foi feita a homogeneização por inversão, para haver completa mistura entre a bactéria e a solução de lise. Após 1 h, as amostras foram retiradas do banho-maria e foram adicionados 200 µL de fenol-clorofórmio não tamponado (1:1). Esta mistura foi homogeneizada até que alcançasse coloração esbranquiçada e, em seguida, foi centrifugada por 15 min (13.000 rpm). O sobrenadante foi transferido para outro microtubo. Para realização da corrida eletroforética, foi misturado a cada uma das amostras, o tampão de corrida (1/6 do volume total), homogeneizado com movimentos circulares. Esta mistura foi depositada nos poços do gel de agarose (0,7%) (Invitrogen) e, em seguida, este gel foi submetido à corrida de eletroforese em tampão TAE 1x (Tris-Acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) (Invitrogen), com corrente de 50 volts por 3 h e meia. O gel foi em seguida corado com brometo de etídio (0,5 g/l) por 30 min e depois fotografado sobre luz UV, utilizando-se o transiluminador (KASVI).

3.11.3 Transferência de DNA para membranas de Nylon

Após a realização da metodologia descrita no item 3.11.2, e a consequente obtenção dos géis de agarose, os mesmos foram usados para transferência do DNA para membranas de Nylon. A transferência do DNA para a membrana Hybond N+ (Amershan) foi realizada através do equipamento VacuGene™ XL Vacuum Blotting System (GE Healthcare), que utiliza uma bomba de vácuo para a transferência. Essa bomba é conectada a um suporte, onde o gel de agarose é posicionado sobre a membrana, e aquela realiza sobre esse sistema uma pressão constante de 40 mbar. Durante a transferência, o gel foi inicialmente tratado com 300 mL de solução de depuração (HCl 0,25 M) por 5 min. Após a remoção da maior parte desta solução, foi adicionado ao gel o mesmo volume de solução de desnaturação (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 N), por 4 min. Após remoção, adicionou-se o mesmo volume de solução de neutralização (TrisHCl 0,5 M; pH 8,0 e NaCl 1,5 M) por 4 min. Por último, foram adicionados 300 mL do tampão SSC 20X (NaCl 3,0 M; Citrato de sódio 0,3 M), por pelo menos 2 horas. Após a transferência, a membrana foi exposta por 4 min e 30 seg à radiação ultravioleta (transiluminador KASVI), para fixação dos fragmentos de DNA. A membrana foi guardada para posterior hibridização.

3.11.4 Hibridização com sondas complementares aos genes codificadores de carbapenemases (*bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*)

As sondas utilizadas nesta etapa foram confeccionadas através da técnica de PCR, utilizando-se o DNA das cepas referência (Tabela 7) para cada gene estudado (*bla_{NDM}* e *bla_{KPC}*). A reação de PCR foi feita de acordo com as especificidades de cada par de *primers* e, além dos desoxinucleotídeos (dNTPs), foi utilizado um nucleotídeo marcado com digoxigenina, 11-dUTP (Roche). Após a confecção das sondas por PCR, estas foram confirmadas por

eletroforese, através da comparação com seu respectivo *amplicon* sem incorporação de 11-dUTP, o que resulta em pesos moleculares diferentes.

As membranas foram incubadas em 10 mL de solução de pré-hibridização [5X SSC, 2% agente bloqueador (Roche), 0,1% N-laurilsarcosil, 0,02% SDS] durante 1 h a 62°C sob agitação, em forno de hibridização. Anteriormente à hibridização, a sonda foi preparada para um volume final de 100 µL (10 µL do produto de PCR e 90 µL de água MiliQ) e foi desnaturada por fervura durante 10 min, seguido de banho de gelo por cinco min. A solução de pré-hibridização foi retirada do frasco e adicionaram-se 10 mL de solução de hibridização (10 mL de nova solução de pré-hibridização acrescida de 100 µL da sonda desnaturada). A hibridização ocorreu no forno de hibridização, a 55° C, por uma noite.

As membranas foram lavadas com solução de baixa estrigência (2X SSC; 0,1% SDS) por duas vezes durante 5 min em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, foram lavadas por duas vezes com solução de alta estrigência (0,1X SSC; 0,1% SDS) a 62°C com agitação por 15 min. Após as etapas de lavagem, as membranas foram submetidas à etapa de detecção. Inicialmente, as membranas foram lavadas em tampão 1 (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl). Esta etapa foi seguida da incubação por 30 min da membrana em tampão 2 (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% agente bloqueador), sob agitação. Realizou-se tratamento da membrana com 25 mL de solução de anticorpo (25 mL de tampão 1 e 5 µL de anticorpo anti-DIG conjugado a fosfatase alcalina - Roche), por 30 min sob agitação. Após a marcação com anticorpo, a membrana foi lavada por duas vezes com tampão 1 por 10 min sob agitação. Para a detecção, a membrana foi equilibrada por 2 min em tampão 3 (100 mM Tris base; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂, pH 9,5). Em seguida, foram adicionados à membrana 15 mL da solução de detecção NBT (Nitro blue tetrazolium chloride - Roche) mantido a 37°C ao abrigo de luz. O resultado pode ser observado de 2 - 24 horas após a adição do agente revelador. As membranas foram secas em papel filtro e guardadas em papel alumínio.

3.12 Ensaios de Conjugação bacteriana

A técnica de conjugação foi realizada para avaliar a capacidade de transferência horizontal do possível plasmídeo carreador dos genes codificadores de carbapenemase (*bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}), das amostras isoladas a partir de dípteros muscoides. A cepa de *E. coli* J53 naturalmente resistente a azida (CMI>256 µg/ml) foi utilizada como célula receptora, e as amostras LEMEF 23, LEMEF 26 e LEMEF 71 foram utilizadas como cepas doadoras. Uma a três colônias das bactérias doadoras e receptoras, crescidas previamente em TSA (Oxoid) a 37°C, por 18 a 24 h, foram inoculadas separadamente em 3 mL de caldo BHI (Oxoid) por 3 h, a 37°C em placa agitadora. Após este período, foram misturados 200 µL e 800 µL das suspensões de células doadoras e receptoras, respectivamente, e a mistura foi incubada a 37°C sob agitação lenta por 3 h. Então, 600 µL desta mistura foram semeados em três placas seletivas de TSA (200 µL em cada placa), contendo 1 mg/mL de imipenem e 100 µg/ml de azida, que foram incubadas a 37°C, por 18 a 24 h. Ao restante do crescimento da mistura foram acrescentados 2 mL de caldo BHI fresco, que foi incubado a 37°C por 18 a 24 h. Após esse crescimento, 600 µL foram divididos e semeados em mais três placas seletivas, iguais às utilizadas anteriormente, e as mesmas foram incubadas a 37°C por 18 a 24 h.

Paralelamente, 200 µL da mistura bacteriana foram depositados em membrana de nitrocelulose de 0,22 µm (Millipore) estéril colocada sobre uma placa de ágar TSA sem antimicrobianos, seguidos de incubação a 37°C, por 18 a 24 h. O crescimento bacteriano observado sobre a membrana de filtro foi removido com o auxílio de uma alça estéril, inoculado em solução salina (0,85%) e semeado em mais três placas seletivas, que passaram pelas mesmas condições de incubação anteriormente descritas.

O crescimento de colônias nas placas seletivas contendo azida e imipenem foi indicativo da presença de células bacterianas de *E. coli* que adquiriram gene codificador de carbapenemase.

Quando presentes, essas colônias eram repicadas em novas placas de TSA suplementado com 1 mg/mL de imipenem e 100 µg/mL de azida, e incubadas por 18 a 24h a 37°C.

A avaliação da presença dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* nas amostras transconjugantes foi realizada através de amplificação por PCR diretamente da colônia. A metodologia de conjugação bacteriana foi realizada no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) da UFRJ.

3.13 Sequenciamento Genômico

A amostra isolada a partir de diptero muscoide (LEMEF 23), positiva para o gene codificador de carbapenemase *bla_{NDM}* foi selecionada para sequenciamento de seu genoma total.

3.13.1 Sequenciamento *Whole Genome Shotgun* (WGS)

O DNA genômico da amostra foi extraído usando o kit Promega (conforme item 3.6.2). O DNA molde foi fragmentado utilizando método enzimático, com a enzima de fragmentação ION Shear™ do kit de preparação de biblioteca ION Xpress™ plus Fragment Library Kit (Cat. 4471269 – ThermoFisher Scientific USA). A reação de fragmentação continha 100 ng de DNA das amostras diluídos em 40 µL de água nuclease free, 5 µL de tampão de reação Ion Shear™ Plus a 10X e 5 µL de mix enzimático Ion Shear™ Plus. A reação foi incubada a 36°C por 3 min e foram imediatamente adicionados 5 µL de tampão de parada Ion Shear™ Plus. Então, procedeu-se imediatamente à purificação. Após a fragmentação, foram selecionados fragmentos entre 350 e 400 pb. Para seleção dos fragmentos, foi realizado o protocolo de purificação de duas etapas ProNex® Size Selective Purification System (Cat NG2001 – Promega Corp, USA), segundo o protocolo do fabricante para fragmentos entre

500 e 300 pb. As bibliotecas foram preparadas utilizando ION Plus Fragment Library Kit (Cat. 4471252 – ThermoFisher Scientific USA), e diferenciados utilizando o Ion Xpress™ Barcode Adapters kit (Cat. 4471250, 4474009 – ThermoFisher Scientific USA), de acordo com protocolo do fabricante. O preparo de *template* foi realizado utilizando o kit ION PGM Hi-Q OT2 (Cat. 4471252 – ThermoFisher Scientific USA), com base nas instruções do fabricante para sequenciamento de fragmentos de 400 pb.

O sequenciamento foi realizado na plataforma ION Personal Genome Machine (ThermoFisher Scientific, USA), utilizando o ION 316™ Chip V2 e a reação de sequenciamento foi realizada com Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit (Cat. A30004 – ThermoFisher Scientific USA), seguindo instruções do fabricante. Todas as etapas foram realizadas no Laboratório de Virologia Molecular do Departamento de Genética, Instituto de Biologia, UFRJ.

3.13.2 Montagem e Anotação dos Genomas

A montagem de novo do genoma foi realizada através do programa SPAdes, versão 3.12.0, e foram utilizados os scripts de saída para amostras sequenciadas em Ion Torrent e de predição de plasmídeos. A anotação dos *contigs* obtidos foi feita através da anotação automática utilizando a plataforma RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology - <http://rast.nmpdr.org/>). Os *contigs* obtidos foram submetidos para análise na plataforma ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), que identifica genes de resistência antimicrobiana adquiridos.

A montagem por referência foi feita utilizando o programa Geneious Prime 2019, versão trial, utilizando o comando *map to reference*. A cepa de *K. pneumoniae* KP64 foi utilizada como genoma de referência (196).

3.14 Análises estatísticas

O teste Anova (análise de variância) foi realizado a fim de se comparar as médias das populações amostrais e identificar se essas médias diferiram significativamente. Para realização do Anova, foi utilizado o número de isolados não sensíveis (resistentes e intermediários) obtidos para cada antimicrobiano testado, por ponto de coleta. É importante ressaltar que só foram consideradas na análise as cepas provenientes de isolamento feito em placas de AN (com e sem ceftriaxona a 1mg/L), meio de cultura não seletivo, utilizado em todas as coletas. As cepas foram classificadas seguindo os critérios estabelecidos pelo EUCAST (2019) e CLSI (2017). Não foram contabilizadas como resistentes as cepas que apresentam mecanismos de resistência intrínsecos. O teste t de *Student* foi realizado para comparação de dois pontos entre si. Os dois testes foram realizados com o suplemento de análise de dados do Excel, e foi considerado como significativo um valor de $p < 0,05$.

A análise de *cluster*, que comparou os dados de não sensibilidade de cada ponto, foi realizada através do *software* Statistica versão 7.0, e foram utilizados dados ponderados (em função do número de isolados por ponto de coleta).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleta e Identificação dos Dípteros Muscoides

Durante os anos de 2014, 2015, 2016 e 2017 foram realizadas 16 coletas nos pontos mencionados na Tabela 4, obtendo-se um total de 117 dípteros muscoides. As coletas foram feitas sempre entre 10:00 e 14:00 horas, em dias sem chuva e com temperaturas acima dos 26°C. A Tabela 11 relaciona os pontos e as datas das coletas realizadas, os métodos empregados, a identificação dos insetos e a quantidade de insetos coletados.

Neste estudo, foram empregados os seguintes métodos de coleta: armadilha de garrafa *pet* contendo isca atrativa, rede entomológica, pote plástico com isca atrativa e, de forma direta, pote plástico sem isca atrativa. Todas as técnicas de coletas tendem a ser, em maior ou menor amplitude, seletivas. Para superar isso, deve-se, então, utilizar diferentes procedimentos para se coletar mais ampla diversidade possível e maior quantidade de dípteros (197).

Todavia, em função das diferentes características de cada ponto de coleta (Tabela 4), não foi possível empregar todos os métodos em todos os pontos e, dessa forma, não utilizamos métodos estatísticos para realizar uma comparação entre as espécies de dípteros obtidas em cada local de coleta.

Os insetos coletados foram identificados até o nível de espécie, com exceção de indivíduos pertencentes aos gêneros *Lucilia* sp., *Euxesta* sp. e *Fania* sp., bem como indivíduos pertencentes às famílias *Sarcophagidae*, *Phoridae* e *Chloropidae*. Esta dificuldade de identificação de alguns dípteros ocorreu pela impossibilidade de manipulação dos mesmos, uma vez que os insetos foram, após a coleta, alocados em tubos de ensaio de vidro esterilizados e identificados apenas pela visualização através da parede do tubo, a fim de se evitar possível contaminação no laboratório.

Tabela 11: Ponto, data e métodos utilizados em cada coleta e identificação dos dípteros muscoides.

Ponto de Coleta	Datas das coletas	Métodos de coleta utilizados	Identificação das espécies de dípteros muscoides e o número (n) de indivíduos coletados por espécie
Ponto 1	julho, agosto, setembro, outubro e novembro de 2014; e janeiro de 2015	Atração das moscas com carne putrefata, armadilha de garrafa <i>pet</i> contendo isca atrativa e rede entomológica	<i>Chrysomya megacephala</i> (31), <i>Chrysomya putoria</i> (3), <i>Musca domestica</i> (7) Total ponto 1: 41 dípteros muscoides
Ponto 2	abril, junho, julho e dezembro de 2015	Captura sem armadilha	<i>Musca domestica</i> (2), <i>Lucilia</i> sp. (1), <i>Ophyra chalcogaster</i> (2), <i>Atherigona orientalis</i> (2), <i>Synthesiomyia nudiseta</i> (2), <i>Sarcophagidae</i> (2) Total ponto 2: 13 dípteros muscoides
Ponto 3	abril e julho de 2015	Atração das moscas com carne putrefata	<i>Sarcophagidae</i> (1), <i>Muscidae</i> (1), <i>Chrysomya megacephala</i> (5) Total ponto 3: 7 dípteros muscoides
Ponto 4	março de 2016 e julho de 2017	Armadilha de garrafa <i>pet</i> contendo isca atrativa e rede entomológica	<i>Chrysomya megacephala</i> (3), <i>Lucilia cuprina</i> (3), <i>Musca domestica</i> (7), <i>Atherigona orientalis</i> (9), <i>Synthesiomyia nudiseta</i> (1), <i>Tricharaea (Sarcophagula) occidua</i> (1), <i>Fannia pusio</i> (1), <i>Fannia</i> sp. (2), <i>Peckia Sarcodexia lambens</i> (1), <i>Sarcophaga (Liopygia) ruficornis</i> (1), <i>Euxesta</i> sp. (2), <i>Sarcophagidae</i> (2), <i>Fannidae</i> (2), Total ponto 4: 35 dípteros muscoides
Ponto 5	março de 2016 e julho de 2017	Armadilha de garrafa <i>pet</i> contendo isca atrativa e rede entomológica	<i>Chrysomya megacephala</i> (5), <i>Lucilia cuprina</i> (1), <i>Musca domestica</i> (2), <i>Tricharaea (Sarcophagula) occidua</i> (1), <i>Malacophagomya filamenta</i> (1), <i>Atherigona orientalis</i> (3), <i>Peckia lambens</i> (1), <i>Sarcophagidae</i> (2), <i>Phoridae</i> (1), <i>Chloropidae</i> (4) Total ponto 5: 21 dípteros muscoides
			Total: 117 dípteros muscoides

Inúmeros estudos relatando a coleta de insetos em ambientes hospitalares e seus arredores já foram realizados em diferentes locais; no entanto, eles focalizam apenas um grupo de insetos, como baratas e formigas, ou especificamente *Musca domestica* (198). Outros trabalhos, porém, têm demonstrado que, nesses ambientes os insetos predominantes são os dípteros muscoides (143). Além disso, moscas possuem cerdas em suas pernas e uma estrutura denominada pulvilo que facilita a aderência às superfícies. Essas estruturas aumentam a adesão de partículas, especialmente bactérias e outros microrganismos (199).

Os dípteros da família Calliphoridae possuem importância médica e sanitária, pelo fato de os adultos de muitas espécies serem endófilos, podendo pousar em alimentos de consumo humano, após abandonarem ambientes contaminados (200). Devido ao seu olfato, são atraídos por matéria orgânica em decomposição, sendo facilmente encontrados em lixões, cadáveres e até em lixos hospitalares. Esses substratos são utilizados como meio proteico para oviposição; por isso, acabam transportando microrganismos por meio de suas patas e todo o corpo, atuando, assim, como vetores mecânicos de agentes patogênicos (201).

Dentre os 117 dípteros coletados neste trabalho, 50 (42%) foram identificados como pertencentes à família Calliphoridae, sendo 44 (37,6%) da espécie *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), 3 (2,56%) da espécie *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) e 3 (2,56%) da espécie *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830).

C. megacephala é considerada sinantrópica na região metropolitana do Rio de Janeiro e somente na segunda metade da década de 1970 foi introduzida no continente americano, dispersando-se rapidamente e causando um declínio em populações de espécies nativas (202). De acordo com Leandro e D'Almeida (203), *C. megacephala* é uma espécie r-estrategista, de hábito alimentar generalista, que se adapta a ambientes com diferentes paisagens, como fragmentos de mata e até mesmo em regiões urbanas. Vale ressaltar que os representantes de *C. megacephala* foram coletados em todos os 5 pontos analisados, o que corrobora sua característica sinantrópica relatada na literatura.

Foram obtidos apenas 3 indivíduos da espécie *Chrysomya putoria*, todos provenientes do ponto 1, na caçamba de resíduo doméstico na comunidade do Amorim. *C. putoria* parece apresentar menor abundância em diferentes regiões do Brasil, em comparação a *Chrysomya megacephala* (204), o que foi observado de acordo com nossos resultados.

Já *Lucilia cuprina*, que também é uma espécie considerada sinantrópica, é comumente encontrada em lixo urbano, substratos em decomposição, frutos caídos, néctar de flores e fezes humanas; por isso, torna-se vetora de enteropatógenos (205). No entanto, apenas três indivíduos desta espécie foram capturados.

A família Muscidae é conhecida por ser amplamente diversa, com aproximadamente 840 espécies conhecidas apenas para a região Neotropical. Seus representantes estão adaptados a uma ampla variedade de *habitats* e modos de vida, podendo ser encontrados em quase todos os ambientes, exceto nos mais áridos (206). Os adultos possuem hábito saprófago, desenvolvendo-se em fezes, matéria vegetal ou tecido animal em decomposição. Muitos estão relacionados com a transmissão mecânica de patógenos e parasitas (207).

Dentre os muscídeos obtidos neste estudo, a maioria pertence à espécie *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (18 indivíduos, 21%); eles foram coletados em todos os pontos, com exceção do ponto 3. Trata-se de uma espécie cosmopolita, sendo considerada um problema em áreas urbanas sem o devido manejo sanitário (208). As espécies *Ophyra chalcogaster* (Wiedemann, 1824), *Atherigona orientalis* (Schiner) e *Synthesiomyia nudiseta* (Wulp, 1883), apesar de serem consideradas sinantrópicas e muito comuns em áreas tropicais (209) (210) (211) (212), foram coletas em baixas quantidades no presente estudo.

Os dípteros da família Sarcophagidae, também conhecidos como “moscas-da-carne”, são atraídos por matéria orgânica animal em decomposição, incluindo fezes e carcaças, substratos usados para criação de suas larvas, que são depositadas já em primeiro instar (213). Em nosso estudo, as espécies coletadas dessa família foram: *Tricharaea (Sarcophagula) occidua*, *Peckia Sarcodexia lambens* e *Malacophagomya filamenta*.

4.2 Isolamento bacteriano, identificação bacteriana e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

4.2.1 Isolamento bacteriano

O estudo dos microbiomas, especialmente as relações entre insetos e sua microbiota é um desafio, pois muitos microrganismos não são possíveis de serem cultivados (214). A evolução das técnicas de biologia molecular, especialmente o sequenciamento do gene 16S rRNA, PCR-DGGE (215) e a metagenômica permitiram grande avanço nos estudos de microbiomas ambientais e humanos (216). Entretanto, essas técnicas consistem em procedimentos complexos, que exigem o domínio e o aprimoramento de ferramentas de análise em bioinformática, especialmente em relação à metagenômica (216).

O desenvolvimento do cultivo e o isolamento de microrganismos sempre foram objetos de estudo dos microbiologistas desde os primórdios da bacteriologia. Essa metodologia foi de extrema importância para a consolidação da Microbiologia (216) e consiste em uma técnica simples, barata e que permite acesso às culturas puras dos isolados para estudos posteriores. Nesse sentido, o presente trabalho baseou-se em uma metodologia tradicional de isolamento bacteriano dependente de cultivo, a partir dos dípteros muscoides coletados.

O plaqueamento das diluições dos 117 dípteros muscoides resultou em um total de 238 isolados bacterianos purificados, que foram estocados e alocados em um pequeno acervo de bactérias de origem ambiental. No entanto, conforme relatado em outro estudo (216), pode haver perda de isolados bacterianos puros, em função da ausência de simbiontes necessários, nutrientes, excesso de compostos inibitórios, combinação incorreta entre temperatura e pressão e, acúmulo de compostos tóxicos decorrentes do próprio metabolismo celular. Dessa forma, trabalhamos com 197 isolados, em função da perda de 41 isolados bacterianos.

A Tabela 12 apresenta o número de isolados inicialmente, a partir do plaqueamento dos macerados de dípteros muscoides, e o número final dos mesmos.

Tabela 12: Quantitativo de isolados inicial e final do estudo, por ponto de coleta.

Ponto de coleta	Quantitativo Inicial de isolados	Quantitativo final de isolados
Ponto 1	61	59
Ponto 2	24	23
Ponto 3	19	19
Ponto 4	73	51
Ponto 5	61	45
Total	238	197

4.2.2 Identificação bacteriana e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O isolamento bacteriano a partir das coletas nos pontos 1, 2 e 3 foi feito utilizando-se AN e AN com ceftriaxona (1 mg/L), uma cefalosporina de terceira geração, permitindo o crescimento tanto de bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas. Quanto ao isolamento feito a partir dos pontos 4 e 5, foram utilizados outros meios de cultura além dos citados, como AS, AM, EMB e EMB com 8 mg/L de polimixina B. O AS é considerado um meio diferencial e não seletivo, além de permitir a verificação do padrão de hemólise em *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. O meio AM contém cristal violeta, que inibe o crescimento de organismos Gram-positivos, sendo utilizado para isolar bacilos Gram-negativos (enterobactérias e não fermentadores), além de possibilitar a fermentação ou não da lactose. O meio EMB é um meio de cultura diferencial, que inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e indica se a bactéria é fermentadora (forma colônia com o centro preto) ou não de lactose (217). Nesse sentido, as coletas realizadas nos pontos 4 e 5 apresentaram

maior tendência de isolamento de bactérias Gram-negativas, em função dos meios de cultura empregados.

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado por meio da técnica de disco difusão (item 3.3.1), de acordo com as condições do CLSI (2017) (179) e EUCAST (2019) (44). Dos nove antimicrobianos utilizados neste estudo (tetraciclina, meropenem, cefepime, ceftazidima, cloranfenicol, gentamicina, ciprofloxacina, ceftazidima e trimetoprim-sulfametoxazol), todos são recomendados para utilização em enterobactérias, cinco são recomendados para utilização com *P. aeruginosa* (ceftazidima, cefepime, meropenem, gentamicina e ciprofloxacina), sete são preconizados para *Acinetobacter* spp. (ceftazidima, cefepime, meropenem, gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol), apenas um para *S. maltophilia* (trimetoprim-sulfametoxazol), cinco são recomendados para *Pseudomonas* spp. (cefepime, ceftazidima, meropenem, ciprofloxacina e gentamicina), cinco para *Staphylococcus* spp. (gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol) e apenas três para *Enterococcus* spp. (tetraciclina, ciprofloxacina e cloranfenicol). Dessa forma, o presente estudo apresentou uma maior tendência na detecção de resistência fenotípica, em Gram-negativos, especialmente em enterobactérias.

A Tabela 13 apresenta os resultados da identificação dos 197 isolados bacterianos obtidos e o perfil de susceptibilidade aos nove antimicrobianos utilizados. Não foram classificadas como sensíveis ou não sensíveis (perfil resistente e intermediário) as cepas pertencentes às espécies sem parâmetros, de acordo com os documentos supracitados (CLSI e EUCAST). Além disso, não foram considerados os microrganismos que apresentam mecanismos de resistência intrínsecos aos antimicrobianos testados.

A partir do ponto 1, foram obtidos 59 isolados bacterianos; destes, 47 Gram-negativos e 12 Gram-positivos. Entre os Gram-negativos, sete não foram identificados pelo MALDITOF-MS. Dentre os 12 Gram-positivos, foram identificados *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium flavescens* e *Micrococcus luteus* e, apenas um *Corynebacterium flavescens*. De acordo com

o MALDITOF-MS, todos obtiveram identificação confiável para o nível de espécie (*score* > 2,3).

Dentre os Gram-negativos, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter* sp., *S. maltophilia*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas* sp., *Proteus hauseri*, *Proteus* sp., *Serratia* sp., *Alcaligenes faecalis*, *E. coli*, *Rahnella aquatilis* e *Comamonas testosteroni*, de acordo com o MALDITOF-MS, obtiveram identificação confiável para o nível de espécie (*score* > 2,3).

Em relação ao perfil de não sensibilidade (resistente e intermediário) dos isolados do ponto 1, seis Gram-negativos apresentaram resistência ou perfil intermediário a um antimicrobiano, três Gram-negativos a dois antimicrobianos, e apenas um Gram-negativo apresentou resistência ou perfil intermediário a três antimicrobianos. Em relação às cepas com resistência intrínseca, foram encontrados *E. cloacae* (n=2) e *Proteus* sp. Dentre os Gram-positivos, apenas um apresentou não sensibilidade a um antimicrobiano.

As coletas realizadas no ponto 2 levaram ao isolamento de 23 isolados no total, 16 Gram-negativos e 5 Gram-positivos. Dentre os Gram-negativos, o MALDITOF-MS identificou apenas *Pseudomonas fluorescens* (*score* >2,3) e *Pseudomonas* sp. Já as Gram-positivas foram identificadas como *Staphylococcus* sp., *Microbacterium* sp., *Corynebacterium stationis* e *E. faecium* (*score* >2,3). Além disso, dois Gram-positivos não foram identificados pelo MALDITOF-MS. Apenas oito Gram-negativos apresentaram perfil de resistência aos antimicrobianos.

Do ponto 3, 19 isolados foram encontrados, sendo identificados como *Chryseobacterium* sp., *Lysinibacillus* sp., *Rummellibacillus* sp., *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas ludensis*, *Pseudomonas* sp., *Pantoea* sp. e *K. pneumoniae* (*score* >2,3). Destas, três apresentaram resistência e uma apresentou perfil intermediário a um antimicrobiano.

A partir do ponto 4, foram obtidos 51 isolados, 24 Gram-negativos, e 27 Gram-positivos. Do total, 45 foram identificadas pelo MALDITOF-MS ou por

sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, e sete não obtiveram identificação. Devemos destacar que 5 isolados, que não foram identificados previamente pelo MALDITOF-MS, foram identificados como *Kurthia* sp. pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. Apenas as cepas pertencentes às espécies *S. xylosum*, *B. cereus* e *E. faecalis* foram identificadas pelo MALDITOF-MS, com *score* acima de 2,3, o que confirma o nível taxonômico de espécie. Os Gram-positivos identificados com *score* abaixo de 2,3 foram: *E. faecalis*, *Microbacterium* sp., *B. cereus*, *Staphylococcus* sp. e *S. sciuri*. Dentre os Gram-negativos, foram identificados *E. cloacae*, *Pseudomonas taetrolens*, *E. coli*, *P. ludensis*, *P. fragi*, *Pseudomonas* sp. e *P. mirabilis*. Em relação ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos, 14 cepas apresentaram não sensibilidade (perfil de resistência ou intermediário) a pelo menos dois antimicrobianos diferentes, enquanto cinco apresentaram resistência a apenas um antimicrobiano.

Em relação aos isolados com resistência intrínseca, foram identificadas as espécies *E. cloacae* (resistente à cefoxitina), *P. rettgeri* (resistente à tetraciclina) e *Morganella morganii* (resistente à tetraciclina e à cefoxitina).

Verificou-se que, do ponto 5, dos 45 isolados obtidos, 29 foram Gram-negativos e 16 Gram-positivos. As espécies *Kluyvera ascorbata*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *B. cereus* e *R. ornithinolytica* obtiveram identificação com nível de *score* acima de 2,3. Já as espécies *Staphylococcus succinus*, *S. sciuri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Kocuria rizophila*, *Myroides odoratissimus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *E. cloacae*, *P. ludensis*, *P. fragi*, e os gêneros *Bacillus* sp. e *Enterococcus* sp. obtiveram identificação com *score* abaixo de 2,3. Além disso, 18 cepas apresentaram perfil de não sensibilidade (resistente ou intermediário) a pelo menos dois antimicrobianos, e 12 cepas apresentaram não sensibilidade a um antimicrobiano. Esses dados caracterizam o ponto 5 com maior número de isolados não sensíveis. Dentre os isolados com resistência intrínseca, foram identificados *E. cloacae* (n=2) e *Serratia marcescens* (n=1).

A partir das 175 cepas que foram identificadas pelo MALDITOF-MS ou por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, os grupos taxonômicos mais frequentes foram: Enterobactérias (32,6%), *Pseudomonas*

sp. (21,1%), *Bacillus* sp. (91%), *Staphylococcus* sp e *Enterococcus* sp. (8% cada) e *Acinetobacter* sp. (6,2%).

Boiocchi e colaboradores (198) analisaram o culturoma de dípteros coletados somente dentro de Hospitais no Reino Unido e, mesmo assim, relataram grupos bacterianos similares aos que detectamos no presente estudo, como: Enterobacteriaceae (42%), *Bacillus* spp. (24%), *Staphylococcus* spp. (19%), *Clostridium* (6%), *Streptococcus* (5%) e *Micrococcus* (2%). Nesse sentido, os dípteros são capazes de transportar ampla gama de patógenos humanos oportunistas, disseminando-os no ambiente hospitalar e no seu entorno.

Tabela 13: Cepas isoladas durante o estudo, identificação (MALDITOF-MS ou sequenciamento do gene 16S rRNA) e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Ponto de coleta	Número Cepa	Identificação	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos*								
			TET	MER	CEF	CAZ	C	GEN	CIP	FOX	TMP-SMX
1	JC1	<i>Acinetobacter pittii</i>	S	S	S	S	-	S	S	-	S
1	JC2	<i>Acinetobacter pittii</i>	S	S	S	S	-	S	S	-	S
1	JC3	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	JC4	<i>Acinetobacter pittii</i>	S	S	S	S	-	S	S	-	S
1	JC5	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	JC6	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	JC7	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	RI	S
1	JC8	<i>Acinetobacter</i> sp.	S	S	S	S	-	-	-	-	-
1	JC9	<i>Acinetobacter pittii</i>	S	S	S	S	-	S	S	-	S
1	JC10	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	S
1	JC11	<i>Acinetobacter pittii</i>	S	S	S	S	-	S	S	-	S
1	JC 13	<i>Staphylococcus sciuri</i>	S	-	-	-	S	S	S	-	S
1	JC 14	<i>Bacillus mojavensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	JC 15	<i>Acinetobacter</i> sp.	S	S	S	R	-	S	I	-	S
1	JC 16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	JC 17	<i>Corynebacterium flavescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	JC 18	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	-
1	JC 19	<i>Corynebacterium flavescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	JC 20	<i>Pseudomonas fragi</i>	ND	S	S	S	-	S	S	-	-
1	JC 21	<i>Staphylococcus xylosus</i>	S	-	-	-	S	S	S	-	S
1	JC22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	I	S	S	S	S	S	S
1	JC 23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	JC 25	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	JC 26	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
1	JC 27	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
1	JC 28	<i>Proteus hauseri</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	R
1	JO 2	NI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	JO 3	NI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	JO 5	<i>Rahnella aquatilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	JO 6	<i>Comamonas testosteroni</i>	-	S	S	S	-	R	S	-	-
1	JO 8	NI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	JO 13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	JO 14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Gênero bacteriano em amarelo: possível identificação de gênero (score entre 1,7-2,0); espécie bacteriana em amarelo: certeza de gênero e possível espécie (score entre 2,0-2,3); espécie bacteriana em verde: identificação confiável (score acima de 2,3), de acordo com análises feitas no MALDITOF-MS./ * halos em milímetros. TET (tetraciclina), MER (meropenem), CEF (cefepime), CAZ (ceftazidima), C (cloranfenicol), GEN (gentamicina), CIP (ciprofloxacin), FOX (cefoxitina), TMP-SXT(trimetoprim-sulfametoxazol)./R (resistente), S (sensível), I (intermediário), RI (resistência intrínseca), ND (não determinado) e NI (não identificado).

Tabela 13(Cont.): Cepas isoladas durante o estudo, identificação (MALDITOF-MS ou sequenciamento do gene 16S rRNA) e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Ponto de coleta	Número Cepa	Identificação	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos*									
			TET	MER	CEF	CAZ	C	GEN	CIP	FOX	TMP-SMX	
1	JO 17	<i>Klebsiella sp.</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	JO 19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	S	S	S	-	S	S	-	-	-
1	JO 20	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
1	JO 21	<i>Proteus sp.</i>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	JO 29	<i>Staphylococcus sp.</i>	-	-	-	-	S	S	S	-	-	S
1	JO 30	<i>Alcaligenes faecalis</i>	S	I	I	-	-	-	ND	-	-	R
1	JO 32	<i>Staphylococcus sp.</i>	S	-	-	-	S	S	S	-	-	S
1	JO 33	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	JO 34	NI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	JO 35	<i>Enterobacter sp.</i>	S	S	S	S	S	S	S	RI	S	S
1	JO 36	<i>Enterobacter kobei</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	JO 37	<i>Klebsiella oxytoca</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	JO 38	<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	JO 46	<i>Klebsiella variicola</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	JO 47	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	I	S	S	S	S	RI	S	S
1	JO 48	<i>Pantoea dispersa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	JO 49	<i>Pantoea dispersa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	JO 51	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	JO 52	NI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	JO 53	<i>Serratia sp.</i>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	JO 54	<i>Acinetobacter sp.</i>	I	S	S	S	-	S	S	-	-	S
1	JO 55	<i>Acinetobacter sp.</i>	I	S	S	S	-	S	S	-	-	S
1	JO 56	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	-	-	-	S	S	S	-	-	S
1	JO 57	<i>Acinetobacter sp.</i>	I	S	S	S	-	S	S	-	-	S
1	JO 58	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	S	S	S	-	S	S	-	-	-
1	JO 60	<i>Proteus sp.</i>	RI	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	JC 39	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ND	S	S	R	-	S	S	-	-	-
2	JC 40	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ND	S	S	R	-	S	S	-	-	-
2	JC 41	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ND	S	S	S	-	S	S	-	-	-
2	JC 42	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ND	S	S	S	-	S	S	-	-	-
2	JC 44	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	S	S	R	-	S	S	-	-	-
2	JC 45	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	S	R	S	-	S	S	-	-	-
2	JC 46	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	S	S	S	-	S	S	-	-	-

Gênero bacteriano em amarelo: possível identificação de gênero (score entre 1,7-2,0); espécie bacteriana em amarelo: certeza de gênero e possível espécie (score entre 2,0-2,3); espécie bacteriana em verde: identificação confiável (score acima de 2,3), de acordo com análises feitas no MALDITOF-MS./ * halos em milímetros. TET (tetraciclina), MER (meropenem), CEF (cefepime), CAZ (ceftazidima), C (cloranfenicol), GEN (gentamicina), CIP (ciprofloxacina), FOX (cefoxitina), TMP-SXT(trimetoprim-sulfametoxazol)/R (resistente), S (sensível), I (intermediário), RI (resistência intrínseca), ND (não determinado) e NI (não identificado).

Tabela 13(Cont.): Cepas isoladas durante o estudo, identificação (MALDITOF-MS ou sequenciamento do gene 16S rRNA) e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Ponto de coleta	Número Cepa	Identificação	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos*								
			TET	MER	CEF	CAZ	C	GEN	CIP	FOX	TMP-SMX
2	JC 47	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	S	S	S	-	S	S	-	-
2	JC 48	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	S	S	R	-	S	S	-	-
2	JC 49	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	S	S	R	-	S	S	-	-
2	JC 50	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	S	S	S	-	S	S	-	-
2	JO 114	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	S	S	S	-	R	S	-	-
2	JO 115	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	R	S	S	-	R	S	-	-
2	JO 116	<i>Staphylococcus sp.</i>	S	-	-	-	S	S	S	-	-
2	JO 118	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	S	S	S	-	S	S	-	-
2	JO 152	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	S	S	S	-	S	S	-	-
2	JO 153	<i>Microbacterium sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	JO 155	NI	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
2	JO 156	<i>Corynebacterium stationis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	JO 158	NI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	JO 159	<i>Enterococcus faecium</i>	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
2	JO 160	<i>Staphylococcus sp.</i>	S	-	-	-	S	S	S	-	S
2	JO 161	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	S	S	S	-	S	S	-	-
3	JC 29	<i>Chryseobacterium sp.</i>	R	-	S	S	S	S	ND	S	S
3	JC 30	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	JC 31	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	I	S	S	S	S	S
3	JC 32	<i>Lysinibacillus sp.</i>	ND	-	-	-	-	-	ND	-	-
3	JC 33	<i>Pseudomonas sp.</i>	ND	S	S	S	-	S	ND	-	-
3	JC 34	<i>Rummeliibacillus sp.</i>	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
3	JC 35	NI	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
3	JC 36	NI	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
3	JC 37	<i>Rummeliibacillus sp.</i>	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
3	JC 38	<i>Rummeliibacillus sp.</i>	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
3	JO 61	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	JO 62	<i>Pseudomonas lundensis</i>	-	S	S	S	-	S	S	-	-
3	JO 63	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	JO 64	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	S	S	S	-	S	S	-	-
3	JO 65	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	S	S	S	-	S	I	-	-

Gênero bacteriano em amarelo: possível identificação de gênero (score entre 1,7-2,0); espécie bacteriana em amarelo: certeza de gênero e possível espécie (score entre 2,0-2,3); espécie bacteriana em verde: identificação confiável (score acima de 2,3), de acordo com análises feitas no MALDITOF-MS./ * halos em milímetros. TET (tetraciclina), MER (meropenem), CEF (cefepime), CAZ (ceftazidima), C (cloranfenicol), GEN (gentamicina), CIP (ciprofloxacina), FOX (cefoxitina), TMP-SXT(trimetoprim-sulfametoxazol)/R (resistente), S (sensível), I (intermediário), RI (resistência intrínseca), ND (não determinado) e NI (não identificado).

Tabela 13(Cont.): Cepas isoladas durante o estudo, identificação (MALDITOF-MS ou sequenciamento do gene 16S rRNA) e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Ponto de coleta	Número Cepa	Identificação	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos*								
			TET	MER	CEF	CAZ	C	GEN	CIP	FOX	TMP-SMX
3	JO 66	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	S	S	S	-	S	S	-	-
3	JO 67	NI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	JO 68	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	S	S	S	-	S	S	-	-
3	JO 69	<i>Pantoea sp.</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S
4	1	NI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	2	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	I	S	S	S	S	RI	S
4	4	NI	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
4	5	<i>Kurthia sp. (16S rRNA)</i>	S	S	R	I	S	S	S	S	S
4	8	<i>Pseudomonas taetrolens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	11	<i>Staphylococcus xylosum</i>	-	ND	ND	-	-	-	-	ND	ND
4	14	<i>Escherichia coli</i>	R	S	I	S	S	S	R	S	R
4	15	<i>Kurthia sp. (16S rRNA)</i>	S	I	R	R	S	S	S	S	S
4	16	NI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	31	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	32	<i>Bacillus sp. (16S rRNA)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	33	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	35	<i>Proteus mirabilis</i>	RI	S	S	S	S	S	S	S	S
4	36	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
4	39	<i>Pseudomonas lundensis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	40	<i>Bacillus cereus / anthracis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	41	<i>Staphylococcus sciuri</i>	ND	S	S	S	S	S	S	S	S
4	42	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	ND	ND	ND	-	ND	R	-	-
4	43	<i>Bacillus megaterium/ coagulans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	45	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	46	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	47	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
4	50	<i>Pseudomonas fragi</i>	-	S	R	R	R	-	I	-	ND
4	51	<i>Staphylococcus sp.</i>	ND	ND	-	-	ND	-	-	ND	ND
4	83	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	ND	-	-	ND
4	84	<i>Microbacterium sp.</i>	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND
4	85	<i>Staphylococcus sp. (16s rRNA)</i>	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
4	86	<i>Pseudomonas lundensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	88	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Gênero bacteriano em amarelo: possível identificação de gênero (score entre 1,7-2,0); espécie bacteriana em amarelo: certeza de gênero e possível espécie (score entre 2,0-2,3); espécie bacteriana em verde: identificação confiável (score acima de 2,3), de acordo com análises feitas no MALDITOF-MS./ * halos em milímetros. TET (tetraciclina), MER (meropenem), CEF (cefepime), CAZ (ceftazidima), C (cloranfenicol), GEN (gentamicina), CIP (ciprofloxacina), FOX (cefoxitina), TMP-SXT(trimetoprim-sulfametoxazol)/R (resistente), S (sensível), I (intermediário), RI (resistência intrínseca), ND (não determinado) e NI (não identificado).

Tabela 13(Cont.): Cepas isoladas durante o estudo, identificação (MALDITOF-MS ou sequenciamento do gene 16S rRNA) e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Ponto de coleta	Número Cepa	Identificação	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos*									
			TET	MER	CEF	CAZ	C	GEN	CIP	FOX	TMP-SMX	
4	92	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
4	94	<i>Enterococcus faecalis</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	98	<i>Escherichia coli</i>	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S
4	99	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	100	<i>Kurthia</i> sp. (16S rRNA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	101	ND	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	103	<i>Kurthia gibsonii</i> (16S rRNA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	104	<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	R	I	S	R	S	S	S
4	105	<i>Escherichia coli</i>	S	I	R	S	S	S	I	S	S	S
4	106	<i>Escherichia coli</i>	R	S	I	R	ND	S	ND	S	S	S
4	107	<i>Pseudomonas lundensis</i>	-	R	R	R	S	S	I	S	S	S
4	108	<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	109	<i>Enterococcus faecalis</i>	R	-	-	-	S	-	I	-	-	-
4	110	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	111	<i>Providencia rettgeri</i>	RI	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	112	<i>Morganella morganii</i>	RI	S	S	S	S	S	S	RI	S	S
4	113	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	I	-	I	-	-	-
4	120	<i>Acinetobacter</i> spp.	S	S	S	S	-	-	S	R	S	S
4	125	<i>Lactococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	136	<i>Enterococcus faecalis</i>	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	142	<i>Hafnia alvei</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	146	<i>Serratia marcescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S
5	17	<i>Kluyvera ascorbata</i>	S	S	R	I	S	R	S	S	S	S
5	18A	<i>Staphylococcus succinus</i>	R	-	-	-	S	S	S	-	I	I
5	18B	<i>Myroides odoratimimus</i>	S	S	I	R	S	R	I	R	S	S
5	23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	R	R	R	S	R	I	R	R	R
5	24	<i>Kocuria rhizophila</i>	S	I	R	R	S	S	ND	S	S	S
5	25	<i>Escherichia coli</i>	R	I	I	S	S	S	S	S	S	R
5	26	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	S	R	S	-	R	R
5	28 A	<i>Kurthia</i> sp. (16S rRNA)	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-
5	28B	<i>Staphylococcus sciuri</i>	ND	-	-	-	S	S	S	-	S	S
5	29	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ND	-	-	-	S	S	S	-	S	S
5	30	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Gênero bacteriano em amarelo: possível identificação de gênero (score entre 1,7-2,0); espécie bacteriana em amarelo: certeza de gênero e possível espécie (score entre 2,0-2,3); espécie bacteriana em verde: identificação confiável (score acima de 2,3), de acordo com análises feitas no MALDITOF-MS./ * halos em milímetros. TET (tetraciclina), MER (meropenem), CEF (cefepime), CAZ (ceftazidima), C (cloranfenicol), GEN (gentamicina), CIP (ciprofloxacina), FOX (cefotaxima), TMP-SXT(trimetoprim-sulfametoxazol)/R (resistente), S (sensível), I (intermediário), RI (resistência intrínseca), ND (não determinado) e NI (não identificado).

Tabela 13(Cont.): Cepas isoladas durante o estudo, identificação (MALDITOF-MS ou sequenciamento do gene 16S rRNA) e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Ponto de coleta	Número Cepa	Identificação	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos*									
			TET	MER	CEF	CAZ	C	GEN	CIP	FOX	TMP-SMX	
5	52	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	53	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R	S	R	R	RI	S	S
5	54	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
5	55	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	62	<i>Enterococcus faecalis</i>	S	-	-	-	ND	-	S	-	-	-
5	63	<i>Enterococcus faecalis</i>	S	-	-	-	S	-	R	-	-	-
5	64	<i>Enterococcus faecalis</i>	R	-	-	-	R	-	R	-	-	-
5	65	<i>Candida parapsilosis</i>	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	67	<i>Pseudomonas lundensis</i>	S	S	R	ND	S	S	S	S	S	S
5	68	<i>Bacillus cereus</i>	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	69	<i>Enterococcus sp.</i>	R	-	-	-	S	-	S	-	ND	ND
5	70	<i>Enterobacter cloacae</i>	RI	S	S	S	S	S	S	RI	R	R
5	71	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	R	S	R	R	S	R	I	S	R	R
5	72	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	73	ND	ND	-	-	-	ND	-	-	ND	ND	ND
5	76	<i>Pseudomonas fragi</i>	-	S	S	S	ND	R	I	-	-	-
5	77	<i>Enterococcus faecalis</i>	ND	-	-	-	S	-	R	-	-	-
5	78	<i>Pseudomonas lundensis</i>	-	S	S	I	-	-	ND	-	-	-
5	79	<i>Enterococcus faecalis</i>	ND	-	-	-	ND	ND	S	ND	ND	ND
5	114	<i>Providencia alcalifaciens</i>	RI	S	S	S	S	S	S	I	S	S
5	115	<i>Pseudomonas fragi</i>	ND	-	-	-	-	-	-	R	-	-
5	116	<i>Serratia marcescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S
5	117	<i>Pseudomonas putida</i>	ND	-	-	-	-	-	I	R	-	-
5	118	<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	119	<i>Serratia marcescens</i>	S	S	I	R	S	R	S	RI	S	S
5	132	<i>Hafnia alvei</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	134	<i>Serratia marcescens</i>	R	R	I	I	-	I	S	S	S	S
5	135	<i>Serratia marcescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S
5	137	<i>Serratia marcescens</i>	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
5	138	<i>Pseudomonas spp.</i>	ND	-	-	R	-	R	-	-	-	I
5	139	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ND	R	S	S	S	R	ND	R	-	-
5	140	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-
5	141	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-

Gênero bacteriano em amarelo: possível identificação de gênero (score entre 1,7-2,0); espécie bacteriana em amarelo: certeza de gênero e possível espécie (score entre 2,0-2,3); espécie bacteriana em verde: identificação confiável (score acima de 2,3), de acordo com análises feitas no MALDITOF-MS./ * halos em milímetros. TET (tetraciclina), MER (meropenem), CEF (cefepime), CAZ (ceftazidima), C (cloranfenicol), GEN (gentamicina), CIP (ciprofloxacina), FOX (cefoxitina), TMP-SXT(trimetoprim-sulfametoxazol)./R (resistente), S (sensível), I (intermediário), RI (resistência intrínseca), ND (não determinado) e NI (não identificado)

Dípteros muscoides apresentam grande potencial de disseminação de bactérias, tanto patógenos entéricos quanto microrganismos comensais, em função de sua ampla movimentação e alta capacidade de alcance de voo, podendo chegar a 7 quilômetros de raio (218). Além disso, as moscas podem transmitir patógenos, como *Campylobacter* sp., *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., além de bactérias multirresistentes (149) (219) (220). No presente estudo, os dípteros foram coletados em locais onde havia grande acúmulo de resíduos sólidos, excrementos e restos de comida, o que é um atrativo para esses insetos, com exceção dos pontos 2 e 3.

As bactérias isoladas possuem como origem tanto a superfície externa dos dípteros muscoides como seu trato digestório, pois acreditamos que, independentemente da sua localização no corpo do inseto, elas podem ser transmitidas da mesma forma ao homem, com o hábito de regurgitação do alimento pelo inseto, por meio da defecação e por suas patas e asas (218).

O isolamento de bactérias a partir do macerado de moscas inclui tanto as aderidas à sua superfície externa, quanto às bactérias presentes em seu trato digestório. Além disso, durante a coleta utilizando garrafas *pet*, as moscas podem entrar em contato umas com as outras no saco plástico, possivelmente trocando bactérias entre si. Mesmo assim, estes insetos podem continuar veiculando e transportando bactérias adquiridas para outros ambientes.

A resistência aos antimicrobianos consiste em uma grande ameaça à saúde pública no mundo inteiro, pois afeta tanto os países desenvolvidos quanto os subdesenvolvidos. Inúmeros trabalhos científicos têm relatado a presença de bactérias multirresistentes isoladas a partir de dípteros muscoides, o que evidencia a ampla disseminação dos genes que conferem resistência aos antimicrobianos (148) (219) (221).

De acordo com a Tabela 14, pode ser observado o número de cepas não sensíveis (resistentes ou intermediárias) para cada antimicrobiano, por ponto de coleta, de acordo com os critérios estabelecidos pelo EUCAST (2019) e CLSI (2017). Não foram consideradas as cepas com resistência intrínseca

aos antimicrobianos para esta análise. É possível perceber que os pontos 4 e 5 apresentam as maiores taxas de não sensibilidade aos antimicrobianos, especialmente à tetraciclina, cefepime, ceftazidima e ciprofloxacina.

Tabela 14: Número de isolados não sensíveis para cada antimicrobiano testado, por ponto de coleta.

	Agente Antimicrobiano								
	Número de isolados não sensíveis								
	TET	MEM	CEF	CAZ	C	GEN	CIP	FOX	TMP-SXT
Ponto 1	6	1	2	0	1	0	1	0	1
Ponto 2	0	0	1	5	0	2	0	0	0
Ponto 3	1	0	0	1	0	0	1	1	0
Ponto 4	5	4	10	6	2	0	8	2	1
Ponto 5	12	7	11	11	4	11	9	10	7

TET (tetraciclina), MER (meropenem), CEF (cefepime), CAZ (ceftazidima), C (cloranfenicol), GEN (gentamicina), CIP (ciprofloxacina), FOX (cefoxitina), TMP-SXT(trimetoprim-sulfametoxazol).

A análise de variância (Anova) demonstrou que as taxas de resistência por ponto de coleta variaram estatisticamente ($p < 0,05$). Por meio do teste *T Student* foi possível comparar, par a par, as taxas entre os diferentes pontos. De acordo com as análises, o ponto 5 foi o único ponto que se diferenciou estatisticamente dos demais, obtendo sempre um valor de $p < 0,05$ a cada comparação feita pelo teste. Além disso, a análise realizada pelo *software Statistica 7.0* confirmou os resultados obtidos pelo Teste *T Student*, mostrando o ponto 5 como diferente dos demais. A Figura 9 apresenta o resultado da análise de *cluster*. É importante ressaltar que esta análise foi realizada levando em consideração apenas as cepas não sensíveis (resistentes e intermediárias) isoladas apenas a partir de placas de AN, com e sem antibiótico, e não foram contabilizadas as cepas com resistência intrínseca.

As coletas realizadas na caçamba de lixo no interior do Hospital resultaram em um total de 35 insetos; e destes, 51 isolados foram estudados. No entanto, as coletas realizadas no ponto 5, próximo ao hospital, resultaram em 21 insetos, e destes foram obtidos 45 isolados. Apesar dos números inferiores em relação aos dípteros muscoides coletados e aos isolados, o ponto 5 apresentou taxas de não sensibilidade aos antimicrobianos estatisticamente

significativas. Essa diferença pode ser interpretada a partir das características do ponto 5, pois, em todas as coletas havia uma grande concentração de resíduos domésticos, como fraldas sujas de criança e restos de comida. Além disso, a caçamba de lixo do ponto 5 não apresenta nenhum tipo de cobertura, tornando-se um local mais quente e propício à proliferação bacteriana e à atração dos dípteros muscoides. Aliada a esses fatores, a proximidade do hospital pode fazer com que estes dípteros estejam veiculando bactérias com diferentes mecanismos de resistência, tornando o ponto 5 um possível *hotspot* de disseminação da resistência.

Além disso, pode haver resíduo hospitalar no entorno do hospital, onde populações de moscas podem entrar em contato com tais resíduos e em caçambas de resíduos domésticos, estabelecendo uma relação entre lixo hospitalar e lixo doméstico comum.

Em estudo recentemente publicado, relatou-se uma maior prevalência de cepas de *E. coli* multirresistentes isoladas de moscas domésticas, coletadas nos arredores de um hospital em Bangladesh, quando comparadas às cepas de outras áreas, como residências, mercados e fazendas. De forma semelhante, em nosso estudo, também detectamos maiores taxas de resistência a partir dos dípteros coletados no lixo do hospital (Ponto 5). Os autores relataram maior resistência à tetraciclina (96,97%) e, resistência mais baixa à gentamicina (8,33%) (222). Nossos dados, apesar de apresentarem taxas gerais de resistência mais baixas, confirmaram a alta resistência à tetraciclina e também à gentamicina e à cefoxitina, porém menor resistência ao cloranfenicol, seguido de meropenem e trimetoprim-sulfametoxazol (Tabela 14).

A propósito, de acordo com Akhtar e colaboradores (2009), o trato digestório de *Musca domestica* é um local adequado para a transferência de genes de resistência plasmídeos, como *tetM*. Esses pesquisadores enfatizam o potencial desses insetos como amplificadores e vetores biológicos da resistência antimicrobiana (156).

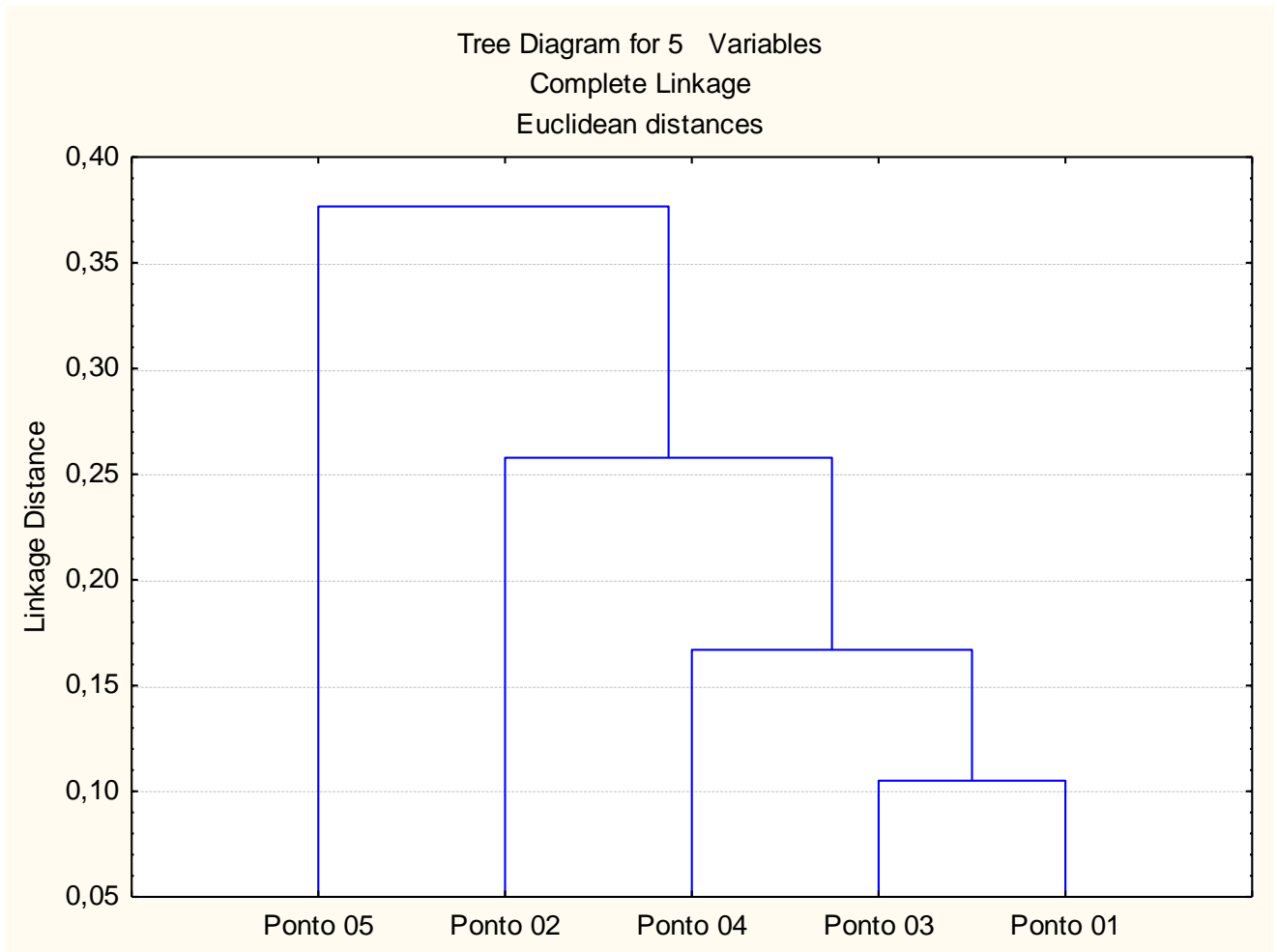


Figura 9: Análise de *cluster* gerada pelo programa Statistica versão 7.0, considerando o número de isolados não sensíveis por ponto de coleta e por antimicrobiano testado, ponderando-se o número total de isolados por ponto. Foram consideradas apenas as cepas isoladas a partir de placas de AN, e não foram consideradas as resistências intrínsecas.

4.3 Análise de perfil de multirresistência

A análise de perfil de multirresistência foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos por Magiorakos e colaboradores (2012) (40), item 3.3.3. De acordo com estes critérios, enterobactérias consideradas multirresistentes são aquelas que apresentam não sensibilidade (perfil resistente ou intermediário) a pelo menos um agente antimicrobiano em três ou mais classes

a seguir: aminoglicosídeos, cefalosporinas de amplo espectro, penicilinas associadas aos inibidores de beta-lactamases, carbapenemas, cefamicinas, fluoroquinolonas, inibidores da via do folato, glicilciclinas, ácidos fosfônicos fenícol, polimixinas e tetraciclinas, com base nos resultados obtidos no teste de difusão em ágar.

Na Tabela 15 está apresentado o perfil de sensibilidade de dez cepas de enterobactérias isoladas a partir dos dípteros muscoides, classificadas como MDR. Destas, apenas três cepas (todas identificadas como *E. coli*) foram obtidas a partir do ponto 4, e sete cepas foram isoladas do ponto 5 (duas identificadas como *E. coli*, duas identificadas como *S. marcescens*, uma como *K. pneumoniae*, uma como *R. ornithinolytica* e uma como *E. cloacae*). Em comum, todas as dez cepas apresentaram não sensibilidade (resistência ou intermediário) a pelo menos uma cefalosporina de amplo espectro testada (cefepime ou ceftazidima). Não foram identificadas amostras de enterobactérias multirresistentes isoladas a partir dos pontos 1, 2 e 3.

Tabela 15: Cepas de enterobactérias, isoladas a partir de moscas, classificadas como multirresistentes, de acordo com Magiorakos e colaboradores (2012) (40).

Ponto de coleta	Cepa – Identificação	Perfil de Não sensibilidade
Ponto 4	14) <i>Escherichia coli</i>	Tetraciclina, cefalosporinas, ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol
	104) <i>Escherichia coli</i>	Cefalosporinas, cloranfenicol, ciprofloxacina
	105) <i>Escherichia coli</i>	Meropenem, cefalosporinas, ciprofloxacina
Ponto 5	23) <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Meropenem, cefalosporinas, gentamicina, ciprofloxacina, cefoxitina, trimetoprim-sulfametoxazol
	25) <i>Escherichia coli</i>	Tetraciclina, meropenem, cefalosporinas, trimetoprim-sulfametoxazol
	26) <i>Escherichia coli</i>	Tetraciclina, meropenem, cefalosporinas, gentamicina, cefoxitina, trimetoprim-sulfametoxazol
	53) <i>Enterobacter cloacae</i>	Tetraciclina, meropenem, cefalosporinas, gentamicina, ciprofloxacina
	71) <i>Raoultella ornithinolytica</i>	Tetraciclina, cefalosporinas, gentamicina, ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol

119) <i>Serratia marcescens</i>	Cefalosporinas, gentamicina, cefoxitina
134) <i>Serratia Marcescens</i>	Tetraciclina, meropenem, cefalosporinas e gentamicina

4.4 Detecção de genes de resistência por PCR e análise do perfil de sensibilidade das amostras de origem clínica

As amostras isoladas a partir de dípteros muscoides que apresentaram não sensibilidade a algum β -lactâmico testado, através do TSA por disco difusão, foram submetidas à detecção de genes de resistência por PCR, de acordo com as condições descritas no item 3.7. Além disso, todas as amostras provenientes do hospital municipal, a partir de material clínico e isoladas em 2019, também foram submetidas à PCR.

Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS) é qualquer infecção adquirida após a admissão do paciente no hospital. As IRAS podem manifestar-se durante a internação ou após a alta, desde que estejam relacionadas com a internação ou com os procedimentos realizados durante a internação. Podem ainda estar relacionadas com procedimentos realizados em ambulatorios, consultórios e outras unidades de atendimento à saúde (223).

As infecções de sítio cirúrgico (ISC) se configuram como um dos principais riscos à segurança dos pacientes hospitalizados no Brasil e ocupam o 3º lugar das IRAS, ocorrendo nos primeiros 30 dias após a cirurgia (224). As infecções da corrente sanguínea (ICS) associadas a cateteres são também de grande importância. O estudo *Brazilian Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance (Brazilian SCOPE)* apontou para 40% de mortalidade entre pacientes com ICS (225). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), em amostras clínicas de hemoculturas, cerca de 40% dos isolados de *Klebsiella* spp. no Brasil são resistentes aos carbapenemas. Já em infecções ocasionadas por *Acinetobacter* spp., as taxas de resistência alcançam quase 80% (226).

As infecções do trato respiratório estão associadas aos casos de pneumonia relacionada à assistência à saúde (com ou sem ventilação

mecânica), e não há dados epidemiológicos precisos por causa da falta de critérios diagnósticos uniformes e claros (227). A infecção do trato urinário (ITU) é uma das causas prevalentes das IRAS que possuem alto potencial preventivo, uma vez que a maioria está relacionada à cateterização vesical. As ITU são responsáveis por 35-45% das IRAS em pacientes adultos, e as bactérias Gram-negativas (enterobactérias e não fermentadores) são as mais frequentes, mas o gênero *Enterococcus* também apresenta importância epidemiológica (226).

A Tabela 16 apresenta o perfil de susceptibilidade dos microrganismos isolados de pacientes (hemocultura ou urinocultura) do hospital municipal onde coletamos os dípteros muscoides, durante os anos de 2016, 2017 e 2018. Foi observado um número maior de microrganismos Gram-negativos isolados, em relação ao número de Gram-positivos.

Tabela 16: Perfil de identificação e susceptibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos de origem clínica isolados no hospital municipal, nos anos de 2016, 2017 e 2018.

Ano	Características dos microrganismos obtidos	
2016	Hemocultura	<ul style="list-style-type: none"> - 18 cepas Gram-negativas - <i>K. pneumoniae</i> (três sensíveis, uma ESBL positiva e uma KPC positiva), <i>E. coli</i> (duas sensíveis, uma ESBL positiva), <i>P. aeruginosa</i> resistente aos carbapenemas (n=3), <i>Acinetobacter</i> sp. (duas resistentes aos carbapenemas e uma sensível) - 16 cepas Gram-positivas – seis cepas de <i>S. aureus</i> sensíveis e dez cepas de CA-MRSA. - duas leveduras
2017	Hemocultura (clínica médica)	<ul style="list-style-type: none"> - 12 Gram-negativos – seis <i>K. pneumoniae</i> (duas sensíveis, duas produtores de ESBL e duas KPC positivos) - seis Gram-positivos – três <i>S. aureus</i> e três CA-MRSA
	Hemocultura (CTI geral)	<ul style="list-style-type: none"> - nove Gram-negativos – <i>K. pneumoniae</i> (duas ESBL positiva e uma resistente aos carbapenemas). - oito Gram-positivos - 1 levedura.
	Urinocultura	- 46 cepas Gram-negativas – uma resistente à polimixina B, 11 <i>K. pneumoniae</i>

	(clínica médica)	(três sensíveis, três produtoras de ESBL e cinco produtoras de KPC) e 14 identificadas como <i>E. coli</i> (cinco sensíveis e nove produtoras de ESBL) - 7 Gram-positivos - 2 <i>Enterococcus</i> sensíveis à vancomicina, e 5 resistentes à vancomicina (VRE)
2018	Urinocultura (clínica médica)	- 28 Gram-negativos - <i>E. coli</i> (três ESBL positivos, três resistentes aos carbapenemas, quatro sensíveis e duas resistentes à ciprofloxacina), <i>K. pneumoniae</i> (três resistentes aos carbapenemas e duas sensíveis), <i>P. aeruginosa</i> (três sensíveis e três resistentes à ciprofloxacina). - 5 Gram-positivos - 2 leveduras
	Hemocultura (clínica médica)	- 10 Gram-negativos - <i>E. coli</i> (duas ESBL positivos, duas KPC positivas e uma resistente à ciprofloxacina), uma <i>Proteus mirabilis</i> . 12 Gram-positivos – quatro <i>Enterococcus</i> (três VRE), oito <i>S. aureus</i> (sete CA-MRSA)

ESBL – β -lactamase de espectro estendido, KPC- *K. pneumoniae* carbapenemase, CA-MRSA- *Staphylococcus aureus* metilina resistentes adquiridos na comunidade, VRE- *Enterococcus* resistente à vancomicina.

A Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e a equipe do Laboratório de Bacteriologia do Hospital Municipal, onde realizamos as coletas dos dípteros muscoides (pontos 4 e 5), nos forneceram 17 cepas bacterianas multirresistentes, pertencentes a diferentes espécies e origens clínicas, isoladas em 2019. A triagem das cepas provenientes de pacientes desse hospital é feita a partir de isolamento em meios de cultura seletivos, análise de Gram, identificação e análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos por meio do sistema automatizado *Vitek*.

Do total de 73 amostras isoladas a partir de mosca, selecionadas para análise de PCR (Tabela 17), apenas sete foram positivas para algum gene de resistência, sendo seis cepas provenientes do ponto 5 e apenas uma cepa proveniente do ponto 4. Do ponto 1, apenas uma cepa foi positiva para o gene *INT1*. Em relação às amostras de origem clínica (Tabela 17), foram recebidas do hospital 17 cepas pertencentes às espécies: *K. pneumoniae* (n=5), *A. baumannii* (n=3), *S. marcescens* (n=2), *P. mirabilis* (n=2), *Enterobacter* sp.

(n=1), *E. coli* (n=1), *P. stuartii* (n=1), *P. rettgeri* (n=1) e *Alcaligene faecalis* (n=1) (Tabela 17).

De acordo com a Tabela 17, podemos perceber que não foram detectadas amostras com resistência fenotípica e positivas para os genes de resistência aos β-lactâmicos (*bla*_{GIM}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} e *bla*_{SIM}) e aos aminoglicosídeos (*aac(6')-Ib*), provenientes dos pontos 1, 2 e 3. Apenas cepas isoladas a partir de moscas coletadas nos pontos 4 e 5 foram positivas para alguns estes genes. A presença dos genes de resistência *bla*_{OXA-143}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GES}, *bla*_{CTX-M}, *mcr-1* e *mcr-2* também foi investigada para as cepas com resistência fenotípica, provenientes dos pontos 4 e 5; no entanto, não foram detectadas amostras positivas para esses genes.

Tabela 17: Número de isolados positivos para os genes de resistência estudados através da técnica de PCR, por ponto de coleta.

	<i>bla</i> _{GIM}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>INT1</i>	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{SIM}	<i>aac(6')-Ib</i>
Ponto 1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Ponto 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ponto 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ponto 4	0	0	1	0	1	0	0	0	2
Ponto 5	1	1	1	0	1	5	2	0	5

Diversos estudos já relataram a presença de patógenos e de bactérias resistentes, isoladas a partir de moscas sinantrópicas; entretanto, grande parte apresenta apenas os isolados bacterianos sob o ponto de vista da resistência fenotípica (198) ou focalizando apenas uma espécie bacteriana, como *E. coli* (149)(221)(222).

Entretanto, em estudos realizados em mercados abertos no Zâmbia, foram detectadas cepas de *E. coli* positivas para os mesmos genes, com taxas variando de 35 a 42%. Sobur e colaboradores (2019) detectaram amostras de *E. coli* isoladas a partir de moscas, coletadas em áreas próximas a hospitais, produtoras do gene *bla*_{SHV}, no entanto, não foram pesquisados outros genes de resistência aos β-lactâmicos.

No Brasil, estudos mais recentes realizados em fazendas de leite, com o objetivo de analisar a veiculação de bactérias resistentes por moscas, se

encontrou os genes *bla*_{TEM} (36,3%; 49/135), *tetA* (14,8%; 20/135), *bla*_{CTX-M} (11,1%; 15/ 135) e *ampC* (4,4%; 6/135), em *E. coli*, e a presença destes genes foi associada à resistência fenotípica à cefoperazona e à ampicilina (221).

Nessa mesma perspectiva, em nosso trabalho foram encontradas duas cepas positivas para o gene *bla*_{TEM} (*K. pneumoniae* e *R. ornithinolytica*) e duas positivas para o gene *bla*_{CTX-M} (*K. pneumoniae*, *bla*_{CTX-M15} e *K. ascorbata*, que não teve seu sequenciamento realizado) (Tabela 18), o que exemplifica a ampla disseminação destes dois genes.

Os genes *bla*_{TEM} podem codificar para TEM-1, TEM-2 e, têm capacidade de hidrolisar ampicilina e penicilina e cefalotina em menor grau, e não hidrolisam cefalosporinas de amplo espectro, (assim como e SHV-1). As enzimas derivadas de TEM-1, TEM-2 e SHV-1 apresentam modificações em um ou em poucos aminoácidos, o que lhes confere características de ESBLs (46).

Em relação às enzimas do tipo CTX-M, essas conferem resistência à cefotaxima, cefepime, e algumas variantes conferem resistência à ceftazidima (46). Estima-se que a origem desta enzima seja uma β -lactamase cromossomal produzida por *K. ascorbata* (39).

De acordo com estudos brasileiros, esta enzima está atualmente amplamente disseminada em bacilos Gram-negativos, sendo CTX-M-2 e CTX-M-59 as variantes predominantes em amostras de origem clínica no Brasil (39), e CTX-M-15 e CTX-M-14 as mais prevalentes no globo (228). O presente trabalho corrobora estes dados uma vez que nove cepas de origem clínica foram positivas para este gene.

Numa tentativa de se avaliar a presença de genes móveis que codificam resistência à polimixina, presentes no ambiente, Fukuda e colaboradores (2018) (229) isolaram cepas de enterobactéria a partir de dípteros muscoides, em fazendas e áreas urbanas. Esses autores encontraram cepas positivas para MCR-1 e MCR-3, além de TEM, SHV, CTX-M-55, CTX-M-14. Apesar dos

inúmeros relatos de detecção das variantes do gene *mcr*, tanto em amostras de origem ambiental (168), quanto clínicas (230) (231), não obtivemos nenhuma cepa positiva para os genes *mcr-1* ou *mcr-2*, tanto entre as isoladas a partir de moscas, quanto entre as provenientes de material clínico.

O produto do gene *aac(6')-Ib*, que geralmente encontra-se em um integron de classe 1 em plasmídeos, confere resistência às quinolonas e baixos níveis de resistência aos aminoglicosídeos. Este gene encontra-se amplamente disseminado em enterobactérias, sendo que de acordo com Tabela 18, é possível se verificar sua presença em *E. coli*, *R. ornithinolytica* e *K.pneumoniae*. Sobur e colaboradores (2019) (222) não detectaram amostras de *E. coli*, isoladas a partir de moscas, positivas para o gene *aac(6')*. Em relação às 17 cepas isoladas a partir de material clínico, 11 foram positivas para o gene *aac(6')-Ib*, sendo 8 enterobactérias. Por outro lado, interessante foi o achado deste gene na espécie Gram-positiva *Kocuria rizophila*.

Gillings e colaboradores (232) propõem a análise do gene de integrase de integron de classe 1 (*Int1*) como um marcador genético da poluição no ambiente, pois, de acordo com os autores, este gene está associado a elementos que conferem resistência aos antimicrobianos, metais pesados e poluentes. Além disso, é encontrado em uma grande variedade de espécies bacterianas e pode ser disseminado através da transferência horizontal de genes, respondendo rapidamente às diferentes pressões ambientais. Alves e colaboradores (2018) (221) detectaram pela primeira vez no Brasil, *E. coli* isoladas a partir de moscas coletadas em fazendas, carregando integrons de classe 1, em plasmídeos conjugativos, com o único gene cassete *dfrA7*, que codifica resistência a trimetoprim.

No presente trabalho, foram detectadas quatro cepas isoladas a partir de moscas (*K. pneumoniae*, *R. ornithinolytica*, *E. coli* e *K. rizophila*) positivas para o gene *int1* (Tabela 18) que em comum, apresentam resistência fenotípica às cefalosporinas de amplo espectro. Todas essas amostras são provenientes do ponto 5, exceto uma cepa de *Bacillus* sp. positiva proveniente do ponto 1 (JC3). Em relação a essa observação, destaca-se que não foram encontrados relatos na literatura sobre a presença do gene *int1* em *Bacillus* sp. Em paralelo, entre

as 17 cepas de material clínico analisadas, 16 foram positivas para o gene *int1*. Sabe-se que hospitais são ambientes com alta pressão de seleção pelo uso de antimicrobianos, neste sentido, a presença desse gene em cepas ambientais (isoladas próximas ao hospital) e clínicas, pode ser considerada um agente acelerador da aquisição e disseminação de genes de resistência

As carbapenemases, enzimas do tipo β -lactamase com capacidade de hidrolisar e inativar os carbapenemas, tornaram-se um sério problema de saúde pública, pois limitam a utilização dos β -lactâmicos. Apesar da situação alarmante, o problema é subestimado, pois a detecção dos seus respectivos genes é difícil de ser realizada por grande parte dos laboratórios de microbiologia clínica, especialmente na América Latina e no Caribe (236). Além disso, muitas cepas produtoras de carbapenemase não exibem um fenótipo de resistência a esses antimicrobianos, não levantando suspeita que justifique a confirmação molecular (237).

Infecções causadas por microrganismos resistentes aos carbapenemas estão associadas a maiores taxas de mortalidade, internações hospitalares prolongadas e ao aumento nos custos de atenção à saúde (238). Estes dados ressaltam a importância de se realizar campanhas para prevenir a disseminação de microrganismos produtores de carbapenemase em ambientes hospitalares e extra-hospitalares, especialmente na América Latina.

Diferentes genes codificadores de carbapenemases, como *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{GES-16} e *bla*_{OXA-370} foram detectados em bactérias isoladas de ambientes aquáticos, no Rio de Janeiro (239), e também em efluentes hospitalares (240) (241). Em estudo realizado na Alemanha, Fischer e colaboradores (2016) isolaram cepas de *Salmonella* sp. e *E. coli* a partir de moscas coletadas em fazendas, positivas para o gene *bla*_{VIM-1} (242).

A enzima KPC-2 encontra-se disseminada por todo o Brasil e já foi relatada em diferentes espécies, no entanto, está mais associada a *K. pneumoniae*, especialmente às cepas pertencentes ao complexo clonal 258. O Programa Nacional de Monitoramento de Resistência Bacteriana realizado pela

Anvisa constatou taxas anuais cada vez maiores de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenemas isoladas de infecção de corrente sanguínea (243).

No Brasil, a disseminação do gene KPC-2, entre isolados clínicos, está associada à dispersão do transposon Tn4401, isoforma b (244). O transposon Tn4401 é composto pelo gene de uma transposase *tnpA*, uma resolvase *tnpR*, o gene *bla_{KPC}* e duas sequências de inserção, ISKpn6 e ISKpn7, flanqueadas por dois sítios de duplicação. Esse transposon está associado a diferentes *loci*, localizado em diferentes plasmídeos, flanqueado por diferentes sítios de duplicação, indicando um processo dinâmico de disseminação. Duas isoformas do Tn4401 já foram descritas, diferindo uma da outra por uma deleção de 100 pb (245).

No presente estudo, duas cepas isoladas a partir de mosca (*R. ornithinolytica* e *E. coli*) foram positivas para o gene *bla_{KPC}* (Tabela 18). De acordo com o sistema automatizado *Phoenix*, as duas cepas são sensíveis ao imipenem, meropenem e intermediárias para ertapenem. Em relação às cepas provenientes de material clínico, oito foram positivas para este gene, correspondendo às espécies *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *A. baumannii*, *P. stuartii* e *P. mirabilis*.

De acordo com Silva e colaboradores (2019) (246), em amostras de origem clínica, coletadas de 2012 a 2015, observaram-se taxas crescentes de cepas multirresistentes e positivas para NDM. As amostras analisadas foram recebidas de diferentes estados do Brasil (Goiás, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Sergipe), pertencentes a 11 diferentes espécies de Gram-negativos. Além disso, os autores alertam para o fato de que 44% das amostras foram obtidas de *swab* retal, o que justifica a necessidade de aumento da vigilância.

No Brasil, cepas produtoras de NDM-1 têm sido isoladas em diferentes ambientes, desde 2013 (247) e, na maioria dos casos, o gene encontra-se associado a uma estrutura móvel, o Tn3000 (248). O transposon carrega uma estrutura conservada, inteira ou truncada denominada IS*Aba*125 *upstream* ao gene *bla_{NDM}*, e o gene *ble_{MBL}* a *downstream* (248). Esses elementos

desempenham papel importante na disseminação do gene *bla*_{NDM}, uma vez que já foi detectado em diferentes plasmídeos e em diferentes espécies (246) (248).

Em relação ao gene codificador da NDM, três cepas provenientes de material clínico foram positivas para este gene, sendo uma cepa de *K. pneumoniae* e duas cepas de *A. baumannii*. Já em relação às cepas isoladas a partir de moscas, duas foram positivas para este gene, uma cepa de *K. pneumoniae* e uma de *E. coli*.

A propósito, em estudo conduzido em fazendas e mercados na China, que analisou moscas e fezes de pássaros, foram detectadas enterobactérias positivas para os genes *mcr-1* e *bla*_{NDM}. De acordo com os autores, através da análise direta do DNA das amostras, foram detectadas taxas maiores destes genes, em relação à detecção de bactérias que expressam a resistência fenotípica, indicando um setor subestimado do resistoma destes ambientes. Os autores denominaram esse fenômeno *phantom resistome*, o resistoma fantasma (249).

Tabela 18: Cepas isoladas a partir de moscas e de material clínico, positivas para genes de resistência e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de acordo com o *Phoenix*.

Cepa	Identificação	Origem	Genes de Resistência																	
				AMI	AMP	ASB	CPM	CFO	CAZ	CRO	CIP	COL	ETP	GEN	IPM	MEN	PPT	TGC		
23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ponto 5	<i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>INT1</i> , <i>aac(6')</i> - <i>lb</i>	≤ 8	≥ 16	> 16/8	> 16	> 16	> 16	> 4	> 2	≤ 1	> 1	> 8	> 8	32	> 64/4	2		
24	<i>Kocuria rizophila</i>	Ponto 5	<i>INT1</i> , <i>aac(6')</i> - <i>lb</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
26	<i>Escherichia coli</i>	Ponto 5	<i>bla</i> _{NDM} , <i>INT1</i> , <i>aac(6')</i> - <i>lb</i>	≤ 8	>16	> 16/8	> 16	> 16	> 16	> 4	2	1 1	> 1	> 8	> 8	≥ 32	> 64/4	≤ 1		
17	<i>Kluyvera ascorbata</i>	Ponto 5	<i>bla</i> _{CTX-M}	≤ 8	16	≤ 4/2	≤ 1	≤ 4	≤ 1	≤ 1	≤ 0,125	≤ 1	≤ 0,125	≤ 2	0,5	≤ 0,5	≤ 4/4	≤ 1		
71	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Ponto 5	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>INT1</i> , <i>aac(6')</i> - <i>lb</i>	≤ 8	> 16	> 16/8	R	8	> 16	4	2	≤ 1	1	≥ 8	0,5	≤ 0,5	64/4	4		
105	<i>Escherichia coli</i>	Ponto 4	<i>bla</i> _{KPC} , <i>aac(6')</i> - <i>lb</i>	≤ 8	≥ 16	> 16/8	R	≤ 4	R	> 4	2	≤ 1	1	≤ 2	1	≤ 0,5	64/4	≤ 1		
7610 I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secreção traqueal	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>INT1</i> , <i>aac(6')</i> - <i>lb</i> , <i>bla</i> _{SIM}	≥ 64	≥ 32	≥ 32	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≤ 0,5	≥ 8	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 128	2		
7579	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	<i>bla</i> _{TEM} , <i>INT11</i> , <i>bla</i> _{GES} , <i>aac(6')</i> - <i>lb</i> , <i>bla</i> _{CTX-M}	16	≥ 32	≥ 32	2	8	16	≥ 64	≥ 4	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,25	64	≤ 0,5		
7585	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	<i>bla</i> _{SHV} , <i>INT11</i> , <i>aac(6')</i> - <i>lb</i> , <i>bla</i> _{CTX-M}	4	≥ 32	≥ 32	8	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≤ 0,5	≤ 0,5	8	≤ 0,25	≤ 0,25	≥ 128	2		
2005 III	<i>Enterobacter sp.</i>	Secreção	<i>INT11</i> , <i>aac(6')</i> - <i>lb</i> , <i>bla</i> _{CTX-M}	≤ 2	16	8	≤ 1	≥ 64	8	8	≤ 0,25	≥ 16	≤ 0,5	≤ 1	2	≤ 0,25	≤ 4	2		
7523	<i>Escherichia coli</i>	Ponta de cateter	<i>bla</i> _{KPC} , <i>INT11</i> , <i>aac(6')</i> - <i>lb</i> , <i>bla</i> _{CTX-M}	4	≥ 32	≥ 32	4	≤ 4	16	≥ 64	≥ 4	≤ 0,5	≤ 0,5	≥ 16	≤ 0,25	≥ 16	≥ 128	≤ 0,5		
7542	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Swab de orofaringe	<i>bla</i> _{KPC} , <i>INT11</i> , <i>bla</i> _{OXA-23}	≤ 2	16	≤ 2	2	≥ 64	4	16	≤ 0,25	≤ 0,5	4	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,25	8	≤ 0,5		
7564	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Urina	<i>bla</i> _{TEM} , <i>INT11</i> , <i>aac(6')</i> - <i>lb</i> , <i>bla</i> _{CTX-M}	16	≥ 32	16	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≤ 0,5	≥ 8	8	≥ 16	≥ 16	≥ 128	≤ 0,5		

AMI(amicacina), AMP (ampicilina), ASB (ampicilina-sulbactam), CPM (cefepime), CFO (cefotaxima), CAZ (ceftazidima), CRO (ceftriaxona), CIP (ciprofloxacina), COL (colistina), ETP (ertapenem), GEN (gentamicina), IPM (imipenem), MEN (meropenem), PPT (piperacilina-tazobactam) e TGC (tigeciclina). Os valores marcados em vermelho significam perfil resistente ou intermediário, de acordo com o *Phoenix*.

Tabela 18 (cont.): Cepas isoladas a partir de moscas e de material clínico, positivas para genes de resistência e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de acordo com o *Phoenix*.

Cepa	Identificação	Origem	Genes de Resistência															
				AMI	AMP	ASB	CPM	CFO	CAZ	CRO	CIP	COL	ETP	GEN	IPM	MEN	PPT	TGC
7354	<i>Providencia stuartii</i>	Sangue	<i>bla</i> _{KPC} , <i>INT11</i>	≤ 2	≥ 32	≥ 32	≤ 1	16	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≤ 0,5	≥ 16	1	≤ 0,25	≤ 4	2
7252	<i>Serratia marcescens</i>	Sangue	<i>bla</i> _{KPC} , <i>INT11</i> , <i>bla</i> _{CTX-M}	≤ 2	16	8	≤ 1	16	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 4	1
7280 I	<i>Proteus mirabilis</i>	Secreção	<i>bla</i> _{KPC} , <i>INT11</i> , <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{SPM}	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 4	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	≥ 16	≤ 0,5	≤ 1	1	≤ 0,25	≤ 4	2
7280 II	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Secreção	<i>bla</i> _{KPC} , <i>INT11</i> , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{SIM} , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>aac(6')-Ib</i>	16	≥ 32	≥ 32	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≤ 0,5	≥ 8	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 128	≤ 0,5
7315	<i>Proteus mirabilis</i>	Urina	<i>bla</i> _{TEM}	≤ 2	≥ 32	≥ 32	≤ 1	16	4	≤ 1	2	≥ 16	≥ 0,5	≥ 16	2	≤ 0,25	≤ 4	4
7282	<i>Serratia marcescens</i>	Sangue	<i>bla</i> _{KPC} , <i>INT11</i>	≥ 64	≥ 32	≥ 32	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	2	≥ 16	≥ 8	2	≥ 16	≥ 16	≥ 128	1
7559	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>INT11</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>bla</i> _{CTX-M}	16	≥ 32	≥ 32	16	32	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≤ 0,5	4	4	≥ 16	≥ 16	≥ 128	≥ 8
7214 I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>INT11</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>bla</i> _{CTX-M}	2	32	32	64	64	64	64	4	0,5	8	16	16	16	128	1
7214 II	<i>Providencia rettgeri</i>	Urina	<i>INT11</i> , <i>aac(6')-Ib</i> ,	16	32	32	4	64	64	16	4	16	8	16	16	16	128	2
3229	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Urina	<i>INT11</i> , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>aac(6')-Ib</i>	4	32	4	32	64	64	64	4	0,5	ND	16	8	8	128	1

AMI(amicacina), AMP (ampicilina), ASB (ampicilina-sulbactam), CPM (cefepime), CFO (cefexitina), CAZ (ceftazidima), CRO (ceftriaxona), CIP (ciprofloxacina), COL (colistina), ETP (ertapenem), GEN (gentamicina), IPM (imipenem), MEN (meropenem), PPT (piperaciclina-tazobactam) e TGC (tigeciclina). Os valores marcados em vermelho significam perfil resistente ou intermediário, de acordo com o *Phoenix*.

4.4.1 Cepa 71 – *R. ornithinolytica*

A cepa LEMEF 71, identificada como *R. ornithinolytica*, isolada a partir de mosca, obteve destaque em relação ao seu perfil de resistência aos antimicrobianos e, por isso, foi analisada mais detalhadamente.

Raoultella é uma bactéria Gram-negativa frequentemente isolada do ambiente, como água, solo, plantas e que, nos últimos anos, emergiu como um importante patógeno (250). Este gênero foi separado do gênero *Klebsiella* em 2001, em função de análises moleculares (sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*) e fenotípicas (251). Os autores do estudo concluíram que o gênero *Klebsiella* era heterogêneo e constituído por espécies que formavam três *clusters*. O *cluster* II era composto pelas espécies *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella trevisanii* e *Klebsiella terrigena*. Estas espécies diferenciavam-se fenotipicamente por crescerem a 10°C e utilizarem L-sorbose como fonte de açúcar e, então, foram inseridas em um novo gênero, denominado *Raoultella* (251).

As dificuldades na identificação deste novo gênero podem ter contribuído para uma subestimação da sua incidência e levado a uma incerteza sobre seu papel patogênico. Todavia, os relatos clínicos envolvendo estas espécies têm aumentado, provavelmente em função da introdução de novas técnicas, como a espectrometria de massas e ferramentas moleculares, na identificação bacteriana nos laboratórios de microbiologia clínica (252).

Embora *R. ornithinolytica* tenha sido descrita como sensível aos antimicrobianos, na literatura existem inúmeros relatos de cepas produtoras de diferentes mecanismos de resistência, através da expressão de ESBLs e carbapenemases (como KPC-2, OXA-48, IMP-4, VIM-1, NDM-1) (97) (253) (254).

A cepa 71 foi isolada a partir do macerado de *Malocophagomya filamenta* (coletada no ponto 5), díptero muscoide com pouca descrição na literatura científica, em placa de AN contendo ceftriaxona (1 mg/L). A identificação bacteriana foi realizada pelo MALDITOF-MS (*score* >2,3) e

sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (255). De acordo com o TSA, o isolado apresentou resistência à tetraciclina, à cefepime, à ceftazidima, à gentamicina e ao trimetoprim-sulfametoxazol, não sensibilidade à ciprofloxacina e sensibilidade ao meropenem, ao cloranfenicol e à cefoxitina.

De acordo com análise realizada pelo sistema automatizado *Phoenix*, a amostra é sensível ao imipenem, ao meropenem e intermediária para ertapenem. O sistema detectou resistência aos mesmos antimicrobianos indicados pelo TSA e, além disso, resistência à ampicilina, à ampicilina-sulbactam, à cefazolina e à ceftriaxona (Tabela 18). A cepa apresentou positividade para o teste de inativação do carbapenema (mCIM) e negatividade para o teste de inativação do carbapenema contendo EDTA, indicando a produção de serino-carbapenemase. De acordo com Kitchel e colaboradores (2010) (256), isolados produtores de KPC apresentam grande variação nos valores de CIM aos carbapenemas, o que dificulta sua detecção em laboratórios de microbiologia clínica. Dessa forma, isolados produtores de KPC podem ser sensíveis aos carbapenemas.

A PCR convencional revelou a presença dos genes *aac(6)-Ib*, *bla_{KPC}* e *bla_{TEM}* (Tabela 18), e foi detectada a presença de plasmídeo pertencente ao grupo de incompatibilidade *IncK*. A variante KPC-2 foi confirmada por sequenciamento gênico, e também por PCR foram detectadas as sequências *ISKpn6*, *ISKpn7*, e *TnpA*, que fazem parte da estrutura do *Tn4401*, pertencente à família Tn3. Acredita-se que esse faça parte da origem da aquisição e disseminação do gene *bla_{KPC}* (245).

Diversas variantes (isoformas) do *Tn4401*, com diferentes deleções internas já foram descritas. A isoforma “a” é a mais comum e está associada à maior resistência fenotípica, enquanto a isoforma “b” é a mais longa, e possui dois promotores associados à expressão de *bla_{KPC}*. As isoformas “c” e “e” apresentam deleções de 216 e 255 pb, respectivamente, possuem apenas um promotor (P2) e, por isso, foram associados a menores níveis de expressão de *bla_{KPC}*. As isoformas “d” e “a” apresentam deleções de 99 pb, mas possuem os dois promotores intactos (164). As isoformas “f” (sem deleção), “g” (deleção de 216 pb) e “h” (deleção de 255 pb) não alinham completamente à sequência do

Tn4401, possuindo apenas parte deste elemento, sendo denominadas “non-Tn4401 elements” (NTE_{KPC}) (257).

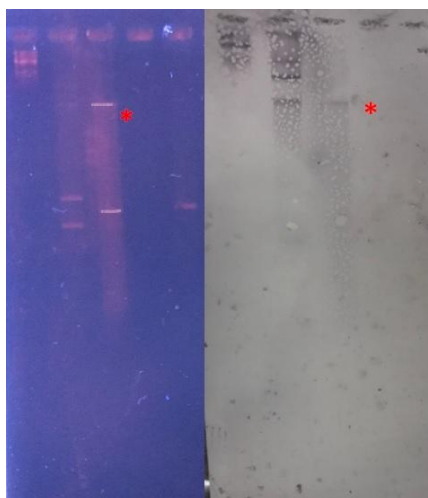


Figura 10: Esquerda: Eletroforese em gel de agarose da extração plasmideal de cepa controle (*K. pneumoniae*) positiva para o gene *bla*_{KPC} e a cepa 71 *Raoultella ornithinolytica*. Direita: Membrana após hibridização com sonda específica para o gene. Asterisco vermelho ressalta a marcação do gene *bla*_{KPC}. Poço 1 – DNA Molecular – weight marker III digoxigenin labeled (Merck), Poço 2 – cepa controle de *K. pneumoniae bla*_{KPC} positiva e Poço 3- Cepa 71 *R. ornithinolytica*.

De acordo com Gootz e colaboradores (2009) (82), deleções *upstream* ao gene *bla*_{KPC} podem afetar o promotor e a expressão do gene, influenciando nos níveis de resistência fenotípica aos carbapenemas. Além disso, isolados KPC positivos expressam diferentes doses do produto desse gene, em função da quantidade de plasmídeos carregando o gene, ou em função da quantidade de cópias de *bla*_{KPC} presente em um mesmo plasmídeo.

A fim de conferirmos a presença e a possível quantidade de plasmídeos carreador(es) dos genes detectados por PCR, foi realizada uma hibridização com a sonda para o gene *bla*_{KPC}, após extração plasmideal. De acordo com a Figura 10, podemos observar a presença do gene na cepa 71; no entanto, o sinal fraco obtido na hibridização sugere um baixo número de cópias do plasmídeo ou baixo número de cópias do gene. Além disso, não foram obtidos transconjugantes da cepa 71, utilizando-se J53. Com a metodologia empregada, não fomos capazes de determinar o peso molecular do plasmídeo que apresentou o sinal na hibridização.

Estudos anteriores com amostras clínicas de *R. ornithinolytica* relataram a presença do gene *bla*_{KPC} em plasmídeos de 11 Kb, associado ao Tn4401 (258), o que nos possibilita sugerir que esse resultado seja similar ao nosso. Uma cepa da mesma espécie, isolada de esgoto, foi detectada contendo um “novo” plasmídeo promíscuo, IncP-6, positiva para os genes IS*Kpn6*/*bla*_{KPC-2}/*bla*_{TEM-1}/IS*Kpn27* associado ao transposon Tn3 (259). Recentemente, foi feito o primeiro relato de *R. ornithinolytica* positiva para o gene *bla*_{OXA-48} associado ao Tn1999 na América do Sul, isolada de um paciente com sepse no Equador (260). Esses resultados, em conjunto com os do presente trabalho, mostram a plasticidade genômica de Enterobacteriaceae e a similaridade quanto à capacidade de carreamento do gene *bla*_{KPC} entre os gêneros *Raoultella* e *Klebsiella*.

Nesse sentido, podemos concluir que a cepa 71 *R. ornithinolytica* provavelmente possui o gene *bla*_{KPC-2} localizado em plasmídeo não conjugativo de baixo peso molecular. Além disso, em função da sensibilidade aos carbapenemas, este gene pode estar associado a uma isoforma do Tn4401, que confere baixos níveis de expressão do gene, como as isoformas “c” e “e”; no entanto, mais análises são necessárias para confirmar esta hipótese. Além disso, o plasmídeo carreador deste gene ou o próprio gene podem estar presentes em baixo número de cópias.

Nossos resultados formam o primeiro relato sobre a detecção de *R. ornithinolytica* multirresistente produtora de KPC-2, isolada a partir de díptero muscoide coletado em lixo hospitalar (261). Os dados apresentados reforçam a hipótese da rápida disseminação de genes de resistência, especialmente genes de carbapenemase em enterobactérias. Além disso, alertamos sobre a presença desses insetos em hospitais, sua participação na disseminação da resistência e a necessidade de adoção de estratégias de controle.

4.5 Cepas *bla*_{NDM} positivas

De acordo com a Tabela 18, podemos observar que duas cepas isoladas a partir de moscas e duas cepas obtidas de material clínico foram positivas para o gene *bla*_{NDM}. As cepas isoladas a partir de mosca foram Lemef

23 (*K. pneumoniae*) e Lemef 26 (*E. coli*). De acordo com o sistema automatizado *Phoenix*, Lemef 23 foi sensível apenas à amicacina, à colistina, à levofloxacina e intermediária à tigeciclina. Enquanto que Lemef 26 apresentou semelhante perfil de susceptibilidade, porém possui sensibilidade à tigeciclina. Já *K. pneumoniae* (7610I), proveniente de secreção traqueal, apresentou resistência a todos os antimicrobianos, com exceção da colistina. Por outro lado, *A. baumannii* (7280II) proveniente de secreção, apresentou perfil de susceptibilidade à amicacina, à colistina e à tigeciclina, semelhante à Lemef 26.

Enzimas do tipo metalo- β -lactamases (MBLs) são enzimas de classe B, que hidrolisam praticamente todos os antimicrobianos β -lactâmicos. Possuem em seu sítio ativo um ou dois íons de zinco divalentes (262). Nos últimos anos, 27 variantes da enzima NDM-1 foram descritas, de acordo com o *National Database of Antibiotic Resistant Organisms* (NDARO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates#/refgene/blaNDM>), resultado da troca de um ou dois resíduos de aminoácidos em diferentes posições (262).

O continente Asiático é o maior reservatório de cepas produtoras de NDM, com abundância de 58,15% dos microrganismos positivos para a variante NDM-1, distribuídas principalmente na China e na Índia. O continente Americano apresenta 10,8% da abundância total de cepas produtoras de NDM-1 reportadas no mundo, no qual o Brasil representa o maior reservatório do continente inteiro. A maioria dos relatos se concentram nas espécies *K. pneumoniae* e *E. coli* (262).

A cepa controle de NDM (*K. pneumoniae* CCBH 25645), *K. pneumoniae* (7610I), e as cepas isoladas a partir de mosca (Lemef 23 e 26) foram submetidas aos testes de inativação dos carbapenemas, com e sem EDTA. A cepa controle apresentou positividade para o teste de inativação do carbapenema (mCIM) e negatividade para o teste de inativação do carbapenema contendo EDTA, sugerindo a presença de outras enzimas, do tipo serino- β -lactamase. Já *K. pneumoniae* (7610I, Lemef 23 e 26) foram positivas para os dois testes, sugerindo a presença de metalo- β -lactamase, o

que foi confirmado através da detecção de *bla*_{NDM-1} por PCR e posterior sequenciamento do gene.

De acordo com Kumarasamy e colaboradores (2010) (264), a maioria das cepas provenientes de pacientes, de *K. pneumoniae* e *E. coli*, produtoras de NDM-1, apresentaram sensibilidade apenas à colistina e à tigeciclina, resultados semelhantes aos nossos. Na Europa, a disseminação de NDM-1 esteve associada aos genótipos importantes de *A. baumannii*, como o ST25 e o ST85. Os autores relataram a presença do gene no transposon Tn25, tanto localizado no cromossomo (265), quanto no plasmídeo (266).

O primeiro relato clínico de NDM-1 foi em um paciente sueco, previamente hospitalizado em Nova Dehli, que desenvolveu uma infecção do trato urinário causada por uma cepa multirresistente de *K. pneumoniae*, produtora de NDM-1. O aumento no intercâmbio populacional global e o aumento do turismo médico, como vem sendo observado entre pessoas que viajam para países em desenvolvimento em busca de cirurgias plásticas mais baratas (Brasil e Índia, por exemplo) provavelmente contribuíram para a disseminação deste gene de resistência (262).

No Brasil, Campana e colaboradores (2016) (267) detectaram o gene *bla*_{NDM-1}, além de outros genes de resistência, em uma cepa de *K. pneumoniae* ST 11 (CC258), isolada da praia do Flamengo, Rio de Janeiro. Em outros países, como Japão, Índia e China, cepas produtoras deste gene já foram isoladas de água de estações de tratamento (268), de carne de frango (269) e até de moscas coletadas em fazendas (249).

De acordo com Khan e colaboradores (2017), o gene *bla*_{NDM} já foi encontrado em diferentes plasmídeos, pertencentes a diferentes grupos de incompatibilidade (IncFII, IncL/M, IncN, IncR, IncHIB-M/FIB-M), sendo IncF o mais prevalente (262). A propósito, desde 2017 é possível perceber um aumento do número de estudos relatando a presença de variantes de NDM-1 em plasmídeos do grupo IncX3, em diferentes continentes, facilmente transferíveis por conjugação *in vitro* (269) (268) (270) (271). Mouftah e colaboradores (2019) analisaram plasmídeos IncX3, carreadores de *bla*_{NDM} e

outras carbapenemases, de diferentes continentes e encontraram claras relações filogenéticas entre os plasmídeos contendo NDM-1, NDM-4 e NDM-7 (270).

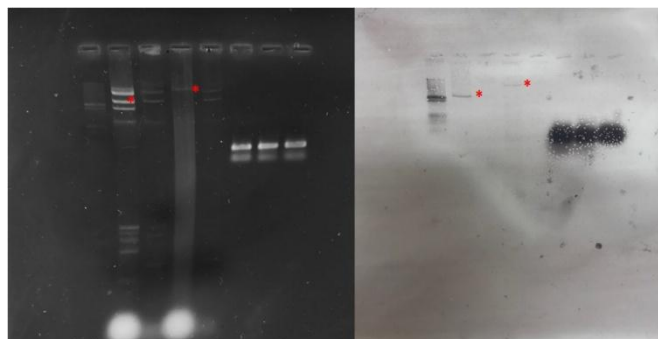


Figura 11: Esquerda: Eletroforese em gel de agarose da extração plasmideal de cepa controle (*K. pneumoniae* CCBH25645) positiva para o gene *bla_{NDM}* e as cepas 23 *K. pneumoniae* e 26 *E. coli*. Direita: Membrana após hibridização com sonda específica para o gene. Asterístico vermelho ressalta a marcação do gene *bla_{NDM}*. Poço 1 – DNA Molecular – weight marker III digoxigenin labeled (Merck), Poço 2 – cepa controle de *K. pneumoniae* CCBH 25645, Poços 3 e 5 - Cepa 23 *K. pneumoniae*, Poço 4 – Cepa 26 *E. coli* e Poços 6, 7 e 8 – Produto de PCR para o gene *bla_{NDM}* obtido das cepas 23, 26 e CCBH25645, respectivamente.

Das quatro cepas positivas para o gene *bla_{NDM}* obtidas neste estudo, apenas Lemef 23 e 26 (isoladas a partir de moscas) foram submetidas à determinação do grupo de incompatibilidade plasmideal (194). A cepa Lemef 23 (*K. pneumoniae*) mostrou-se positiva para IncY, enquanto que Lemef 26 (*E. coli*) foi positiva para IncA/C. De acordo com a Figura 11, podemos perceber que apenas a cepa controle para o gene *bla_{NDM}* (*K. pneumoniae* CCBH 25645) e Lemef 26 (*E. coli*) geraram sinal na hibridização da sonda com a membrana (obtida de gel de agarose de extração plasmideal).

Apesar de não ter sido possível determinar o tamanho do plasmídeo carreador do gene *bla_{NDM}* na cepa 26, este resultado sugere a possível localização do gene em um plasmídeo do tipo IncA/C. Paralelamente, as duas cepas foram submetidas à conjugação *in vitro* utilizando *E. coli* J53 como receptora, e obtivemos transconjugantes apenas a partir da cepa 26 (*E. coli* isolada a partir de mosca), o que reforça os resultados da hibridização. Em relação à cepa 23 (*K. pneumoniae* isolada a partir de moscas), podemos inferir

que bla_{NDM} está localizado no cromossomo bacteriano, ou o gene apresenta baixo número de cópias em um plasmídeo não conjugativo; por isso, não foi detectado pela hibridização e não foram obtidos transconjugantes.

No Brasil, bla_{NDM-1} já foi detectado em plasmídeo IncA/C de 160 Kb em amostra clínica de *Enterobacter hormaechei* (272) e também em plasmídeo do mesmo grupo Inc de 120 Kb em cepa de *E. coli* isolada da praia do Flamengo, no Rio de Janeiro (272). Estudo recente, que analisou amostras de solo brasileiro, uma cepa de *S. maltophilia* contendo plasmídeo IncA/C de aproximadamente 45 Kb carreando o gene bla_{NDM-1} foi encontrada (273). Estes resultados, em associação com os dados do presente trabalho, reforçam a ampla disseminação deste grupo de plasmídeos carreadores de NDM, sua capacidade de replicação em diferentes espécies hospedeiras e sua associação a cepas multirresistentes.

Além disso, esse gene parece estar amplamente distribuído no ambiente e não limitado ao hospital. Em estudo realizado no Japão, foi visto que enterobactérias filogeneticamente divergentes carregavam variantes de bla_{NDM} em plasmídeos IncX3 e IncFII, sugerindo eventos independentes de introdução destes microrganismos no hospital, a partir do ambiente extra-hospitalar (274).

A presença de bla_{NDM} no ambiente extra-hospitalar é preocupante, já que aumentam-se as chances de sua inserção na cadeia alimentar humana, especialmente quando detectados em dípteros muscoides, podendo causar infecções ou a colonização do homem, ou de animais. Dessa forma, homem e animais colonizados, sem a presença de sintomas, podem tornar-se reservatórios de genes de resistência (275). De acordo com Wei e colaboradores (2015) (276), a intensa disseminação de bla_{NDM} não se dá apenas em função da alta taxa de sua transferência lateral, entre espécies bacterianas diferentes, mas também em função de fatores humanos, como viagens internacionais, condições sanitárias precárias e condições de produção e preparo de alimentos.

A hipótese sobre a origem de bla_{NDM} é de que este gene, junto com ble_{MBL} teriam sido integrados ao cromossomo de *A. baumannii*, a partir de uma

espécie ambiental desconhecida. Posteriormente, teriam se associado ao elemento IS*Aba125* e transposto em plasmídeos com capacidade de replicação e transferência por conjugação em enterobactérias. O transposon composto Tn125 de *A. baumannii* tem sido apontado como o responsável pela disseminação do gene *bla*_{NDM-1} entre espécies de *Acinetobacter* e da família Enterobacteriaceae (262) (277).

O contexto genético de *bla*_{NDM-1}, na maioria dos relatos, está associado a pelo menos um remanescente da sequência IS*Aba125* (inteira ou truncada) em sua porção 5' final, e o gene *ble*_{MBL} a *downstream* de *bla*_{NDM-1}. O gene *ble*_{MBL} causa resistência à bleomicina e pertence à família dos glicopeptídeos produzidos por *Streptomyces verticillus*, e que possui propriedades antibacterianas e anticâncer. Os genes *bla*_{NDM} e *ble*_{MBL} são expressos pelo mesmo promotor, localizado *upstream* ao gene *bla*_{NDM}, na extremidade IS*Aba125* (262) (277).

4.6 Análise dos genótipos de *Klebsiella* spp.

Edwin Klebs fez a primeira descrição de uma cepa de *K. pneumoniae* em 1875, após examinar as vias aéreas de pacientes que haviam morrido de pneumonia. Posteriormente, Carl Friedlander descreveu as espécies deste gênero em 1882 (278). Estes organismos apresentam grande capacidade de recombinação cromossomal e troca de plasmídeos, alterando constantemente seu repertório de fatores de virulência e resistência, o que faz com que esse grupo esteja associado à morbidade e mortalidade humanas (279).

De acordo com Rodrigues e colaboradores (2018)(280), o complexo *Klebsiella* é formado pelos filogrupos Kp1 (*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* e *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*), que é filogeneticamente próximo aos filogrupos KP2 (*K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*), KP4 (*K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*), filogrupo Kp3 (*K. variicola*) e a outros dois filogrupos, como Kp5 e Kp6, que agrupam novas *taxa* (281).

De acordo com aspectos ecológicos, o complexo *Klebsiella* é considerado ubíquo e já foi isolado de água, plantas, solo e está presente como microrganismos comensais aos seres humanos e diversos animais (279). Além disso, essas espécies já foram associadas a infecções em animais, como vacas, cavalo (282), cloaca de aves (283), peixes (284) e moscas (150). Também são facilmente encontradas como contaminante de alimentos, tanto de origem vegetal quanto animal, desempenhando um papel importante na introdução de cepas de origem ambiental à microbiota intestinal humana (85).

Na literatura científica há evidências da presença de linhagens de importância clínica em animais domésticos, como o ST15 produtor de ESBLs isolados em gatos e cachorros (285), ou o ST 23 hipervirulento isolado de primatas não humanos (286). Estes dados sugerem que algumas cepas de importância clínica conseguem se disseminar e proliferar em nichos diferentes, aumentando as chances de trocas gênicas entre bactérias de diferentes espécies (85).

Nesse sentido, através da técnica de PFGE, analisamos a diversidade genética de 20 cepas de *K. pneumoniae*, isoladas a partir de diferentes fontes, tais como material clínico (secreção e urinocultura) de pacientes do hospital municipal e cepas isoladas a partir de moscas, coletadas em diferentes pontos (pontos 1, 3 e 5).

As cepas de origem clínica foram: 76101 sensível apenas à colistina; 7579 sensível à colistina, à tigeciclina e aos carbapenemas; 7585 sensível à colistina e aos carbapenemas; 7559 sensível à colistina e à gentamicina; e 72141 sensível à amicacina, à colistina e à tigeciclina. Todas foram provenientes de urinocultura, com exceção da cepa 76101, a mais resistente, proveniente de secreção traqueal (Tabela 18). Além destas amostras clínicas, foi utilizada uma cepa proveniente de urinocultura, sensível aos antimicrobianos, de um paciente externo, como controle. Todas estas cepas foram identificadas como *K. pneumoniae*, de acordo com o *Phoenix*.

As cepas ambientais seguintes, isoladas a partir de dípteros muscoides foram analisadas: Lemef 23, multirresistente isoladas do ponto 5; JC 31 intermediária para ceftazidima e sensível aos outros antimicrobianos testados isolada do ponto 3; JC 22 intermediária para cefepime isolada do ponto 1; JC 23 e JC 25 sensíveis a todos os antimicrobianos, isoladas do ponto 1; JO 13, JO 14 e JO 17, sensíveis a todos os antimicrobianos testados, isoladas a partir de moscas coletadas no ponto 1; JO 37 sensível, isolada do ponto 1; JO 46 e JO 51e sensíveis a todos os antimicrobianos testados, isoladas do ponto 1.

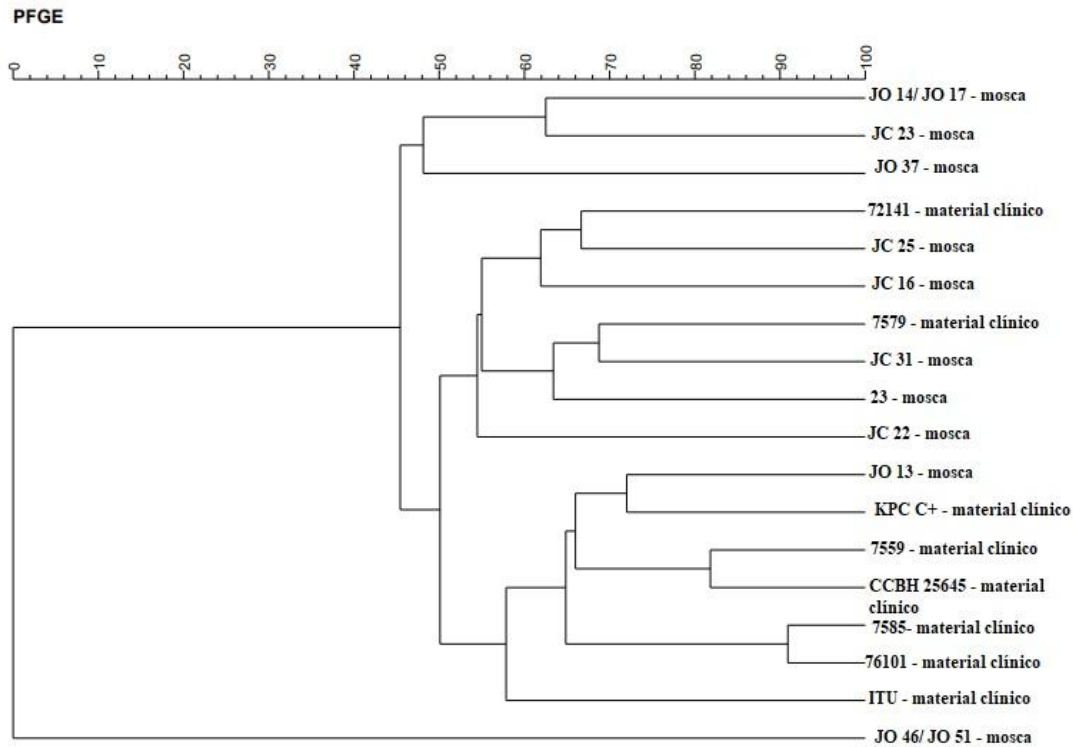


Figura 12: Dendrograma gerado através do Programa Gel Compar, utilizando o coeficiente de DICE a partir do perfil obtido após eletroforese em campo pulsado, PFGE.

Todas as cepas isoladas a partir de moscas foram identificadas como *K. pneumoniae* pelo MALDITOF-MS, com exceção das cepas JO 37 (*K. oxytoca*) e JO 46 (*K. variicola*). É importante lembrar que a cepa 23 multirresistente foi identificada como *K. quasipneumoniae* com o uso do programa KmerFinder; pertence ao ST 3997, associado à espécie *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*. As outras cepas não tiveram seu ST determinado.

De acordo com a Figura 12, podemos observar um perfil genético diverso entre as amostras analisadas. As cepas isoladas a partir de mosca, JO 46 e JO 51; JO 14 e JO 17 são idênticas entre si. As cepas isoladas de material clínico, 76101 e 7585, apesar de perfis diferentes de resistência, apresentaram 90% de identidade, podendo ser consideradas um mesmo clone, presente no mesmo hospital. As cepas 72141 e JC 25, de origens diferentes, apresentaram 65% de identidade entre si, o mesmo observado para as cepas 7579 e JC 31, o que mostra identidade, mesmo baixa, entre cepas isoladas a partir de material clínico e isoladas a partir de mosca. A cepa 23, a única *K. pneumoniae* isolada

a partir de mosca, coletada próxima ao hospital, não apresenta identidade com nenhuma cepa proveniente de material clínico do mesmo hospital, apesar do perfil multirresistente.

De acordo com Ludden e colaboradores (2019) (287), atribuir fontes de cepas de *K. pneumoniae*, causadoras de infecção, requer uma amostragem de vários reservatórios possíveis, com coletas realizadas ao mesmo tempo e no mesmo local, para comparar estes isolados através de sequenciamento do genoma total. Nesse estudo, os autores analisaram as relações genéticas entre cepas de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes, ambiente hospitalar, águas de estações de tratamento, esgoto hospitalar e fazendas, em uma mesma região na Inglaterra. Os autores não observaram uma rota de transmissão de cepas do ambiente (fazendas) para os pacientes. No entanto, detectaram a presença de *K. pneumoniae* produtor de KPC-2 no esgoto hospitalar.

Estudos anteriores relataram taxas mais altas de transmissão entre cepas de *K. pneumoniae* entre pacientes em Unidades de Tratamento Intensivo, quando comparadas às taxas de transmissão de outras enterobactérias (288). Entretanto, no presente estudo, a despeito do baixo número de cepas analisadas, não foi detectada a presença de clones de *K. pneumoniae* isolados a partir de moscas e de material clínico, revelando uma população geneticamente diversa, o que também já foi relatado em outros estudos com cepas de origem clínica (289). Nesse sentido, é preciso determinar o ST (*sequence type*) das cepas analisadas, a fim de se obterem dados epidemiológicos, porém em escala mundial.

4.7 Sequenciamento genômico da cepa 23 *K. pneumoniae*, isolada a partir de mosca, e determinação do seu *sequence type* (ST)

Apesar da grande diversidade de plasmídeos carreadores do gene que codifica para NDM em bactérias Gram-negativas, o contexto genético imediato associado a este gene (remanescentes do Tn 125 de *A. baumannii*) permanece semelhante na maioria dos casos relatados (290) (291). No entanto, o Tn 125 geralmente é encontrado acompanhado de outros elementos, como transposons e sequências de inserção, como IS*Kpn14*, IS26, IS5, ISCR1 ou elementos Tn3-like, que são frequentemente encontrados em enterobactérias e podem estar envolvidos na disseminação de *bla*_{NDM}, em decorrência de eventos de transposição e recombinação homóloga (291) (292).

A cepa 23 isolada a partir de *Musca domestica*, coletada próximo ao hospital, foi submetida ao sequenciamento genômico utilizando a plataforma *Ion Torrent*. De acordo com o programa de anotação de genes RAST, o arquivo gerado após a montagem do genoma total é formado por 276 *contigs* e possui um tamanho estimado de 5.663.872 pb, valor de N50 de 69.087 pb, com 6.097 sequências codificantes, 62 RNAs e conteúdo GC total de 57,1%. O gráfico gerado pela plataforma RAST apresenta as categorias de subsistemas encontrados no genoma total da cepa 23 e estão representados pela Figura 134.

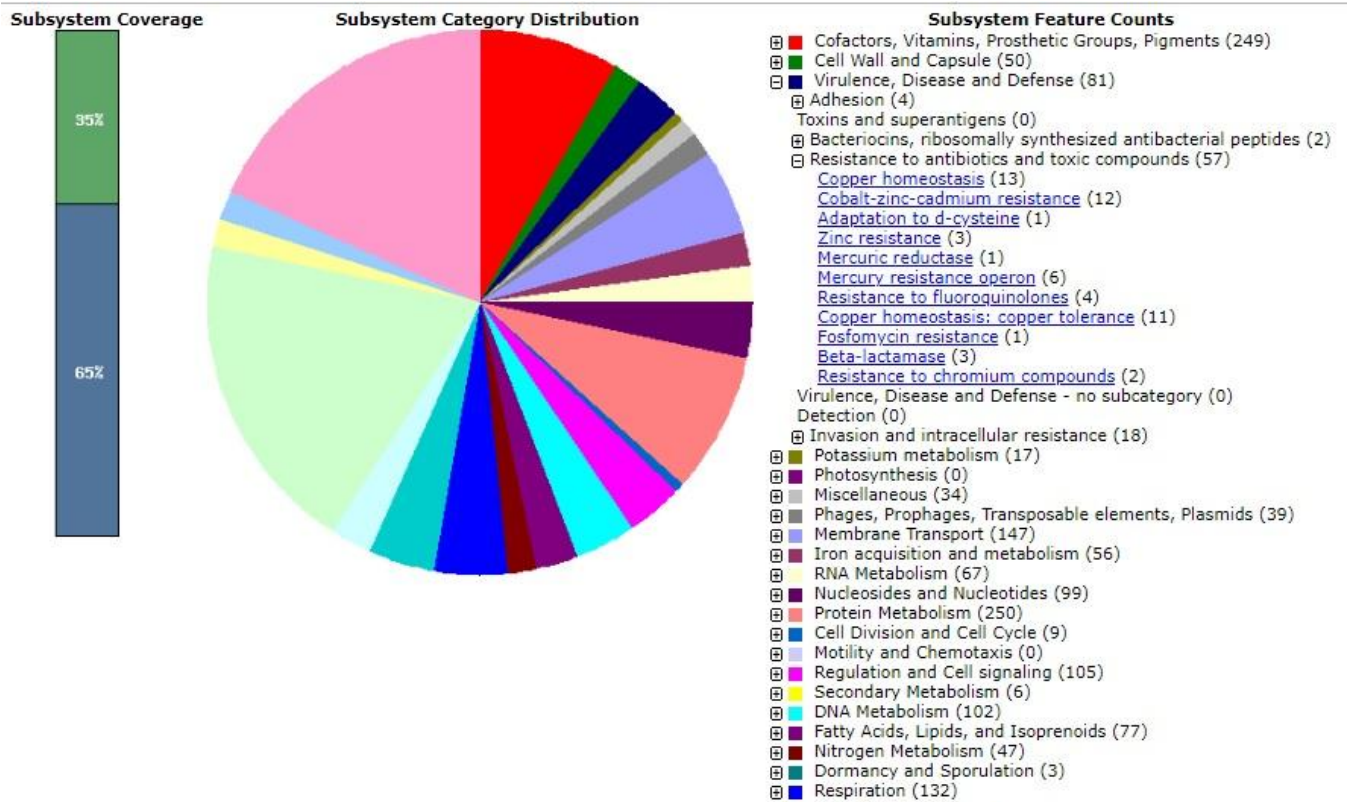


Figura 13: Distribuição de categorias de subsistemas da cepa 23 *K. pneumoniae*, de acordo com a anotação feita pelo *Rapid Annotation using subsystem technology (RAST)* a partir do arquivo fastQ da montagem do genoma total. Cada cor do gráfico representa uma categoria de subsistema (grupo funcional de genes), e as características de cada grupo estão listadas no lado direito.

De acordo com o programa, foram detectados 57 genes de resistência aos antimicrobianos e compostos tóxicos no genoma; destes, foram detectados quatro genes de resistência à fluoroquinolonas, três genes correspondentes à β -lactamases e um gene de resistência à fosfomicina, quando foi analisado o arquivo obtido da montagem do genoma total. A análise do genoma plasmideal (obtido pelo montador plasmidSPAdes) revelou a presença de 148 contigs, 1.341 sequências codificantes, 19 RNAs, conteúdo GC de 51,4%, tamanho total de 1.053.731 pb e valor de N50 de 30.545 pb. Além disso, foram encontrados genes de resistência a compostos tóxicos, apenas 1 gene de resistência à fluoroquinolonas e 31 genes relacionados a fagos e profagos.

Nesse sentido, realizamos a análise do genoma da cepa 23 através da plataforma KmerFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/KmerFinder/>), que realiza a predição da espécie através da utilização de um algoritmo específico

e da plataforma SpeciesFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SpeciesFinder>), que realiza a predição da espécie utilizando os dados do gene 16S rRNA do genoma bacteriano. A plataforma SpeciesFinder classificou a cepa como pertencente à espécie *K. pneumoniae* e a plataforma KmerFinder identificou como *K. quasipneumoniae* (cepa G4584).

De acordo com a plataforma MLSTfinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>), foi possível confirmar os mesmos alelos encontrados por PCR, de acordo com o esquema proposto para *K. pneumoniae* (193). Os alelos encontrados foram: *gapA*- 18; *infB* – 22; *mdh* – 64; *pgi* -22; *phoE* – 11; *rpoB* – 13; *tonB* – 227 e, após submissão dos alelos à curadoria do banco de dados do Instituto Pasteur, obtivemos o ST 3997 para a cepa 23. Não há relatos na literatura sobre o ST 3997 e, através de análises utilizando o *software* eBURST, este ST não forma cluster com nenhum outro ST de *K. pneumoniae*.

Além disso, de acordo com a curadoria, a cepa 23 foi identificada como pertencente à espécie *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, resultado diferente do que obtivemos utilizando as ferramentas MALDITOF-MS, Phoenix e a plataforma SpeciesFinder versão 2.0.

Cepas previamente classificadas como pertencentes aos filogrupos de *K. pneumoniae* (KpI, KpII-A, KpIIB e KpIII) foram novamente analisadas de acordo com o sequenciamento do gene 16S rRNA, sequenciamento de *multilocus* (genes *rpoB*, *fusA*, *gapA*, *gyrA* e *leuS*), média de identidade nucleotídica e características bioquímicas. Os resultados demonstraram que cepas identificadas como *K. pneumoniae* pertencem ao filogrupo KpI, cepas de *K. variicola* correspondem a KpII, enquanto KpII-A e KpII-B formam dois *clusters* distintos dentro do gênero *Klebsiella*, correspondendo às espécies *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. Nov, respectivamente (293).

As β -lactamases pertencentes ao cromossomo *core* em *Klebsiella* foram propostas como marcadores moleculares na diferenciação das espécies deste gênero, sendo *K. pneumoniae* produtor de SHV, *K. quasipneumoniae* produtor

de OKP e *K. variicola* produtor de LEN (294). No entanto, esse método apresenta alguns problemas, uma vez que existem β -lactamases do tipo SHV codificadas por plasmídeos e cepas de *K. variicola* que podem produzir OKP-B, ao invés da enzima LEN (295).

De acordo com Rodrigues e colaboradores (2018), a técnica MALDITOF-MS detecta proteínas, grande parte proteínas ribossomais, que podem ser usadas como marcadores específicos para cada filogrupos dentro do complexo *K. pneumoniae*. Os autores ressaltam a importância destes resultados serem incorporados aos bancos de dados do MALDITOF-MS, para facilitar a identificação desse complexo, contribuindo, assim, com os estudos de ecologia, epidemiologia e patogênese desse grupo (280).

No presente trabalho, após busca na literatura científica, foram encontrados nove artigos sobre a espécie *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*. Nicolás e colaboradores (2018) realizaram o primeiro sequenciamento genômico completo de uma cepa de origem clínica desta espécie, pertencente ao filogrupos II-B, produtora de KPC-2 e OKP-B-6, que havia sido identificada como *K. pneumoniae* anteriormente. Os autores alertaram para o risco potencial da emergência de clones desta cepa no Brasil (296). Ferreira e colaboradores (2019) descreveram uma cepa desta espécie hipervirulenta e hiper mucoviscosa, isolada de um paciente no Sudeste do Brasil. A cepa pertence ao ST 1484 e é resistente à colistina (297). Estes relatos chamam atenção para o fato de fatores de virulência e genes de resistência disseminarem-se entre diferentes espécies do gênero *Klebsiella*.

Realizamos a pesquisa de genes de resistência adquiridos que causam resistência aos beta-lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos e outros antimicrobianos associados a *K. pneumoniae*, utilizando as plataformas disponíveis online ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). A análise do resistoma gerada pela plataforma detectou a presença dos seguintes genes no genoma total da cepa 23: genes de resistência aos β -lactâmicos (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{TEM-1B}, *bla*_{OKP-B-3}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{OXA-1}), genes de resistência aos aminoglicosídeos [*aac(3)-IIa*, *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib* e *aac(6')-Ib*], gene de resistência à fluoroquinolona (*qnrB1*), gene de resistência à

sulfonamida (*sul2*) e gene de resistência ao trimetoprim (*dfrA14*), todos com mais de 99% de identidade. Os genes *bla*_{NDM-1}, *bla*_{TEM-1B}, *bla*_{CTX-M-15} e *aac(6')-Ib* já haviam sido detectados por PCR. A análise gerada pela plataforma PlasmidFinder detectou a presença dos grupos de incompatibilidade IncY, IncFII e IncR, sendo apenas o grupo IncY previamente detectado por PCR. Estes resultados revelam maior robustez e poder de resolução do sequenciamento genômico sobre a PCR, que pode apresentar falsos resultados em função de uma série de variáveis, que vão desde as condições de preparo do *mix* de reação até as condições de amplificação no termociclador.

É interessante ressaltar que a análise realizada pelo ResFinder, utilizando o arquivo gerado pelo plasmidSPAdes, não foi capaz de detectar a presença dos genes *bla*_{NDM-1} e *bla*_{OKP-B-3}. Este resultado, associado ao fato de que não foram obtidos transconjugantes da cepa 23, e ainda, o fato de não ter sido possível hibridizar a membrana contendo plasmídeos com a sonda de *bla*_{NDM}, sugerem a possível localização cromossomal deste gene. Os genes *bla*_{TEM-1B}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-M-15} foram detectados utilizando-se os dois arquivos nas análises. Além disso, *bla*_{TEM-1B} e *bla*_{CTX-M-15} foram detectados no mesmo *contig*, sugerindo associação em um mesmo plasmídeo.

Após a montagem do genoma total, *bla*_{NDM-1} foi encontrado em um *contig* pequeno, de apenas 5.462 pb. Ao se inserir o *contig* inteiro no NCBI para realização do blast, foi encontrado o índice de 99,98% de identidade com plasmídeos depositados de *E. coli* (pEc2A) e *Enterobacter hormaechei* (pEh1A); no entanto, sabe-se que é um fragmento muito pequeno e que a maioria das sequências de NDM depositadas correspondem a sequências provenientes de plasmídeos, o que não contribuiu para a resolução desta questão.

Nesse sentido, a fim de se obter mais informações sobre a localização e o contexto genético do gene *bla*_{NDM-1} na cepa 23, o genoma de uma outra cepa, KP64, de *K. pneumoniae* com NDM localizado em seu cromossomo (número de acesso AP018750), isolada da Tailândia e publicada por Sakamoto e colaboradores (2018) (196) foi selecionada. Após a inserção dos dois

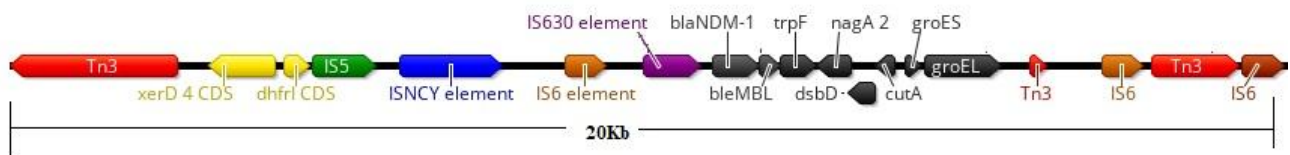


Figura 14: Contexto genético hipotético do gene *bla_{NDM-1}* da cepa 23 isolada a partir de mosca, após montagem por referência utilizando a cepa KP64. A montagem foi realizada utilizando a licença do programa *Geneious Prime* versão 2019.0.4, e a anotação foi realizada manualmente.

genomas (cepas 23 e KP64) no programa *Geneious Prime*, versão 2019.0.4, foi realizada a trimagem da sequência da cepa 23, de acordo com os parâmetros para *Ion Torrent*. Após a seleção da cepa KP64 como referência, foi realizado o comando *map to reference*, e, posteriormente, foi gerada sequência denominada *contigs of the reads mapped*.

Após a montagem por referência, as sequências codantes ou codificantes (*coding sequences-CDS*) geradas foram analisadas e anotadas manualmente, utilizando-se os bancos de dados UniProt e BLASTp e uma região de aproximadamente 20 Kb, onde estava inserido o gene *bla_{NDM-1}*, foi analisada manualmente.

Diferentes elementos genéticos têm sido associados ao gene *bla_{NDM}* e esses podem estar envolvidos em sua disseminação. Exemplos desses elementos são: Tn125, originário de *A. baumannii*, e agora encontrado em enterobactérias (298), ou o elemento IS5, localizado *upstream* a ISAb125 (inteira ou truncada) e também encontrada a 6.064 kb *downstream* do gene *bla_{NDM}*, formando uma estrutura de quase 10Kb (299); ou o elemento IS3000 (família IS3), encontrado a 2.479Kb *upstream* a *bla_{NDM}*, e TnAsn3-like *tnpA* (componente da família IS3), encontrado a 4.757Kb *downstream* a *bla_{NDM}*, formando um elemento de 12.802kb (300).

No plasmídeo pJEG027 de *K. pneumoniae*, foi encontrado o elemento IS5 (transposase) truncando IS*Aba125*, e o elemento IS26 foi detectado a 2.189 kb *downstream* ao gene *bla*_{NDM-4} (301). De acordo com Campos e colaboradores (2015) (248), foi encontrado um novo transposon (Tn3000) conservado entre plasmídeos de diferentes países, inclusive no Brasil. De acordo com os autores, o Tn3000 apresenta 11.823pb, são cercados por duas cópias do IS3000, a primeira delas truncando IS*Aba125*, *upstream* a *bla*_{NDM-1}. Nesta estrutura, a *downstream* do gene *bla*_{NDM-1}, está presente o gene *ble*_{MBL}, seguido pelos genes *trpF* (*phosphoribosylanthranilate isomerase*), *tat* (*twin-arginine translocation pathway signal protein*), *cutA1* (*divalent ion tolerance protein*) e os genes *groEL* e *groES*.

Em relação à cepa 23, foi realizada a análise por meio de PCR, do contexto genético do gene *bla*_{NDM-1} e foi possível constatar a presença da sequência IS*Aba125* inteira a *upstream* de *bla*_{NDM-1} e também a presença do gene *ble*_{MBL} a *downstream*, de acordo com combinações de *primers*, conforme (302). No entanto, só foi possível detectar a presença do gene *ble*_{MBL} após a montagem por referência, de acordo com a figura 14. Já a presença de IS*Aba125* após a montagem não foi detectada. Além disso, por PCR, a sequência do gene correspondente ao IS3000 foi amplificada, revelando a presença deste elemento no genoma da cepa 23. Todavia, este produto não foi sequenciado e, apenas com a sua amplificação, não é possível saber sua localização no genoma da cepa.

A análise do contexto genético de cepas de *E. coli* positivas para *bla*_{NDM-1}, e também isoladas a partir de moscas, porém coletadas em fazendas de animais (241) revelaram maior prevalência de *contigs*, contendo quatro genes *upstream* a *bla*_{NDM-1} (*tnpA*-IS3000-IS*Aba125*- Δ IS5) e um gene *downstream* (Δ IS5). No entanto, os autores não afirmam se os *contigs* estão associados a plasmídeos ou cromossomos (249).

Sakamoto e colaboradores (2018) (196) afirmam que o gene *bla*_{NDM-1} encontrado na cepa de *K. pneumoniae* KP64 (utilizada neste estudo para fazer a montagem por referência) está localizado em uma região de 160 Kb, inserida em seu cromossomo e não em plasmídeo. Após a realização de um gel de l-

Ceul-PFGE e hibridização com sonda para *bla*_{NDM} e para o gene 16S rRNA, os autores verificaram a presença de sinal para esses genes em bandas de mesma altura na membrana, indicando localização cromossomal para o gene de resistência, além de não terem obtido transconjugantes da cepa KP64.

Nesse sentido, por ser provável a localização cromossomal do gene *bla*_{NDM-1} na cepa 23 (deste estudo), a cepa KP64 foi utilizada como referência. De acordo com a Figura 14, é possível perceber a presença de sequências móveis em volta do gene *bla*_{NDM-1}, como Tn3, IS5, IS6 e IS630. De acordo com Sakamoto e colaboradores (2018), o elemento IS5 realizou a transposição do gene de uma plasmídeo para o cromossomo, enquanto Tn3 mediou a recombinação homóloga, a partir de um plasmídeo IncHI1B-like para o cromossomo da cepa KP64.

Conclui-se, portanto, que o gene *bla*_{NDM-1} é potencialmente transferível entre plasmídeos e cromossomos, através de diversos elementos genéticos móveis. Dessa forma, o monitoramento deste gene de resistência, mesmo em cromossomos bacterianos, como é o caso da cepa 23, deve ser considerado epidemiologicamente importante (196). Principalmente, quando detectado em cepas isoladas a partir de moscas, insetos que frequentam ambientes associados ao homem, como: hospitais, mercados, fazendas e lixo (198) (303).

5. CONCLUSÕES

- A partir dos 117 dípteros muscoides coletados nos diferentes pontos, foi possível obter 197 isolados bacterianos; destes, 46 apresentaram não sensibilidade (perfil de resistência ou intermediário) a pelo menos dois antimicrobianos testados. Além disso, dez cepas foram classificadas como multirresistentes (MDR), o que evidencia a capacidade desses insetos de veicular bactérias de importância para saúde pública
- As análises estatísticas revelaram diferença significativa entre o número de isolados não sensíveis do Ponto 5, em relação aos isolados dos demais pontos. Este dado sugere que caçambas de resíduos domésticos próximas ao hospital podem facilitar a disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos.
- A utilização de MALDITOF MS, como técnica de identificação de cepas bacterianas, mostrou-se satisfatória, uma vez que dos 197 isolados obtidos, 175 foram identificados. Entretanto, nenhuma cepa identificada como *Kurthia* sp. por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi identificada pelo MALDITOF-MS.
- Genes de resistência aos antimicrobianos de importância clínica, como *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *aac(6')-Ib-cr*, componentes do Tn4401, seqüências de inserção, assim como gene de integrase de integron de classe 1 foram detectados em cepas isoladas a partir de moscas, evidenciando o alto grau de disseminação desses genes no ambiente extra-hospitalar, o que alerta para o risco potencial destes insetos em locais próximos aos hospitais, onde há intensa pressão de seleção pelo uso de antimicrobianos.
- Não foi encontrada relação genética entre os isolados de *Klebsiella pneumoniae* de origem clínica (urina, sangue, secreção), e isolados pertencentes à mesma espécie isolados a partir de mosca.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Duckett S. Ernest Duchesne and the concept of fungal antibiotic therapy. *Lancet* 1999;11(354):2068–71.
2. Majno G, Joris I. Billroth and Penicillium. *Rev Infect Dis* 1979;5:880–4.
3. Rubin RP. A brief history of great discoveries in pharmacology: in celebration of the centennial anniversary of the founding of the American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics. *Pharmacol Rev* 2007;59(4):289–359.
4. Mohr Kl. History of Antibiotics Research. *Curr Top Microbiol Immunol* 2016;398:237–72.
5. Nolte O. Antimicrobial resistance in the 21st century: a multifaceted challenge. *Protein Pept Lett* 2014;21(4):330–5.
6. Van Hengel AJ, Marin L. Research, Innovation, and Policy: An Alliance Combating Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol* 2019;27(4):287–9.
7. Davies J. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia* 1996;12(1):9–16.
8. Brötz-Oesterhelt H, Brunner NA. How many modes of action should an antibiotic have? *Curr Opin Pharmacol* 2008;8(5):564–73.
9. Kingston W. Streptomycin, Schatz v. Waksman, and the Balance of Credit for Discovery. *J Hist Med Allied Sci* 2004; 59(3): 441-462.
10. Sköld O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat* 2000;3(3):155-160.
11. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:371–87.
12. Turnidge JD. The Pharmacodynamics of β -Lactams. *Clin Infect Dis* 1998;27(1):10–22.
13. Goffin C, Ghuysen JM. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62(4):1079–93.
14. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 2010;23(1):160–201.
15. Reading C, Cole M. Clavulanic acid: a beta-lactamase inhibiting beta lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1977;11(5):852–7.
16. Brown AG. Clavulanic acid, a novel beta-lactamase inhibitor--a case study in drug discovery and development. *Drug Des Deliv* 1986;1(1):1–21.
17. Bush K. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clin Microbiol Rev* 1988;1(1):109–23.
18. Johnson BA, Anker H, Meleney FL. Bacitracin: A New Antibiotic Produced by a Member of the *B. subtilis* Group. *Science* 1945;102(2650):376–7.
19. Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 2016;30(2):523–37.
20. Schatz A, Bugle E, Waksman SA. Streptomycin, a Substance Exhibiting

- Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Clin Orthop Relat Res* 2005;437:3–6.
21. Ehrlich J, Gottlieb D, Burkiolder PR, Anderson LE, Pridham T. *Streptomyces venezuelae*, n. sp., The source of chloromycetin. *J Bacteriol* 1948;56(4):467–77.
 22. Kikuchi H, Sakai T, Teshima R, Nemoto S, Akiyama H. Total determination of chloramphenicol residues in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem* 2017;230:589–93.
 23. Following R, Therapy H. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65(2):232–60.
 24. Collin F, Karkare S, Maxwell A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;92(3):479–97.
 25. Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(1):13–20.
 26. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev* 2008;21(3):449–65.
 27. Mendes CAC, Burdmann EA. Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. *Rev Assoc Med Bras* 2009;55(6):752–9.
 28. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clin Infect Dis* 2005; 1;40(9):1333-41.
 29. Li Z, Cao Y, Yi L, Liu J, Yang Q. Emergent Polymyxin Resistance: End of an Era? *Open Forum Infect Dis* 2019;6(10)- ofz368.
 30. Collignon PC, Conly JM, Andremont A, McEwen SA, Aidara-Kane A, Griffin PM, et al. World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies to Control Antimicrobial Resistance from Food Animal Production. *Clin Infect Dis* 2016;63(8):1087–93.
 31. Rolain JM, Canton R, Cornaglia G. Emergence of antibiotic resistance: Need for a new paradigm. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(7):615–6.
 32. Molton JS, Tambyah PA, Ang BSP, Ling ML, Fisher DA. The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: A perspective from Asia. *Clin Infect Dis* 2013;56(9):1310–18.
 33. Munita JM, Arias CA, Unit AR, Santiago A De. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *HHS Public Access* 2016;4(2):1–37.
 34. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2013.
 35. United States Centers for Disease Control. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. *Current*. 2013;114.
 36. O'Neill J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev Antimicrob Resist* 2016;1–16.
 37. ANVISA. Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde. Agência Nac Vigilância Sanitária - ANVISA 2017;1–81.
 38. Organization GWH. WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation. 2018. 128 p.

39. Sampaio JLM, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Brazilian J Microbiol* 2016;47:31–7.
40. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(3):268–81.
41. Arzanlou M, Chai WC, Venter H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays Biochem* 2017;61(1):49–59.
42. Juhas M. Horizontal gene transfer in human pathogens. *Crit Rev Microbiol* 2015;41(1):101–8.
43. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol* 2013;303(6–7):287–92.
44. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2019;0–99.
45. Liu A, Tran L, Becket E, Lee K, Chinn L, Park E, et al. Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: Generating an antibiotic bar code. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(4):1393–403.
46. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β -Lactamases : A Clinical Update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(4):657–86.
47. Harris PNA, Ferguson JK. Antibiotic therapy for inducible AmpC β -lactamase-producing Gram-negative bacilli: What are the alternatives to carbapenems, quinolones and aminoglycosides? *Int J Antimicrob Agents* 2012;40(4):297–305.
48. Samonis G, Korbila IP, Maraki S, Michailidou I, Vardakas KZ, Kofteridis D, et al. Trends of isolation of intrinsically resistant to colistin Enterobacteriaceae and association with colistin use in a tertiary hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33(9):1505–10.
49. Ramirez SM, Tolmasky EM. Aminoglycoside Modifying Enzymes. *Drug Resist Updat* 2011;13(6):151–71.
50. Diaz Granados CA, Zimmer SM, Mitchel K, Jernigan JA. Comparison of Mortality Associated with Vancomycin-Resistant and Vancomycin-Susceptible Enterococcal Bloodstream Infections: A Meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2005;41(3):327–33.
51. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev* 2004;28(5):519–42.
52. Dcosta VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 2011;477(7):457–61.
53. Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann N Y Acad Sci* 2013;1277(1):84–90.
54. Bush K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *J Infect Chemother* 2013;19(4):549–59.
55. Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 2013;39(1):79–101.
56. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: A last

- frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis* 2011;11(5):381–93.
57. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(3):969–76.
 58. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(6):1211–33.
 59. Pagès JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2008;6(12):893–903.
 60. Hancock REW, Brinkman FSL. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:17–38.
 61. Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, del Carmen Conejo M, Pascual A, Tomás JM, Albertí S, Benedí VJ. Role of *Klebsiella pneumoniae* Ompk35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(10):3332–5.
 62. Doménech-Sánchez A, Hernández-Allés S, Martínez-Martínez L, Benedí VJ, Albertí S. Identification and characterization of a new porin gene of *klebsiella pneumoniae*: Its role in β -lactam antibiotic resistance. *J Bacteriol* 1999;181(9):2726–32.
 63. McMurry L, Petrucci RE, Levy SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci United States* 1980;77(7):3974–7.
 64. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(1):20-51.
 65. Piddock LJV. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin Microbiol* 2006;19(2):382–402.
 66. Visalli MA, Murphy E, Projan SJ, Bradford PA. AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(2):665–9.
 67. Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S, Wootton JC. Inducible erythromycin resistance in *Staphylococci* is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol* 1990;4(7):1207–14.
 68. Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(12):3675–81.
 69. Donhofer A, Franckenberg S, Wickles S, Berninghausen O, Beckmann R, Wilson DN. Structural basis for *TetM*-mediated tetracycline resistance. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109(42):1690–5.
 70. Theuretzbacher U. Global antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens and clinical need. *Curr Opin Microbiol* 2017;39:106–12.
 71. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016;37(11):1288–301.
 72. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT,

- Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis* 2017;17(2):153–63.
73. Satlin MJ, Chen L, Patel G, Gomez-Simmonds A, Weston G, Kim AC et al. Multicenter clinical and molecular epidemiological analysis of bacteremia due to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE) in the CRE epicenter of the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61(4):1–13.
 74. Gandra S, Mojica N, Klein EY, Ashok A, Nerurkar V, Kumari M, et al. Trends in antibiotic resistance among major bacterial pathogens isolated from blood cultures tested at a large private laboratory network in India, 2008–2014. *Int J Infect Dis* 2016;50:75–82.
 75. Sader HS, Castanheira M, Farrell DJ, Flamm RK, Mendes RE, Jones RN. Tigecycline antimicrobial activity tested against clinical bacteria from Latin American medical centres: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2011–2014). *Int J Antimicrob Agents* 2016;48(2):144–50.
 76. Rocha DAC, Campos JC, Passadore LF, Sampaio SCF, Nicodemo AC, Sampaio JLM. Frequency of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Urine Samples in São Paulo, Brazil . *Microb Drug Resist* 2015;22(4):321–7.
 77. Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJU, Chebabo A, Pereira RMG, et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Brazilian J Med Biol Res* 2015;48(2):174–7.
 78. Nicoletti AG, Marcondes MFM, Martins WMBS, Almeida LGP, Nicolás MF, Vasconcelos ATR, et al. Characterization of BKC-1 class a carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(9):5159–64.
 79. Martins WMBS, Cordeiro-Moura JR, Ramos AC, Fehlberg LC, Nicoletti AG, Gales AC. Comparison of phenotypic tests for detecting BKC-1-producing Enterobacteriaceae isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;84(3):246–8.
 80. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla*_{KPC} gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(4):1257–63.
 81. Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, et al. Emergence of *bla*_{KPC-3-Tn4401a} associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2010;65(8):1608–14.
 82. Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, He W, Della-Latta P, et al. Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*_{KPC} carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City Hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(5):1998–2004.
 83. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, et al. Worldwide diversity of *klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase *bla*_{KPC-2} Gene. *Emerg Infect Dis* 2010;16(9):1349–56.
 84. Cheruvanky A, Stoesser N, Sheppard AE, Crook DW, Hoffman PS,

- Weddle E, Carroll J, Sifri CD, Chai W, Barry K, Ramakrishnan G, Mathers AJ. Enhanced *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Expression from a Novel Tn4401 Deletion. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:e00025-17
85. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2018;45:131–9.
 86. D’Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* 2013;303(6–7):305–17.
 87. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Front Microbiol* 2012; 3: 110.
 88. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* 2015;28(3):565–91.
 89. Grégoire N, Aranzana-Climent V, Magréault S, Marchand S, Couet W. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clin Pharmacokinet* 2017;56(12):1441–60.
 90. Yi-Yun Liu, Yang Wang, Timothy R Walsh, Ling-Xian Yi, Rong Zhang, James Spencer, Yohei Doi, Guobao Tian, Baolei Dong XH, Lin-Feng Yu, Danxia Gu, Hongwei Ren, Xiaojie Chen, Luchao Lv, Dandan He, Hongwei Zhou, Zisen Liang, Jian-Hua Liu JS. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2015;16(2):161–8.
 91. Matamoros S, Van Hattem JM, Arcilla MS, Willemse N, Melles DC, Penders J, et al. Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the mcr-1 gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Sci Rep* 2017;7(1):1–10.
 92. Conceição-Neto OC, Aires CAM, Pereira NF, da Silva LHJ, Picão RC, Siqueira BN, et al. Detection of the plasmid-mediated mcr-1 gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2017;50(2):282–4.
 93. Fernandes MR, Sellera FP, Esposito F, Sabino CP, Cerdeira L, Lincopan N. Colistin-Resistant mcr-1-Positive *Escherichia coli* on Public Beaches, an Infectious Threat Emerging in Recreational Waters. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61(7): e00234-17.
 94. Wasfi R, Elkhatib WF, Ashour HM. Molecular typing and virulence analysis of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from Egyptian hospitals. *Sci Rep* 2016;6:1–11.
 95. Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, et al. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature* 2014;509(7501):512–5.
 96. Castillo-Macías A, Flores-Aréchiga A, Llaca-Díaz J, Pérez-Chávez FC-VN. Microbiology of genus *Raoultella*, clinical features and difficulties in its diagnosis. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2019;56(5):486–90.
 97. Demiray T, Koroglu M, Ozbek A, Altindis M. A rare cause of infection, *Raoultella planticola*: emerging threat and new reservoir for carbapenem resistance. *Infection* 2016;44(6):713–7.
 98. Seng P, Boushab BM, Romain F, Gouriet F, Bruder N, Martin C, et al.

- Emerging role of *Raoultella ornithinolytica* in human infections: A series of cases and review of the literature. *Int J Infect Dis* 2016;45:65–71.
99. Ribeiro PCS, Monteiro AS, Marques SG, Monteiro SG, Monteiro-Neto V, Coqueiro MMM, et al. Phenotypic and molecular detection of the *bla*_{KPC} gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. *BMC Infect Dis* 2016;16(1):1–16.
 100. Luo J, Yao X, Lv L, Doi Y, Huang X, Huang S, Liu JH. Emergence of *mcr-1* in *Raoultella ornithinolytica* and *Escherichia coli* Isolates from Retail Vegetables in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:e01139-17.
 101. Wang X, Wang Y, Wang Y, Zhang S, Shen Z, Wang S. Emergence of the colistin resistance gene *mcr-1* and its variant in several uncommon species of Enterobacteriaceae from commercial poultry farm surrounding environments. *Vet Microbiol* 2018;219(2010):161–4.
 102. Hughes VM, Datta N. Conjugative plasmids in bacteria in the ‘pre-antibiotic’ era. *Nature* 1983; 302: 725–726.
 103. Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps-not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 2006;4(8):629-36.
 104. Gniadkowski M. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:11–32.
 105. Forsman M, Häggström B, Lindgren L, Jaurin B. Molecular analysis of β -lactamases from four species of. *J Gen Microbiol* 1990;136:589–98.
 106. Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MOA, Dantas G. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* 2012; 31;337(6098):1107-11.
 107. Shen N, Dominguez-Bello MG, Gao Z, Dantas G, Oh PL, Magris M, et al. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Sci Adv* 2015;1(3):e1500183.
 108. Dantas G, Sommer MOA. Context matters - the complex interplay between resistome genotypes and resistance phenotypes. *Curr Opin Microbiol* 2012;15(5):577–82.
 109. D’Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome. *Science* 2006; 20;311(5759):374-7.
 110. Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A NP. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *QnrA*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(8):3523–5.
 111. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007;59(2):165–74.
 112. Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(2):382–402.
 113. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev* 2007;20(1):79–114.
 114. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2005;56(3):463–9.
 115. Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in

- water environments. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19(3):260–5.
116. Hu Y, Gao GF, Zhu B. The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings. *Front Med* 2017;11(2):161–8.
 117. Hatosy SM, Martiny AC. The Ocean as a Global Reservoir of Antibiotic Resistance Genes. *Appl Environ Microbiol* 2015;81(21):7593–9.
 118. Van Cuong N, Nhung NT, Nghia NH, Mai Hoa NT, Trung NV, Thwaites G, et al. Antimicrobial Consumption in Medicated Feeds in Vietnamese Pig and Poultry Production. *Ecohealth* 2016;13(3):490–8.
 119. Walsh TR, Wu Y. China bans colistin as a feed additive for animals. *Lancet Infect Dis* 2016;16(10):1102–3.
 120. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016;16(2):161–8.
 121. Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Larsen L. Incidence, Distribution, and Spread of Tetracycline Resistance Determinants and Integron-Associated Antibiotic Resistance Genes among Motile Aeromonads from a Fish Farming Environment Article a prendre comme exemple et comportant les amorces pour les in. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(12):5675–82.
 122. Cheng W, Chen H, Su C, Yan S. Abundance and persistence of antibiotic resistance genes in livestock farms: A comprehensive investigation in eastern China. *Environ Int* 2013;61:1–7.
 123. Brisola MC, Crecencio RB, Bitner DS, Frigo A, Rampazzo L, Stefani LM, et al. *Escherichia coli* used as a biomarker of antimicrobial resistance in pig farms of Southern Brazil. *Sci Total Environ* 2019;647:362–8.
 124. Santiago GS, Coelho IS, Bronzato GF, Moreira AB, Gonçalves D, Alencar TA, et al. Extended-spectrum AmpC–producing *Escherichia coli* from milk and feces in dairy farms in Brazil. *J Dairy Sci* 2018;101(9):7808–11.
 125. Norman A, Hansen LH, Sorensen SJ. Conjugative plasmids: Vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2009;364(1527):2275–89.
 126. Sorensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N, Wuertz S. Studying plasmid horizontal transfer in situ: A critical review. *Nat Rev Microbiol* 2005;3(9):700–10.
 127. Barbe V, Vallenet D, Fonknechten N, Kreimeyer A, Oztas S, Labarre L, et al. Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res* 2004;32(19):5766–79.
 128. Gillings MR, Holley MP, Stokes HW. Evidence for dynamic exchange of qac gene cassettes between class 1 integrons and other integrons in freshwater biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 2009;296(2):282–8.
 129. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev* 2013;26(2):185–230.
 130. Pitout JDD, Laupland KB, Church DL, Menard ML, Johnson JR. Virulence Factors of *Escherichia coli* Isolates That Produce. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(11):4667–70.
 131. Peirano G, Schreckenberger PC, Pitout JDD. Characteristics of NDM-1-producing *Escherichia coli* isolates that belong to the successful and

- virulent clone ST131. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(6):2986–8.
132. Su SC, Siu LK, Ma L, Yeh KM, Fung CP, Lin JC, et al. Community-acquired liver abscess caused by serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* with CTX-M-15-type extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(2):804–5.
 133. Yao B, Xiao X, Wang F, Zhou L, Zhang X, Zhang J. Clinical and molecular characteristics of multi-clone carbapenem-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary hospital in Beijing, China. *Int J Infect Dis* 2015;37:107–12.
 134. Gu D, Huang Y, Zhou H, Fang Y, Hu Y, Zhang R. Detection of colistin resistance gene *mcr-1* in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from an infant with diarrhea in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:5099–100.
 135. Ferreira RL, Da Silva BCM, Rezende GS, Nakamura-Silva R, Pitondo-Silva A, Campanini EB, et al. High prevalence of multidrug-resistant *klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a brazilian intensive care unit. *Front Microbiol* 2019; 22;9:3198.
 136. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella Pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence* 2013;4(2):107–18.
 137. Azevedo PAA, Furlan JPR, Gonçalves GB, Gomes CN, Goulart R da S, Stehling EG, et al. Molecular characterisation of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* belonging to CC258 isolated from outpatients with urinary tract infection in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist* 2019;18:74–9.
 138. Goff ML. Estimation of Postmortem Interval Using Arthropod Development and Successional Patterns. *Forensic Sci Rev* 1993;5(2):81-94.
 139. Blazar J, Allard M, Lienau EK. Insects as vectors of foodborne pathogenic bacteria. *Terr Arthropod Rev* 2011;4(1):5–16.
 140. Gupta AK, Rastogi G, Nayduch D, Sawant SS, Bhonde RR, Shouche YS. Molecular phylogenetic profiling of gut-associated bacteria in larvae and adults of flesh flies. *Med Vet Entomol* 2014;28(4):345–54.
 141. Braack LE, De Vos V. Feeding habits and flight range of blow-flies (*Chrysomya* spp.) in relation to anthrax transmission in the Kruger National Park, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 1990;57(2):141–2.
 142. Nazni WA, Luke H, Wan Rozita WM, Abdullah AG, Sa'diyah I, Azahari AH, et al. Determination of the flight range and dispersal of the house fly, *Musca domestica* (L.) using mark release recapture technique. *Trop Biomed* 2005;22(1):53–61.
 143. Kappel HB, Oliveira AG, da Silva PR, Pelli A. Non-biting flying insects as carriers of pathogenic bacteria in a Brazilian hospital. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013;46(2):234–6.
 144. Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110(9):3435–40.
 145. Literak I, Dolejska M, Rybarikova J, Cizek A, Strejckova P, Vyskocilova M, et al. Highly Variable Patterns of Antimicrobial Resistance in Commensal *Escherichia coli* Isolates from Pigs, Sympatric Rodents, and Flies . *Microb Drug Resist* 2009;15(3):229–37.

146. Blaak H, de Kruijf P, Hamidjaja RA, Van Hoek AHAM, de Roda Husman AM & Schets FM. Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants. *Vet Microbiol* 2014;171(3–4):448–59.
147. Zhang J, Wang J, Chen L, Yassin AK, Kelly P, Butaye P, et al. Housefly (*Musca domestica*) and Blow Fly (*Protophormia terraenovae*) as Vectors of Bacteria Carrying Colistin Resistance Genes. *Appl Env Microbiol* 2018;84(1):e01736-17.
148. Usui M, Iwasa T, Fukuda A, Sato T, Okubo T, Tamura Y. The Role of Flies in Spreading the Extended-Spectrum β -lactamase Gene from Cattle. *Microb Drug Resist* 2013;19(5):415–20.
149. Songe MM, Hang'ombe BM, Knight-Jones TJD, Grace D. Antimicrobial resistant enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. In houseflies infesting fish in food markets in Zambia. *Int J Environ Res Public Health* 2017;14(1).
150. Ranjbar R, Izadi M, Hafshejani TT, Khamesipour F. Molecular detection and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* from house flies (*Musca domestica*) in kitchens, farms, hospitals and slaughterhouses. *J Infect Public Health* 2016;9(4):499–505.
151. Nazari M, Mahrabi T, Hosseini SM, Alikhani MY. Bacterial contamination of adult house flies (*Musca domestica*) and sensitivity of these bacteria to various antibiotics, captured from Hamadan City, Iran. *J Clin Diagnostic Res* 2017;11(4):04–7.
152. Agui N, Kobayashi M, Sasaki T, Saito N, Tamura K, Suzuki K, et al. Houseflies: not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Trop Med Hyg* 2017;61(4):625–9.
153. Doud CW, Zurek L. *Enterococcus faecalis* OG1RF:pMV158 Survives and Proliferates in the House Fly Digestive Tract. *J Med Entomol* 2012;49(1):150–5.
154. Joyner C, Mills MK, Nayduch D. *Pseudomonas aeruginosa* in *Musca domestica* L.: Temporospatial Examination of Bacteria Population Dynamics and House Fly Antimicrobial Responses. *PLoS One* 2013;8(11):e79224.
155. Petridis M, Bagdasarian M, Waldor MK, Walker E. Horizontal Transfer of Shiga Toxin and Antibiotic Resistance Genes Among *Escherichia coli* Strains in House Fly (Diptera: Muscidae) Gut. *J Med Entomol* 2006;43(2):288–95.
156. Akhtar M, Hirt H, Zurek L. Horizontal transfer of the tetracycline resistance gene tetM mediated by pCF10 among *Enterococcus faecalis* in the house fly (*Musca domestica* L.) alimentary canal. *Microb Ecol* 2009;58(3):509–18.
157. American Medical Veterinary Association. One health: A new professional imperative. One Health Initiative Task Force Final Report. 2008. p. 76.
158. Robinson TP, Wertheim HFL, Kakkar M, Kariuki S, Bu D, Price LB. Animal production and antimicrobial resistance in the clinic. *Lancet* 2016;387(10014):e1–3.
159. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 2018;31:e00088-17.
160. Hickman AB, Dyda F. Mechanisms of DNA Transposition. *Mob DNA III*

- 2015;531–53.
161. Hallet B, Sherratt DJ. Transposition and site-specific recombination: Adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. *FEMS Microbiol Rev* 1997;21(2):157–78.
 162. Kamruzzaman M, Patterson JD, Shoma S, Ginn AN, Partridge SR, Iredell JR. Relative strengths of promoters provided by common mobile genetic elements associated with resistance gene expression in Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(8):5088–91.
 163. Vandecraen J, Chandler M, Aertsen A, Van Houdt R. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Crit Rev Microbiol* 2017;43(6):709–30.
 164. Naas T, Cuzon G, Truong HV, Nordmann P. Role of IS*Kpn7* and deletions in *bla*_{KPC} gene expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(9):4753–9.
 165. Gillings MR. Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014;78(2):257–77.
 166. Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K. Genomics of microbial plasmids: Classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front Microbiol* 2015;6:1–16.
 167. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2018;73(5):1121–37.
 168. Sun J, Zeng X, Li XP, Liao XP, Liu YH, Lin J. Plasmid-mediated colistin resistance in animals: Current status and future directions. *Anim Heal Res Rev* 2017;18(2):136–52.
 169. Schröttner P, Gunzer F, Schüppel J, Rudolph WW. Identification of rare bacterial pathogens by 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF MS. *J Vis Exp* 2016;2016(113):1–11.
 170. Woo P, Lau S, Teng JL, Tse H, Yuen K. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:908–34.
 171. Santos IC, Hildenbrand ZL, Schug KA. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst* 2016;141(10):2827–37.
 172. Pasternak J. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. *Einstein (Sao Paulo)* 2012;10(1):118–9.
 173. Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect* 2018;24(4):335–41.
 174. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977;74(12):5463–7.
 175. Barzilay EJ, Schaad N, Magloire R, Mung KS, Boncy J, Dahourou GA, et al. Cholera surveillance during the Haiti epidemic - The first 2 years. *N Engl J Med* 2013;368(7):599–609.
 176. King LA, Nogareda F, Weill FX, Mariani-Kurkdjian P, Loukiadis E, Gault G, et al. Outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 Associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011. *Clin Infect Dis* 2012;54(11):1588–94.
 177. Carvalho CJB de, Mello-Patiu CA de. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev Bras Entomol*

- 2008;52(3):390–406.
178. Pronko MA. Conceitos e Métodos para formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde - Volume 3. 306pp. 2019.
 179. Dolinsky AL. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Services Marketing* 2017 p. 27–39.
 180. Winstanley T, Courvalin P. Expert systems in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2011;24(3):515–56.
 181. Van Der Zwaluw K, De Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, De Neeling AJ, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One* 2015;10(3):1–13.
 182. Zahner V, Lucarotti CJ, McIntosh D. Application of 16S rDNA-DGGE and plate culture to characterization of bacterial communities associated with the sawfly, *Acantholyda erythrocephala* (Hymenoptera, Pamphiliidae). *Curr Microbiol* 2008;57(6):564–9.
 183. Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:490-495.
 184. Poirel L, Walsh T, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70(1):119–23.
 185. Higgins P, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35(3):305.
 186. Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea M, Giacobone E, Amicosante G, et al. Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum - Lactamases in Nosocomial Isolates of Enterobacteriaceae from a Hospital in Northern Italy. *J Clin Microbiol* 2003;41(9):4264-9.
 187. Poirel L, Weldhagen G, Naas T, De Champs C, Dove M, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(9):2598-603.
 188. Warburg G, Hidalgo-Grass C, Partridge S, Tolmasky M, Temper V, Moses A, et al. A carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clone in Jerusalem: sequence type 512 carrying a plasmid encoding *aac(6')-Ib*. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(4):898-901.
 189. Xavier B, Lammens C, Ruhai R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill* 2016;21(27).
 190. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: Clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(8):3365–70.
 191. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol* 2011;19(12):588–95.
 192. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for

- the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* 2006;3(1):59–67.
193. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 2005;43(8):4178–82.
 194. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005;63(3):219–28.
 195. Kadu, C.I. Liu ST. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981;145(3):1365–73.
 196. Sakamoto N, Akeda Y, Sugawara Y, Takeuchi D, Motooka D, Yamamoto N, et al. Genomic Characterization of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* with Chromosomally Carried *bla*_{NDM-1}. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62(12):e01520-18.
 197. Rafael JA. Protocolo e Técnicas de Captura de Díptera. *Monogr Terc Milen* 2002;2:310–304.
 198. Boiocchi F, Davies MP, Hilton AC. An Examination of Flying Insects in Seven Hospitals in the United Kingdom and Carriage of Bacteria by True Flies (Diptera: Calliphoridae, Dolichopodidae, Fanniidae, Muscidae, Phoridae, Psychodidae, Sphaeroceridae). *J Med Entomol* 2019;(X):1–14.
 199. Graczyk TK, Knight R, Gilman RH, Cranfield MR. The role of non-biting flies in the epidemiology of human infectious diseases. *Microbes Infect* 2001;3(3):231–5.
 200. Mariluis JC. Notas sobre moscas metalizadas, su importancia sanitaria y ecología (Diptera: Calliphoridae). *Reo Soco Entomol Argent* 1999;58(1–2):289–94.
 201. Greenberg B. Flies and Disease: II. Biology and Disease Transmission. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, U.S.A.; 1973. 447 p.
 202. Guimarães JH, Prado AP, Buralli GM. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Rev Bras Entomol* 1979;23(4):245–55.
 203. Leandro MJF, D’Almeida JM. Levantamento de Calliphoridae, Fanniidae, Muscidae e Sarcophagidae em um fragmento de mata na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia Série Zool* 2005;95(4):377–81.
 204. Corrêa EC, Koller WW, Barros ATM. Abundância relativa e sazonalidade de espécies de *Chrysomya* no Pantanal Sul Mato-Grossense. *Rev Bras Parasitol Veterinária* 2010;19(2):85–8.
 205. Mariconi FAM, Guimaraes JH, Berti Filho E. A mosca doméstica e algumas outras moscas nocivas. Piracicaba; 1999. 135 p.
 206. Carvalho CJB de (ed.). Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: Taxonomy. 2002.
 207. Teresa S, Santo E, Barbosa LS, Cunha AM. Muscidae, Sarcophagidae, Calliphoridae e Mesembrinellidae (Diptera) da Estação Biológica de Santa Lúcia. *Bol do Mus Biol Mello Leitão* 2014;(33):131–40.
 208. Muñoz DJ, Rodríguez R. Agentes bacterianos y parasitarios en adultos de la mosca común *Musca domestica* recolectadas en el peñón, estado Sucre, Venezuela. *Rev Cient la Fac Ciencias Vet la Univ del Zulia* 2015;25(2):159–66.
 209. Almeida JMD. Calyptrate Diptera (Muscidae and Anthomyidae) of the

- State of Rio de Janeiro. Mems Inst Oswaldo Cruz 1992;89(2):261–4.
210. Garcia VDS, Xerez R de, Lins GA, Camello TCF, Almeida JR de. Análise de funcionalidade de bioindicador ambiental através de isotermas: *Atherigona orientalis* (DIPTERA, MUSCIDAE). Rev Sustinere 2015;3(2):160–77.
 211. Patitucci LD, Mulieri PR, Oliva A, Mariluis JC. Status of the forensically important genus *Ophyra* (Diptera: Muscidae) in Argentina. Rev la Soc Entomológica Argentina 2010;69(1–2):91–9.
 212. Monteiro TT, da Silva EN, Bravo FR. Levantamento Taxonômico e Sazonalidade de Calliphoridae, Muscidae e Fanniidae (Insecta: Diptera) em Feira de Santana, Bahia, Brasil. EntomoBrasilis 2014;7(3):171–7.
 213. Mello-Patiu CA de, Soares WA, Silva KP. Espécies de Sarcophagidae (INSECTA: DIPTERA) registradas no estado do Rio de Janeiro. Arq do Mus Nac 2009;67(3–4):173–88.
 214. Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, Handelsman J. Census of the Bacterial Community of the Gypsy Moth Larval Midgut by Using Culturing and Culture-Independent Methods. Appl Environ Microbiol 2004;70(1):293–300.
 215. Lin XL, Pan QJ, Tian HG, Douglas AE, Liu TX. Bacteria abundance and diversity of different life stages of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), revealed by bacteria culture-dependent and PCR-DGGE methods. Insect Sci 2015;22(3):375–85.
 216. Handelsman J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. Microbiol Mol Biol Rev 2004;68(4):669–85.
 217. Anvisa. Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos Módulo IV. Agência Nac Vigilância Sanitária. 2004;IV:1–66.
 218. Onwugamba FC, Fitzgerald JR, Rochon K, Guardabassi L, Alabi A, Kühne S, et al. The role of ‘filth flies’ in the spread of antimicrobial resistance. Travel Med Infect Dis 2018;22:8–17.
 219. Khamesipour F, Lankarani KB, Honarvar B, Kwenti TE. A systematic review of human pathogens carried by the housefly (*Musca domestica* L.). BMC Public Health 2018;18(1):1–15.
 220. Farag TH, Faruque AS, Wu Y, Das SK, Hossain A, Ahmed S, et al. Housefly Population Density Correlates with Shigellosis among Children in Mirzapur, Bangladesh: A Time Series Analysis. PLoS Negl Trop Dis 2013;7(6).
 221. Alves T dos S, Lara GHB, Maluta RP, Ribeiro MG, Leite D da S. Carrier flies of multidrug-resistant *Escherichia coli* as potential dissemination agent in dairy farm environment. Sci Total Environ 2018;633:1345–51.
 222. Sobur A, Haque ZF, Sabuj AA, Levy S, Rahman AT, El Zowalaty ME, et al. Molecular detection of multidrug and colistin resistant *Escherichia coli* isolated from house flies in various environmental settings. Future Microbiol 2019;14:847–858.
 223. Padoveze MC, Fortaleza CMCB. Healthcare-associated infections: Challenges to public health in Brazil. Rev Saude Publica 2014;48(6):995–1001.
 224. Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde, Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos. Sítio Cirúrgico. 2009;1–19.

225. Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PRP, Medeiros EAS, et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: Analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol* 2011;49(5):1866–71.
226. ANVISA. Critérios Diagnósticos De Infecção Relacionada À Assistência À Saúde. Agência Nac Vigilância Sanitária. 2017;2^o:120.
227. Aranha LF, Correa L, Costa MM de M, Eid RC, Silva CV, Caruso P, et al. Infecções Do Trato Respiratório 2009;23(01):15–22.
228. Bevan E, Jones A, Hawkey P. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:2145–2155.
229. Fukuda A, Usui M, Okubo T, Tagaki C, Sukpanyatham N, Tamura Y. Co-harboring of cephalosporin (bla)/colistin (mcr) resistance genes among Enterobacteriaceae from flies in Thailand. *FEMS Microbiol Lett* 2018;365(16):2–5.
230. Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA, Moura Q, Pérez-Chaparro PJ, Esposito F, Sartori L, Dropa M, Matté MH, Lira DP, Mamizuka EM. 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. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60(10):6415–7.
231. Dalmolin TV, Martins AF, Zavascki AP, de Lima-Morales D, Barth AL. Acquisition of the mcr-1 gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;90(2):132–3.
232. Gillings MR, Gaze WH, Pruden A, Smalla K, Tiedje JM, Zhu YG. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME* 2015;9(6):1269–79.
233. Wu YW, Doak TG, Ye Y. The gain and loss of chromosomal integron systems in the *Treponema* species. *BMC Evol Biol* 2013;13(1).
234. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons: Review article. *FEMS Microbiol Rev* 2009;33(4):757–84.
235. Saenz Y, Brinas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, et al. Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(10):3996–4001.
236. Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2017;15(3):277–97.
237. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012;25(4):682–707.
238. Matthew E. Falagas, Giannoula S. Tansarli, Drosos E. Karageorgopoulos, and Konstantinos Z. Vardakas. Deaths Attributable to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. *Emerg Infect Dis* 2014;20(7):1170–5.
239. Janeiro D, Felipe C, Araujo M De, Silva M, Carneiro T, Ribeiro S, et al. Detection of Carbapenemase Genes in Aquatic Environments in Rio. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60(7):4380–3.

240. Chagas TPG, Seki LM, da Silva DM, Asensi MD. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. *J Hosp Infect* 2011;77(3):281.
241. Picão RC, Cardoso JP, Campana EH, Nicoletti AG, Petrolini FVB, Assis DM, et al. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: Focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;76(1):80–5.
242. Fischer J, San José M, Roschanski N, Schmogger S, Baumann B, Irrgang A, et al. Spread and persistence of VIM-1 Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in three German swine farms in 2011 and 2012. *Vet Microbiol* 2017;200:118–23.
243. ANVISA. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016. ANVISA - Segurança do Paciente e Qual em Serviços Saúde. 2017;16:83.
244. Pereira PS, De araujo CFM, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef APDA, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: Spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother* 2013;68(2):312–6.
245. Naas T, Cuzon G, Villegas M, Lartigue M, Quinn J, Nordmann P. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the beta-Lactamase *bla*_{KPC} Gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(4):1257–63.
246. Da Silva IR, Aires CAM, Conceição-Neto OC, De Oliveira Santos IC, Ferreira Pereira N, Moreno Senna JP, et al. Distribution of Clinical NDM-1-Producing Gram-Negative Bacteria in Brazil. *Microb Drug Resist* 2019;25(3):394–9.
247. Carvalho-Assef APD alincour., Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TPG, Timm LN, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in brazil. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(12):2956–7.
248. Campos J, da Silva M, dos Santos P, Barros E, Pereira M, Seco B, et al. Characterization of Tn3000, a Transposon Responsible for *bla*_{NDM-1} Dissemination among Enterobacteriaceae in Brazil, Nepal, Morocco, and India. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(12):7387–95.
249. Wang Y, Zhang R, Li J, Wu Z, Yin W, Schwarz S, et al. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nat Microbiol* 2017. 6;2:16260.
250. Sękowska A. *Raoultella* spp.—clinical significance, infections and susceptibility to antibiotics. *Folia Microbiol (Praha)* 2017;62(3):221–7.
251. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51(3):925–32.
252. Ponce-Alonso M, Rodríguez-Rojas L, del Campo R, Cantón R, Morosini MI. Comparison of different methods for identification of species of the genus *Raoultella*: Report of 11 cases of *Raoultella* causing bacteraemia and literature review. *Clin Microbiol Infect* 2016;22(3):252–7.
253. Zheng B, Zhang J, Ji J, Fang Y, Shen P, Ying C, et al. Emergence of

- Raoultella ornithinolytica* Coproducing IMP-4 and KPC2 Carbapenemases in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(11):7086–9.
254. Piedra-Carrasco N, Fàbrega A, Calero-Cáceres W, Cornejo-Sánchez T, Brown-Jaque M, Mir-Cros A, et al. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae recovered from a Spanish river ecosystem. *PLoS One* 2017;12(4):1–11.
 255. Zahner V, Lucarotti C, McIntosh D. Application of 16S rDNA-DGGE and Plate Culture to Characterization of Bacterial Communities Associated with the Sawfly, *Acantholyda erythrocephala* (Hymenoptera, Pamphiliidae). *Curr Microbiol* 2008;57:564–9.
 256. Kitchel B, Rasheed JK, Endimiani A, Hujer AM, Anderson KF, Bonomo RA, et al. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(10):4201–7.
 257. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol* 2014;22(12):686–96.
 258. Castanheira M, Deshpande LM, DiPersio JR, Kang J, Weinstein MP, Jones RN. First descriptions of *bla*_{KPC} in *Raoultella* spp. (*R. planticola* and *R. ornithinolytica*): Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol* 2009;47(12):4129–30.
 259. Yao Y, Lazaro-Perona F, Falgenhauer L, Valverde A, Imirzalioglu C, Dominguez L, et al. Insights into a novel *bla*_{KPC-2-encoding} IncP-6 plasmid reveal carbapenem-resistance circulation in several Enterobacteriaceae species from wastewater and a hospital source in Spain. *Front Microbiol* 2017;8:1–7.
 260. Reyes JA, Villavicencio F, Villacís JE, Pavón E, Campoverde N, Espinel M, et al. First report of a clinical isolate of *bla*_{OXA-48}-carbapenemase producing *Raoultella ornithinolytica* in South America. *Rev Argent Microbiol* 2019; 24. pii: S0325-7541(19)30026-4.
 261. Carramaschi I, Castro E, Leite J, Queiroz M, Villas-Boas M, Rangel K, et al. First report of *Raoultella ornithinolytica* carrying *bla*_{KPC-2} isolated from a dipteran muscoid collected in a garbage from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2019;61:e32.
 262. Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo-β-lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol* 2017;17(1):1–12.
 263. Rolain JM, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): Towards a new pandemic? *Clin Microbiol Infect* 2010;16(12):1699–701.
 264. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010;10(9):597–602.
 265. Bonnin RA, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J, et al. Dissemination of New Delhi metallo-β-lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(9):E362–5.
 266. Sahl JW, Del Franco M, Pournaras S, Colman RE, Karah N, Dijkshoorn L, et al. Phylogenetic and genomic diversity in isolates from the globally

- distributed *Acinetobacter baumannii* ST25 lineage. *Sci Rep* 2015;5:1–12.
267. Campana EH, Montezzi LF, Paschoal RP, Picão RC. NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 goes to the beach. *Int J Antimicrob Agents* 2017;49(1):119–21.
268. Sekizuka T, Inamine Y, Segawa T, Kuroda M. Characterization of NDM-5- and CTX-M-55-coproducing em *Escherichia coli* GSH8M-2 isolated from the effluent of a wastewater treatment plant in Tokyo Bay. *Infect Drug Resist* 2019;Volume 12:2243–9.
269. Liu Z, Wang Y, Walsh T, Liu D, Shen Z, Zhang R, et al. Plasmid-Mediated Novel *bla*_{NDM-17} Gene Encoding a Carbapenemase with Enhanced Activity in a Sequence Type 48 *Escherichia coli* Strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2017 24;61(5). pii: e02233-16.
270. Mouftah SF, Pál T, Darwish D, Ghazawi A, Villa L, Carattoli A, et al. Epidemic IncX3 plasmids spreading carbapenemase genes in the United Arab Emirates and worldwide. *Infect Drug Resist* 2019;12:1729–42.
271. Wang Y, Tong MK, Chow KH, Cheng VCC, Tse CWS, Wu AKL, et al. Occurrence of highly conjugative IncX3 epidemic plasmid carrying *bla*_{NDM} in enterobacteriaceae isolates in geographically widespread areas. *Front Microbiol* 2018;9:1–8.
272. Pereira PS, Borghi M, Albano RM, Lopes JCO, Silveira MC, Marques EA, et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Microb Drug Resist* 2015;21(2):234–6.
273. Furlan JPR, Pitondo-Silva A, Stehling EG. Detection of *bla*_{NDM-1} in *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Brazilian soil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018;113(6):6–8.
274. Sugawara Y, Akeda Y, Hagiya H, Sakamoto N, Takeuchi D, Shanmugakani RK, et al. Spreading patterns of NDM-producing Enterobacteriaceae in clinical and environmental settings in Yangon, Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;63(3).
275. Daoud Z, Farah J, Sokhn ES, El Kfoury K, Dahdouh E, Masri K, et al. Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae in Lebanese Hospital Wastewater: Implication in the One Health Concept. *Microb Drug Resist* 2018;24(2):166–74.
276. Wei WJ, Yang HF, Ye Y, Li J Bin. New Delhi metallo- β -lactamase-mediated carbapenem resistance: Origin, diagnosis, treatment and public health concern. *Chin Med J (Engl)* 2015;128(14):1969–76.
277. Dortet L, Nordmann P, Poirel L. Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(4):1693–7.
278. Friedlaender V. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrosen Pneumonie. *Arch Pathol Anat* 1882;87:319–24.
279. DeLeo FR, Chen L, Porcella SF, Martens CA, Kobayashi SD, Porter AR, et al. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(13):4988–93.
280. Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Brisse S. Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and related phylogroups by MALDI-TOF mass spectrometry. *Front Microbiol*. 2018;9(DEC):1–7.

281. Blin C, Passet V, Touchon M, Rocha EPC, Brisse S. Metabolic diversity of the emerging pathogenic lineages of *Klebsiella pneumoniae*. *Environ Microbiol* 2017;19(5):1881–98.
282. Brisse S, Van Duijkeren E. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. *Vet Microbiol* 2005;105(3–4):307–12.
283. Stenkat J, Krautwald-Junghanns ME, Schmitz Ornés A, Eilers A, Schmidt V. Aerobic cloacal and pharyngeal bacterial flora in six species of free-living birds. *J Appl Microbiol* 2014;117(6):1564–71.
284. Brahmi S, Touati A, Dunyach-Remy C, Sotto A, Pantel A, Lavigne JP. High Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Wild Fish from the Mediterranean Sea in Algeria. *Microb Drug Resist* 2018;24(3):290–8.
285. Harada K, Shimizu T, Mukai Y, Kuwajima K, Sato T, Usui M, et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Klebsiella* spp. isolates from companion animals in Japan: Clonal dissemination of multidrug-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol* 2016;7:1–12.
286. Anzai EK, de Souza Júnior JC, Peruchi AR, Fonseca JM, Gimpl EK, Pignatari ACC, et al. First case report of non-human primates (*Alouatta clamitans*) with the hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 strain ST 23: A possible emerging wildlife pathogen. *J Med Primatol* 2017;46(6):337–42.
287. Ludden C, Moradigaravand D, Jamrozy D, Gouliouris T, Blane B, Naydenova P, et al. A One Health Study of the Genetic Relatedness of *Klebsiella pneumoniae* and Their Mobile Elements in the East of England. *Clin Infect Dis* 2019 (7). pii: ciz174.
288. Gurieva T, Dautzenberg MJD, Gniadkowski M, Derde LPG, Bonten MJM, Bootsma MCJ. The transmissibility of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae in intensive care units. *Clin Infect Dis* 2018;66(4):489–93.
289. Gorrie CL, Mirceta M, Wick RR, Judd LM, Wyres KL, Thomson NR, et al. Antimicrobial-resistant *Klebsiella pneumoniae* carriage and infection in specialized geriatric care wards linked to acquisition in the referring hospital. *Clin Infect Dis* 2018;67(2):161–70.
290. Wailan AM, Paterson DL, Kennedy K, Ingram PR, Bursle E, Sidjabat HE. Genomic characteristics of NDM-producing Enterobacteriaceae isolates in Australia and their *bla*_{NDM} genetic contexts. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60(1):136–41.
291. Marquez-Ortiz RA, Haggerty L, Olarte N, Duarte C, Garza-Ramos U, Silva-Sanchez J, et al. Genomic epidemiology of NDM-1-encoding plasmids in latin American clinical isolates reveals insights into the evolution of multidrug resistance. *Genome Biol Evol* 2017;9(6):1725–41.
292. Wailan AM, Sidjabat HE, Yam WK, Alikhan N, Petty NK, Sartor AL, et al. Mechanisms Involved in Acquisition of *bla*_{NDM} Genes by IncA/C₂ and IncFII _{γ} Plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60(7):4082–8.
293. Brisse S, Passet V, Grimont PAD. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., Isolated from human infections, With two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp.

- nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64:3146–52.
294. Fonseca EL, Ramos N da V, Andrade BGN, Morais LLCS, Marin MFA, Vicente ACP. A one-step multiplex PCR to identify *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae* in the clinical routine. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;87(4):315–7.
 295. Long S, Linson S, Ojeda Saavedra M, Cantu C, Davis J, Brettin T, et al. Whole-Genome Sequencing of Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates Reveals Misidentification and Misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. *mSphere* 2017; 2:e00290-17.
 296. Nicolás MF, Ramos PIP, de Carvalho FM, Camargo DRA, Alves C de FM, de Morais GL, et al. Comparative genomic analysis of a clinical isolate of *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, a KP-2 and OKP-B-6 beta-lactamases producer harboring two drug-resistance plasmids from Southeast Brazil. *Front Microbiol* 2018;9: 220.
 297. Ferreira ML, Araújo BF, Cerdeira LT, Toshio C, Ribas RM. Genomic features of a clinical ESBL-producing and colistin-resistant hypermucoviscous *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* from Brazil. *Brazilian J Infect Dis* 2019;3(3):207–9.
 298. Poirel L, Bonnin RA, Boulanger A, Schrenzel J, Kaase M, Nordmann P. Tn125-related acquisition of *bla*_{NDM-like} genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(2):1087–9.
 299. Sun F, Yin Z, Feng J, Qiu Y, Zhang D, Luo W, et al. Production of plasmid-encoding NDM-1 in clinical *Raoultella ornithinolytica* and *Leclercia adecarboxylata* from China. *Front Microbiol* 2015;6:1–8.
 300. Yang Q, Fang L, Fu Y, Du X, Shen Y, Yu Y. Dissemination of NDM-1-producing Enterobacteriaceae mediated by the IncX3-type plasmid. *PLoS One* 2015;10(6):1–9.
 301. Espedido BA, Dimitrijovski B, Van Hal SJ, Jensen SO. The use of whole-genome sequencing for molecular epidemiology and antimicrobial surveillance: Identifying the role of IncX3 plasmids and the spread of *bla*_{NDM-4-like} genes in the Enterobacteriaceae. *J Clin Pathol* 2015;68(10):835–8.
 302. Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. Genetic features of *bla*_{NDM-1-positive} Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(11):5403–7.
 303. Zurek L, Ghosh A. Insects represent a link between food animal farms and the urban environment for antibiotic resistance traits. *Appl Environ Microbiol* 2014;80(12):3562–7.

7. APÊNDICES

Tabela 13: Cepas isoladas por ponto de coleta, identificação (MALDITOF-MS ou sequenciamento do gene 16S rRNA) e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Ponto de coleta	Número Cepa	Identificação	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos*								
			TET	MER	CEF	CAZ	C	GEN	CIP	FOX	TMP-SMX
1	JC1	<i>Acinetobacter pittii</i>	20	26	22	20	12	20	28	10	20
1	JC2	<i>Acinetobacter pittii</i>	20	26	18	20	12	20	28	14	18
1	JC3	<i>Bacillus</i> sp.	20	30	0	14	26	24	28	20	12
1	JC4	<i>Acinetobacter pittii</i>	22	30	20	18	12	20	30	12	18
1	JC5	<i>Bacillus cereus</i>	20	22	0	0	18	20	26	0	0
1	JC6	ND	20	28	22	18	10	20	26	12	14
1	JC7	<i>Enterobacter cloacae</i>	18	30	32	18	24	22	30	16	22
1	JC8	<i>Acinetobacter</i> sp.	20	30	10	22	20	20	28	12	18
1	JC9	<i>Acinetobacter pittii</i>	20	28	18	20	0	18	26	12	16
1	JC10	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	40	40	50	40	30	40	18	30
1	JC11	<i>Acinetobacter pittii</i>	18	28	20	20	10	20	26	12	18
1	JC 13	<i>Staphylococcus sciuri</i>	26	32	26	20	24	28	30	30	22
1	JC 14	<i>Bacillus mojavensis</i>	26	40	22	24	26	22	26	30	20
1	JC 15	<i>Acinetobacter</i> sp.	20	24	18	14	14	16	20	14	18
1	JC 16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	30	30	28	24	20	30	24	20
1	JC 17	<i>Corynebacterium flavescens</i>	30	40	40	30	34	32	40	40	22
1	JC 18	<i>Enterobacter cloacae</i>	20	30	30	30	24	20	30	22	14
1	JC 19	<i>Corynebacterium flavescens</i>	38	40	40	26	32	38	40	40	14
1	JC 20	<i>Pseudomonas fragi</i>	ND	40	40	40	18	40	40	10	0
1	JC 21	<i>Staphylococcus xylosum</i>	20	30	30	26	24	24	40	30	20
1	JC22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	24	24	22	20	16	22	22	16
1	JC 23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18	28	28	26	22	18	28	20	22
1	JC 25	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	30	26	26	22	18	24	20	20
1	JC 26	ND	ND	35	21	32	ND	ND	ND	ND	ND
1	JC 27	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ND	30	30	30	20	18	22	22	20
1	JC 28	<i>Proteus hauseri</i>	20	28	26	28	20	8	40	20	0
1	JO 2	NI	0	40	40	40	0	42	60	0	0
1	JO 3	NI	42	40	40	40	0	40	60	0	0
1	JO 5	<i>Rahnella aquatilis</i>	30	38	32	28	30	30	40	30	26
1	JO 6	<i>Comamonas testosteroni</i>	28	40	28	30	32	12	30	28	20
1	JO 8	NI	20	27	30	26	22	20	28	20	22
1	JO 13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	30	30	26	28	20	30	24	22
1	JO 14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22	30	30	26	20	20	30	24	26

Gênero bacteriano em amarelo: possível identificação de gênero (score entre 1,7-2,0); espécie bacteriana em amarelo: certeza de gênero e possível espécie (score entre 2,0-2,3); espécie bacteriana em verde: identificação confiável (score acima de 2,3), de acordo com análises feitas no MALDITOF-MS./ * halos em milímetros. TET (tetraciclina), MER (meropenem), CEF (cefepime), CAZ (ceftazidima), C (cloranfenicol), GEN (gentamicina), CIP (ciprofloxacina), FOX (cefoxitina), TMP-SXT(trimetoprim-sulfametoxazol)/Halos em milímetros em azul significam sensibilidade, em verde intermediário, em vermelho resistente.

Tabela 13(Cont.): Cepas isoladas por ponto de coleta, identificação (MALDITOF-MS ou sequenciamento do gene 16S rRNA) e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Ponto de coleta	Número Cepa	Identificação	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos*								
			TET	MER	CEF	CAZ	C	GEN	CIP	FOX	TMP-SMX
1	JO 17	<i>Klebsiella sp.</i>	22	28	29	26	30	22	30	26	24
1	JO 19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	28	30	28	0	22	36	0	0
1	JO 20	<i>Escherichia coli</i>	0	30	29	27	0	20	26	24	28
1	JO 21	<i>Proteus sp.</i>	12	28	30	29	24	20	28	24	20
1	JO 29	<i>Staphylococcus sp.</i>	30	36	30	15	28	28	32	30	24
1	JO 30	<i>Alcaligenes faecalis</i>	22	20	21	26	22	28	ND	30	0
1	JO 32	<i>Staphylococcus sp.</i>	30	16	30	22	26	26	30	30	26
1	JO 33	<i>Bacillus cereus</i>	12	15	0	0	20	20	26	14	0
1	JO 34	NI	20	38	30	25	30	40	42	18	30
1	JO 35	<i>Enterobacter sp.</i>	26	32	30	26	20	20	26	0	20
1	JO 36	<i>Enterobacter kobei</i>	40	40	30	30	46	40	60	30	30
1	JO 37	<i>Klebsiella oxytoca</i>	18	32	36	30	30	18	32	28	24
1	JO 38	<i>Micrococcus luteus</i>	20	36	28	16	30	30	40	14	18
1	JO 46	<i>Klebsiella variicola</i>	22	30	31	28	20	18	26	22	20
1	JO 47	<i>Enterobacter cloacae</i>	20	28	22	26	20	20	30	10	22
1	JO 48	<i>Pantoea dispersa</i>	30	26	29	22	24	28	40	26	26
1	JO 49	<i>Pantoea dispersa</i>	24	34	32	26	30	20	40	22	24
1	JO 51	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22	34	30	26	24	20	30	22	22
1	JO 52	NI	22	30	27	24	30	24	30	18	20
1	JO 53	<i>Serratia sp.</i>	12	34	34	34	26	22	42	22	20
1	JO 54	<i>Acinetobacter sp.</i>	12	26	28	20	22	20	40	22	18
1	JO 55	<i>Acinetobacter sp.</i>	12	30	22	20	20	20	30	14	18
1	JO 56	<i>Staphylococcus sciuri</i>	12	30	26	20	22	20	24	24	22
1	JO 57	<i>Acinetobacter sp.</i>	12	26	18	18	20	20	22	10	20
1	JO 58	<i>Pseudomonas sp.</i>	12	32	24	24	14	18	24	20	0
1	JO 60	<i>Proteus sp.</i>	12	30	32	32	20	20	30	22	16
2	JC 39	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ND	20	23	12	0	42	22	0	0
2	JC 40	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ND	30	40	0	0	36	40	0	0
2	JC 41	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ND	30	40	40	0	40	40	0	0
2	JC 42	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ND	32	20	24	0	30	40	0	0
2	JC 44	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	38	20	25	0	0	38	40	0	0
2	JC 45	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	40	40	16	24	34	30	32	0	28
2	JC 46	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30	22	23	22	0	34	40	40	0

Tabela 13(Cont.): Cepas isoladas por ponto de coleta, identificação (MALDITOF-MS ou sequenciamento do gene 16S rRNA) e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Ponto de coleta	Número Cepa	Identificação	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos*								
			TET	MER	CEF	CAZ	C	GEN	CIP	FOX	TMP-SMX
2	JC 47	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30	30	30	30	0	38	40	0	0
2	JC 48	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	38	20	25	10	0	38	40	0	0
2	JC 49	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	40	18	23	12	0	36	40	0	0
2	JC 50	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	40	22	25	34	38	40	40	0	0
2	JO 114	<i>Pseudomonas sp.</i>	50	28	28	24	36	0	60	0	0
2	JO 115	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	20	5	26	30	0	0	40	0	0
2	JO 116	<i>Staphylococcus sp.</i>	24	25	32	21	26	20	24	26	20
2	JO 118	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30	20	26	24	10	30	50	0	0
2	JO 152	<i>Pseudomonas sp.</i>	22	34	34	26	30	30	26	0	0
2	JO 153	<i>Microbacterium sp.</i>	20	26	14	0	12	12	20	0	26
2	JO 155	NI	nd	30	26	32	20	12	20	0	30
2	JO 156	<i>Corynebacterium stationis</i>	30	50	44	24	30	32	36	32	24
2	JO 158	NI	28	40	32	12	20	28	28	28	22
2	JO 159	<i>Enterococcus faecium</i>	ND	22	15	0	ND	ND	ND	ND	ND
2	JO 160	<i>Staphylococcus sp.</i>	34	38	28	12	30	28	30	30	30
2	JO 161	<i>Pseudomonas sp.</i>	32	36	34	26	30	40	50	0	0
3	JC 29	<i>Chryseobacterium sp.</i>	0	12	40	30	30	20	ND	26	34
3	JC 30	ND	12	20	6	18	18	12	26	0	22
3	JC 31	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	26	30	20	22	20	24	22	20
3	JC 32	<i>Lysinibacillus sp.</i>	ND	28	16	12	22	20	ND	20	30
3	JC 33	<i>Pseudomonas sp.</i>	ND	42	34	34	22	22	ND	24	22
3	JC 34	<i>Rummeliibacillus sp.</i>	ND	32	15	10	26	22	22	26	26
3	JC 35	NI	ND	26	15	12	24	26	26	24	30
3	JC 36	NI	ND	26	12	12	28	24	26	28	26
3	JC 37	<i>Rummeliibacillus sp.</i>	ND	28	12	12	26	26	16	26	28
3	JC 38	<i>Rummeliibacillus sp.</i>	ND	24	12	12	26	22	40	24	24
3	JO 61	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	12	40	40	40	20	20	30	24	18
3	JO 62	<i>Pseudomonas lundensis</i>	30	38	32	34	0	40	40	0	0
3	JO 63	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	38	40	40	40	0	40	50	0	0
3	JO 64	<i>Pseudomonas sp.</i>	30	36	34	30	20	40	30	0	0
3	JO 65	<i>Pseudomonas sp.</i>	38	40	36	34	22	42	5	0	0

Tabela 13(Cont.): Cepas isoladas por ponto de coleta, identificação (MALDITOF-MS ou sequenciamento do gene 16S rRNA) e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Ponto de coleta	Número Cepa	Identificação	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos*								
			TET	MER	CEF	CAZ	C	GEN	CIP	FOX	TMP-SMX
3	JO 66	<i>Pseudomonas sp.</i>	24	38	36	32	22	30	30	0	0
3	JO 67	NI	38	40	34	32	0	40	60	0	0
3	JO 68	<i>Pseudomonas sp.</i>	40	40	30	28	14	40	40	0	0
3	JO 69	<i>Pantoea sp.</i>	36	40	40	40	30	26	40	14	40
4	1	NI	28	21	15	0	30	31	29	34	36
4	2	<i>Enterobacter cloacae</i>	32	31	21	26	22	22	34	0	30
4	4	NI	36	25	15	13	30	36	ND	34	42
4	5	<i>Kurthia sp. (16S rRNA)</i>	30	27	13	18	30	30	30	32	32
4	8	<i>Pseudomonas taetrolens</i>	20	40	30	28	0	34	36	0	0
4	11	<i>Staphylococcus xylosum</i>	30	ND	ND	13	28	30	29	ND	ND
4	14	<i>Escherichia coli</i>	0	24	21	25	28	24	0	26	0
4	15	<i>Kurthia sp. (16S rRNA)</i>	26	20	15	0	30	36	31	32	42
4	16	NI	20	36	38	34	30	38	30	30	0
4	31	<i>Bacillus cereus</i>	22	20	0	0	30	26	30	0	20
4	32	<i>Bacillus sp. (16S rRNA)</i>	22	40	25	22	30	30	44	32	34
4	33	<i>Bacillus cereus</i>	28	15	0	0	30	30	26	0	26
4	35	<i>Proteus mirabilis</i>	0	30	28	24	26	25	40	32	40
4	36	ND	ND	30	30	32	30	26	40	30	34
4	39	<i>Pseudomonas lundensis</i>	30	34	35	28	26	26	22	20	24
4	40	<i>Bacillus cereus / anthracis</i>	30	31	0	0	27	36	40	36	22
4	41	<i>Staphylococcus sciuri</i>	ND	28	28	30	26	20	24	24	26
4	42	<i>Pseudomonas sp.</i>	12	ND	ND	ND	14	ND	22	0	0
4	43	<i>Bacillus megaterium/ coagulans</i>	10	29	13	23	23	16	0	0	16
4	45	<i>Bacillus cereus</i>	26	30	0	0	20	50	28	12	12
4	46	<i>Bacillus cereus</i>	40	30	0	0	20	16	28	14	12
4	47	<i>Bacillus cereus</i>	26	22	26	0	ND	28	26	12	14
4	50	<i>Pseudomonas fragi</i>	10	20	12	14	10	10	20	0	ND
4	51	<i>Staphylococcus sp.</i>	ND	ND	0	0	ND	24	32	ND	ND
4	83	<i>Bacillus cereus</i>	30	40	30	22	12	ND	20	30	ND
4	84	<i>Microbacterium sp.</i>	40	25	9	0	0	ND	ND	ND	ND
4	85	<i>Staphylococcus sp. (16s rRNA)</i>	32	25	18	11	ND	ND	ND	ND	ND
4	86	<i>Pseudomonas lundensis</i>	22	28	24	22	26	12	28	0	22
4	88	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabela 13(Cont.): Cepas isoladas por ponto de coleta, identificação (MALDITOF-MS ou sequenciamento do gene 16S rRNA) e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Ponto de coleta	Número Cepa	Identificação	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos*								
			TET	MER	CEF	CAZ	C	GEN	CIP	FOX	TMP-SMX
4	92	<i>Bacillus cereus</i>	25	28	0	0	20	22	ND	20	14
4	94	<i>Enterococcus faecalis</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	98	<i>Escherichia coli</i>	16	20	16	22	26	18	24	20	28
4	99	<i>Enterococcus faecalis</i>	26	28	32	27	ND	ND	ND	ND	ND
4	100	<i>Kurthia</i> sp. (16S rRNA)	8	24	13	10	40	40	28	34	34
4	101	ND	0	34	40	30	ND	ND	ND	ND	ND
4	103	<i>Kurthia gibsonii</i> (16S rRNA)	10	24	13	10	30	40	44	36	32
4	104	<i>Escherichia coli</i>	30	31	16	16	16	18	0	18	26
4	105	<i>Escherichia coli</i>	18	20	14	22	24	16	16	20	20
4	106	<i>Escherichia coli</i>	0	25	19	10	ND	42	ND	32	40
4	107	<i>Pseudomonas lundensis</i>	8	19	13	9	30	30	20	30	32
4	108	<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	109	<i>Enterococcus faecalis</i>	10	18	12	0	20	8	18	0	0
4	110	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	111	<i>Providencia rettgeri</i>	0	28	32	28	29	20	23	28	19
4	112	<i>Morganella morgannii</i>	10	24	30	26	18	20	27	13	22
4	113	<i>Enterococcus faecalis</i>	20	18	28	11	17	8	18	0	28
4	120	<i>Acinetobacter</i> spp.	21	30	20	20	10	20	25	0	32
4	125	<i>Lactococcus</i> spp.	8	24	0	0	0	0	32	0	22
4	136	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	30	30	23	27	23	20	26	28
4	142	<i>Hafnia alvei</i>	17	32	33	22	21	22	28	23	23
4	146	<i>Serratia marcescens</i>	11	36	36	32	21	21	22	16	24
5	17	<i>Kluyvera ascorbata</i>	30	32	12	18	30	0	44	26	28
5	18A	<i>Staphylococcus succinus</i>	0	40	40	18	22	36	32	40	14
5	18B	<i>Myroides odoratimimus</i>	18	24	20	14	26	0	20	10	32
5	23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	16	14	0	28	10	18	0	0
5	24	<i>Kocuria rhizophila</i>	36	20	15	16	50	28	ND	30	34
5	25	<i>Escherichia coli</i>	10	22	21	24	27	22	24	22	0
5	26	<i>Escherichia coli</i>	10	16	16	0	30	0	30	0	0
5	28 A	<i>Kurthia</i> sp. (16S rRNA)	18	20	ND	18	20	20	26	26	38
5	28B	<i>Staphylococcus sciuri</i>	ND	30	20	14	30	20	24	20	26
5	29	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ND	32	25	12	30	35	30	44	32

5	30	<i>Bacillus cereus</i>	20	23	0	0	24	18	26	18	10
---	----	------------------------	----	----	---	---	----	----	----	----	----

Tabela 13(Continuação): Cepas isoladas durante o estudo por ponto de coleta, identificação (MALDITOF-MS ou sequenciamento do gene 16S rRNA), perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Ponto de coleta	Número Cepa	Identificação	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos*								
			TET	MER	CEF	CAZ	C	GEN	CIP	FOX	TMP-SMX
5	52	<i>Escherichia coli</i>	16	31	29	30	30	30	33	30	36
5	53	<i>Enterobacter cloacae</i>	10	18	10	0	20	7	18	0	25
5	54	<i>Escherichia coli</i>	20	30	36	30	26	20	30	0	28
5	55	<i>Escherichia coli</i>	0	30	36	30	22	22	32	24	22
5	62	<i>Enterococcus faecalis</i>	26	18	32	32	ND	14	40	0	26
5	63	<i>Enterococcus faecalis</i>	22	32	12	26	20	0	14	0	20
5	64	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	20	0	0	0	0	0	0	0
5	65	<i>Candida parapsilosis</i>	ND	6	0	0	0	6	20	0	0
5	67	<i>Pseudomonas lundensis</i>	36	24	0	ND	30	22	28	20	30
5	68	<i>Bacillus cereus</i>	ND	20	0	0	20	16	32	9	22
5	69	<i>Enterococcus sp.</i>	0	20	16	14	22	10	20	12	ND
5	70	<i>Enterobacter cloacae</i>	12	30	28	25	26	22	27	8	0
5	71	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	10	26	10	12	18	0	20	20	0
5	72	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	73	ND	ND	34	38	38	ND	30	50	ND	ND
5	76	<i>Pseudomonas fragi</i>	12	30	28	28	ND	10	20	0	30
5	77	<i>Enterococcus faecalis</i>	ND	29	14	10	20	14	14	0	22
5	78	<i>Pseudomonas lundensis</i>	10	38	28	16	16	30	ND	0	0
5	79	<i>Enterococcus faecalis</i>	ND	28	38	34	ND	ND	28	ND	ND
5	114	<i>Providencia alcalifaciens</i>	0	35	30	30	28	25	35	16	23
5	115	<i>Pseudomonas fragi</i>	ND	35	30	30	15	30	22	0	20
5	116	<i>Serratia marcescens</i>	9	23	27	24	21	18	23	16	24
5	117	<i>Pseudomonas putida</i>	ND	25	27	25	15	20	17	0	0
5	118	<i>Lactococcus lactis</i>	20	24	22	22	20	22	22	20	18
5	119	<i>Serratia marcescens</i>	15	23	18	18	22	13	22	14	20
5	132	<i>Hafnia alvei</i>	10	30	35	25	20	20	27	25	22
5	134	<i>Serratia marcescens</i>	10	18	21	18	20	15	21	15	22
5	135	<i>Serratia marcescens</i>	10	30	29	25	22	23	21	17	27
5	137	<i>Serratia marcescens</i>	15	35	30	30	17	22	22	13	23
5	138	<i>Pseudomonas spp.</i>	ND	22	20	10	17	0	24	18	15
5	139	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ND	0	16	17	21	0	ND	0	30
5	140	<i>Enterococcus faecalis</i>	22	13	36	0	12	10	25	30	26

5	141	<i>Enterococcus faecalis</i>	22	17	32	0	13	12	20	28	27
---	-----	------------------------------	----	----	----	---	----	----	----	----	----

First report of *Raoultella ornithinolytica* carrying *bla*KPC-2 isolated from a dipteran muscoid collected in a garbage from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil

Rio de Janeiro, January 23rd, 2019

Dear Editor

Raoultella is a Gram-negative bacterium frequently isolated from natural environments and has emerged as an important pathogen in recent years¹. Although this species has been described as susceptible to antibiotics, there are numerous reports of strains presenting a variety of resistance mechanisms, such as ESBL (Extended -spectrum beta- lactamases) and carbapenemases, including *bla*_{OXA-48} from bloodstream infections isolates², the coexistence of *bla*_{KPC-2} and *bla*_{IMP-4}³, reported in strains recovered from sediment together with some producers of VIM-1⁴. Importantly, *bla*_{NDM} positive strains were isolated from clinical specimens⁵ highlighting the dissemination of resistance genes from clinical to environmental members of the Enterobacteriaceae family. Flies show the capacity to transfer pathogens and their associated genes between different environments, acting as one of the most important vectors of human diseases worldwide⁶.

The purpose of this study was to evaluate the possible role of flies in the dissemination of nosocomial, antibiotic resistant bacteria. Flies were captured within the garbage of a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil, and were screened for the presence of mobile resistance determinants against colistin, carbapenems, cephalosporins, aminoglycosides and mobile genetic elements, including integrons and the transposon Tn4401. Samples of flies were collected in July 2016 and August 2017. Captures were carried out inside the dumpsters located in the dependencies of the public hospital in Rio de Janeiro, and from other dumpsters at a distance of approximately 100 meters from the hospital. Traps made of plastic bottles were placed at each location and left for 20 h. Trapped flies were taken to the laboratory and identified using dichotomous keys⁷.

The flies were individually washed in sterile saline and homogenized with a sterile pestle in 1 mL of saline and vortexed. Aliquots of the diluted homogenates (100 µL) were streaked onto nutrient agar plates supplemented with ceftriaxone (1 mg/L) and incubated at 37 °C overnight. Representative colony types were subcultured on plates of nutrient agar and examined for resistance via the disk-diffusion method⁸ towards the antibiotics cefepime (30 µg), ceftazidime (30 µg), meropenem (10 µg), gentamicin (10µg), tetracycline (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25 + 23.75 µg) and chloramphenicol (30 µg) (Sensifar). Polymerase Chain Reaction (PCR) assays to detect resistance to β-lactams and aminoglycosides were conducted according to the protocol described by Poirel et al.⁹. Plasmid characterization was performed using the PCR-based replicon typing method¹⁰, with plasmids extracted using an alkaline lysis method¹¹. Subsequently, gel contents were transferred to nylon membranes, and hybridized with digoxigenin 11-dUTP (Roche) probes¹².

Raoultella ornithinolytica (LEMEF 71) was isolated from a specimen of the *Malacophagomia filamenta* fly. This bacterium was identified by the sequencing of approximately 240 nucleotides belonging to the V5 region of the gene 16S rRNA gene¹³ in combination with MALDITOF MS (Bruker LT Microflex). The isolate LEMEF 71 was phenotypically resistant to tetracycline, cefepime, ceftazidime,

¹Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Entomologia Médica e Forense, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Hospital Municipal da Piedade, Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

³Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Laboratório de Saneantes, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence to: Viviane Zahner
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Entomologia Médica e Forense, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, CEP 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Tel: +55 21 2562-1846

E-mail: vzahner@ioc.fiocruz.br

Received: 25 January 2019

Accepted: 18 March 2019

gentamicin and trimethoprim/sulfamethoxazole and was positive by the Carbapenem Inactivation Method (CIM test), presenting a clear carbapenemase activity¹⁴. PCR-based screening revealed the presence of the *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *aac(6')-Ib* resistance genes and identified the presence of a plasmid belonging to the *IncK* incompatibility group. The identity of the KPC-2 amplicon was confirmed by its nucleotide sequencing. In addition, the isolate was positive for *ISKpn6*, which belongs to the IS1182 family, and also for *ISKpn7*, a member of the IS21 family, generating a *TnpA* target amplicon. Those sequences are components of the transposon *Tn4401*, which is implicated as the origin of *bla*_{KPC-like} gene acquisition and is believed to be responsible for its dissemination¹⁵.

Southern hybridization assays revealed weak signals with bands considered to represent plasmid DNA, suggesting that the *bla*_{KPC} gene was present, but the number of copies of the plasmide was low (Figure 1). Attempts to transfer the plasmid by *in vitro* conjugation were unsuccessful, suggesting that the plasmid is most

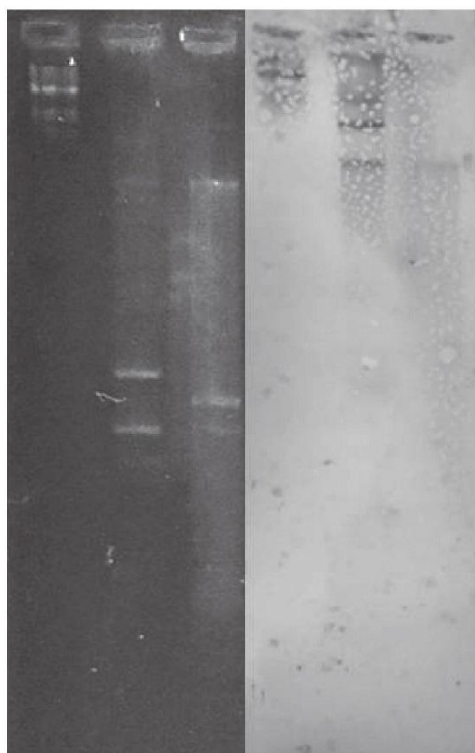


Figure 1 - A) Plasmid extractions from cultures of *Klebsiella pneumoniae* isolates and *Raoultella ornithinolytica* isolate that produce β -lactamase *bla*_{KPC-2} gene; B) Southern hybridization of a transferred plasmid extraction, conducted with an internal probe for *bla*_{KPC-2}. Lane 1, DNA molecular-weight marker III digoxigenin- labeled; Lane 2, *Klebsiella pneumoniae* (positive control); Lane 3 *Raoultella ornithinolytica* (LEMEF 71).

likely of non-conjugative type. Previous studies of clinical isolates of *Raoultella* spp. showed that *bla*_{KPC} was carried on by an 11-kb plasmid located within a *Tn4401* integration structure¹⁶. In addition, a wastewater strain has been documented and contained a novel *IncP-6* promiscuous plasmid containing a *Tn3* transposon composed of *ISKpn6/bla*_{KPC-2}/*bla*_{TEM-1}/*ISKpn27*¹⁷. More recently, the emergence of *mcr-1*, encoding resistance to colistin, within an *IncI2* plasmid of *R. planticola* isolated from flies, has been reported in China¹⁸.

Due to their reproductive and trophic link to microbe-rich substrates, flies have long been implicated as reservoirs and potential vectors of resistant bacteria¹⁹. It is not possible to definitively determine whether the isolate LEMEF 7 was originated from within the hospital or if it was resident in the extended environment. However, it should be noted that previous studies have demonstrated that samples collected from a range of hospital environments contained carbapenemase-producing organisms, including non-pathogenic ones that may serve as resilient reservoirs of resistance genes and plasmids²⁰.

In conclusion, the findings presented in this study, to the best of our knowledge, represent the first detection of KPC-2 producing *R. ornithinolytica* isolated from flies. This study reinforces the hypothesis that this resistance mechanism is rapidly disseminating in environmental isolates of Enterobacteriaceae. Moreover, insects are numerous and diverse in many environments, therefore our finding suggests their potential role in the dissemination of antibiotic resistance. Our study is of great concern due to its epidemic potential, since the emergence of KPC represents a severe threat to human health around the globe.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

INC: flies collection, bacterial isolation, molecular methods, data interpretation, article writing. EARC, MMCQ, MHSVB, KRC: design, data interpretation. JAL: phenotypic methods. VZ: design, data interpretation, article writing, approval of the review to be published and laboratory supervision.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledged Dr. Douglas McIntosh for the 16s rRNA gene sequencing.

FUNDING

This study was supported in part by grants from Centro Integrado Empresa Escola, *Coordenação de*

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Finance Code 001) and by POM (Plano de Objetivos e Metas/ Fiocruz).

Isabel Nogueira Carramaschi¹
 Eduardo Almeida Ribeiro de Castro²
 Jéssica Albuquerque Leite¹
 Margareth Maria de Carvalho Queiroz¹
 Maria Helena Simões Villas Boas³
 Karyne Rangel³
 Viviane Zahner¹

REFERENCES

1. Sekowska A. *Raoultella* spp. : clinical significance, infections and susceptibility to antibiotics. *Folia Microbiol (Praha)*. 2017;62:221-7.
2. Demiray T, Koroglu M, Ozbek A, Altindis M. A rare cause of infection, *Raoultella planticola*: emerging threat and new reservoir for carbapenem resistance. *Infection*. 2016;44:713-7.
3. Zheng B, Zhang J, Ji J, Fang Y, Shen P, Ying C, et al. Emergence of *Raoultella ornithinolytica* coproducing IMP-4 and KPC-2 carbapenemases in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:7086-9.
4. Piedra-Carrasco N, Fàbrega A, Calero-Cáceres W, Cornejo-Sanchez T, Brown-Jaque M, Mir-Cros A, et al. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae recovered from a Spanish river ecosystem. *PLoS One*. 2017;12:e0175246.
5. Yoon EJ, Kang DY, Yang JW, Kim D, Lee H, Lee KJ, et al. New Delhi Metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in South Korea between 2010 and 2015. *Front Microbiol*. 2018;9:571.
6. Gupta AK, Rastogi G, Nayduch D, Sawant SS, Bhone RR, Shouche YS. Molecular phylogenetic profiling of gut-associated bacteria in larvae and adults of flesh flies. *Med Vet Entomol*. 2014;28:345-54.
7. Mello RP. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomol Vect*. 2003;10:255-68.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100: performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. Wayne: CLSI; 2017.
9. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70:119-23.
10. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*. 2005;63:219-28.
11. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol*. 1981;145:1365-73.
12. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
13. Zahner V, Lucarotti CJ, McIntosh D. Application of 16S rDNA-DGGE and plate culture to characterization of bacterial communities associated with the sawfly, *Acantholyda erythrocephala* (Hymenoptera, Pamphiliidae). *Curr Microbiol*. 2008;57:564-9.
14. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One*. 2015;10:e0123690.
15. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase blaKPC gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1257-63.
16. Castanheira M, Deshpande LM, DiPersio JR, Kang J, Weinstein MP, Jones RN. First descriptions of blaKPC in *Raoultella* spp. (*R. planticola* and *R. ornithinolytica*): report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Clin Microbiol*. 2009;47:4129-30.
17. Yao Y, Lazaro-Perona F, Falgenhauer L, Valverde A, Imirzalioglu C, Dominguez L, et al. Insights into a novel blaKPC-2-encoding IncP-6 plasmid reveal carbapenem-resistance circulation in several Enterobacteriaceae species from wastewater and a hospital source in Spain. *Front Microbiol*. 2017;8:1143.
18. Wang Y, Zhang R, Li J, Wu Z, Yin W, Schwarz S, et al. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nat Microbiol*. 2017;2:16260.
19. Nayduch D, Zurek K, Thomson JL, Yeater KM. Effects of bacterial dose and fly sex on persistence and excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from adult house flies (*Musca domestica* L.; Diptera: Muscidae). *J Med Entomol*. 2018;55:1264-70.
20. Weingarten RA, Johnson RC, Conlan S, Ramsburg AM, Dekker JP, Lau AF, et al. Genomic analysis of hospital plumbing reveals diverse reservoir of bacterial plasmids conferring Carbapenem resistance. *MBio*. 2018;9:e02011-7.