

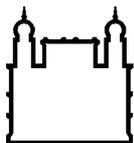
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

**Levantamento de Bactérias Resistentes a Antibióticos Isoladas a partir  
de Moscas Coletadas em Jacarepaguá, Rio de Janeiro**

DAISLANY ANDREIA DA SILVA ALVES

Rio de Janeiro  
Novembro de 2021



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

***DAISLANY ANDREIA DA SILVA ALVES***

LEVANTAMENTO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS ISOLADAS A PARTIR DE MOSCAS COLETADAS EM JACAREPAGUÁ, RIO DE JANEIRO

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre Biodiversidade e Saúde

**Orientador (es):** Prof. Dr(a). Viviane Zahner  
Prof. Dr. Thiago Pavoni Gomes Chagas

**RIO DE JANEIRO**  
Novembro de 2022

Alves, Daislany Andreia da Silva.

Levantamento de bactérias resistentes a antibióticos isoladas a partir de moscas coletadas em Jacarepaguá, Rio de Janeiro / Daislany Andreia da Silva Alves. - Rio de Janeiro, 2021. 115 f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2021.

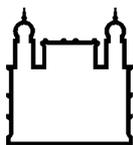
Orientadora: Viviane Zahner.

Co-orientador: Thiago Pavoni Gomes Chagas.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Dípteros muscoides. 2. Resistência bacteriana. 3.

Genes de resistência. 4. One Health. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

***AUTOR: DAISLANY ANDREIA DA SILVA ALVES***

### **LEVANTAMENTO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS ISOLADAS A PARTIR DE MOSCAS COLETADAS EM JACAREPAGUÁ, RIO DE JANEIRO**

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

**Prof. Dr. Thiago Pavoni Gomes Chagas**

**Aprovada em: 30/11/2021**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dra.** Margareth Maria de Carvalho Queiroz - **Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz - RJ)

**Prof. Dra.** Cláudia Rezende Vieira de Mendonça Souza (Faculdade de Medicina - UFF/RJ)

**Prof. Dra.** Karyne Rangel (Instituto Oswaldo Cruz - RJ)

**Prof. Dra.** Teca Calcagno Galvão (Instituto Oswaldo Cruz - RJ)

**Prof. Dr.** Carlos Manuel Dutok Sánchez (Colegiado de Enfermagem - Unifap/AP)

Rio de Janeiro, 30 de novembro de 2021.

**Dedicado à minha filha Ana Sofia**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, principalmente ao suporte que minha madrinha Eunice Ramos sempre deu aos meus estudos e à minha tia Edvania Alves por todo apoio e carinho. Ao Pedro Paulo e sua mãe Célia Freitas por sempre estarem ao meu lado incondicionalmente. Agradeço também à minha pequena filha Ana Sofia por deixar tudo mais leve e feliz.

Agradeço à minha orientadora Dra. Viviane Zahner pela sua competência e paciência, além de todos os ensinamentos desde o começo desse projeto. Ao meu co-orientador Dr. Thiago Pavoni Gomes Chagas meus eternos agradecimentos por somar tanto ao trabalho desenvolvido. À professora e chefe do Laboratório de Entomologia Médica e Forense, Dra. Margareth Queiroz, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de integrar a equipe do LEMEF.

Aos meus amigos do LEMEF: Jéssica Albuquerque, Lorrane Pereira, Isabel Carramaschi, Tatiane Nascimento, Leiani Couto, Marina Duarte, Thais Viana e Lucas Cortinhas pela amizade, aprendizados e cafés compartilhados.

Aos membros da banca pelas contribuições inseridas.

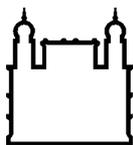
Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde do IOC pelo apoio e pela secretária Luciana Mara, sempre disponível e apta em ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E por fim, a todos que de alguma forma fizeram parte de todo esse processo até aqui. Meus sinceros agradecimentos.

"Eu vim de tão longe daqui  
Eu vim de tão longe, raízes eu finquei aqui  
Eu vim de tão longe para ver o sol nascer  
Eu vim de tão longe sei que outras flores vão florescer..." (Quando as  
estações mudarem - Tamarindus).

"É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para  
sempre, à margem de nós mesmos" (Fernando Teixeira de Andrade).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

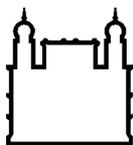
### LEVANTAMENTO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS A PARTIR DE MOSCAS COLETADAS EM JACAREPAGUÁ, RIO DE JANEIRO

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Daislany Andreia da Silva Alves

A resistência bacteriana é um problema crescente em todo o mundo e os dípteros são agentes de disseminação dessas bactérias resistentes, de forma que esses insetos podem atuar como indicadores de contaminação ambiental e de amplificação da resistência bacteriana. O principal objetivo do estudo foi verificar a diversidade de espécies bacterianas resistentes a antibióticos de importância clínica, presente nos dípteros muscoides isolados em áreas próximas a uma fábrica de carne de aves. Foram coletados 59 dípteros muscoides em Jacarepaguá, no Rio de Janeiro, por armadilhas confeccionadas de garrafa plástica contendo como isca para as moscas carne moída putrefata. Essas moscas coletadas foram levadas individualmente ao laboratório e identificadas em nível de família. Posteriormente, foram maceradas e este macerado foi diluído e plaqueado em diferentes meios de cultura com e sem antibiótico. Através da tecnologia de ionização e dessecção a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-TOF) os isolados bacterianos foram identificados. A análise fenotípica dos perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizada através do método de disco-difusão. Os determinantes genéticos que conferem resistência a beta-lactâmicos mais comumente encontrados em amostras clínicas, resistência à vancomicina, à colistina e o gene *aac(6')-Ib* como gene codificador de enzima modificadora de aminoglicosídeo foram investigados através de reações da polimerase em cadeia (PCR). Em relação aos insetos em nível de família, 33 dípteros muscoides foram identificados como Fanniidae, 16 Muscidae, 6 Sarcophagidae e 2 Psychodidae. Diferentes espécies bacterianas foram isoladas e identificadas. Verificou-se perfis de resistência entre 13 cepas pertencentes a seis espécies diferentes. Quatro cepas de *E. faecalis* foram positivas para o gene *vanB*, que codifica resistência a vancomicina e uma amostra de *A. johnsonii* foi positiva para o gene *bla<sub>GIM-1</sub>*, que confere resistência a carbapenêmicos e outros beta-lactâmicos. Os resultados obtidos destacam a importância dos dípteros muscoides atuando como disseminadores de uma elevada variedade de microrganismos e resistentes a diferentes antimicrobianos de importância clínica.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### SURVEY OF ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA FROM FLIES COLLECTED IN JACAREPAGUÁ, RIO DE JANEIRO

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN “BIODIVERSIDADE E SAÚDE”

**Daislany Andreia da Silva Alves**

Bacterial resistance is a growing problem all over the world and dipterans are agents for the dissemination of these resistant bacteria, so these insects can act as indicators of environmental contamination and amplification of bacterial resistance. The main objective of the study was to verify the diversity of bacterial species resistant to clinically important antibiotics, present in muscoid dipterans isolated in areas close to a poultry meat factory. Fifty-nine muscoid dipterans were collected in Jacarepaguá, Rio de Janeiro, using traps made of plastic bottles containing putrefied ground meat as bait. These collected flies were taken individually to the laboratory and identified at the family level. Afterwards, they were macerated and this macerate was diluted and plated in different culture media with and without antibiotics. Through matrix-assisted laser desorption and ionization technology - time of flight (MALDI-TOF) the bacterial isolates were identified. The phenotypic analysis of antimicrobial susceptibility profiles was performed using the disk-diffusion method. The genetic determinants that confer resistance to beta-lactams most commonly found in clinical samples, resistance to vancomycin, colistin and the *aac(6')-Ib* gene as a gene encoding aminoglycoside-modifying enzyme were investigated through polymerase chain reactions (PCR). Regarding family-level insects, 33 muscoid dipterans were identified as Fanniidae, 16 Muscidae, 6 Sarcophagidae and 2 Psychodidae. Different bacterial species were isolated and identified. Resistance profiles were verified among 13 strains belonging to six different species. Four strains of *E. faecalis* were positive for the *vanB* gene, which encodes resistance to vancomycin, and one sample of *A. johnsonii* was positive for the *blaGIM-1* gene, which confers resistance to carbapenems and other beta-lactams. The results obtained highlight the importance of muscoid dipterans acting as disseminators of a high variety of microorganisms and resistant to different clinically important antimicrobials.

## ÍNDICE

### RESUMO VIII

### ABSTRACT IX

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	50
2.1 Objetivo Geral.....	50
2.2 Objetivos Específicos.....	50
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	51
3.1 Coleta e identificação de dípteros muscoides.....	51
3.2 Isolamento de bactérias e estocagem.....	51
3.3 Coloração de Gram.....	52
3.4 Identificação bacteriana por MALDI-TOF MS .....	52
3.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) por disco difusão (Kirby-Bauer, 1966).....	53
3.6 Semeadura em meio <i>CHROMagar<sup>TM</sup></i> VRE.....	54
3.7 Detecção molecular dos genes de resistência.....	54
3.7.1 Extração de DNA.....	54
3.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	55
<b>4 RESULTADOS</b> .....	59
4.1 Coleta e identificação de dípteros muscoides.....	59
4.2 Morfologia de colônia e contagem de UFC/mL.....	59
4.3 Identificação bacteriana.....	64
4.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	66

4.5 Semeadura em meio <i>CHROMagar</i> <sup>TM</sup> VRE.....	73
4.6 Detecção de genes de resistência.....	73
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>
<b>8 APÊNDICES E/OU ANEXOS.....</b>	<b>111</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> "Crop" designado por Stoffolano, 2019 - <i>Fly foregut and transmission of microbes</i> .....	18
<b>Figura 2:</b> Linha do tempo com o ano aproximado da introdução dos antimicrobianos e do surgimento de suas respectivas resistências.....	27
<b>Figura 3:</b> Principais bactérias isoladas em diferentes estudos a partir de moscas.....	35
<b>Figura 4:</b> Esquema de classificação para $\beta$ -lactamases, de acordo com revisão feita por Bush e Jacoby (adaptado de Bush e Jacoby, 2010).....	39
<b>Figura 5:</b> Funcionamento do MALDI-TOF MS.....	44
<b>Figura 6:</b> Garrafa plástica para coleta de dípteros e garrafa posionada em local próximo a fábrica de carnes.....	51
<b>Figura 7:</b> Resultado da PCR para o gene <i>vanA</i> .....	74
<b>Figura 8:</b> Resultado da PCR para o gene <i>vanB</i> .....	74
<b>Figura 9:</b> Resultado da PCR para o gene <i>bla</i> <sub>GIM</sub> .....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dados epidemiológicos sobre alguns microrganismos carreados por dípteros muscoides.....	20
<b>Tabela 2:</b> Revisão entre os principais trabalhos sobre interação de moscas e bactérias.....	30
<b>Tabela 3:</b> Características fenotípicas que podem ser empregadas na identificação microbiana.....	43
<b>Tabela 4:</b> Reagentes utilizados na PCR e suas respectivas concentrações finais na reação.....	55
<b>Tabela 5:</b> <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos genes de resistência, respectivo produto gerado em pares de bases e referência.....	56
<b>Tabela 6:</b> Espécies bacterianas utilizadas como controles positivos para os genes investigados e suas respectivas origens.....	58
<b>Tabela 7:</b> Família de dípteros e seus respectivos exemplares.....	59
<b>Tabela 8:</b> Contagem de UFC/mL e características morfocoloniais dos isolados bacterianos.....	59
<b>Tabela 9:</b> Identificação dos dípteros muscoides ao nível de família e dos isolados bacterianos por MALDI-TOF MS.....	64
<b>Tabela 10:</b> Comparação entre os testes de sensibilidade e PCR para <i>E. faecalis</i> ..	67
<b>Tabela 11:</b> Resultado de sensibilidade aos antimicrobianos, de acordo com o BrCast 2019.....	69

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µL	microlitro
AmpC	Tipo de beta-lactamase cromossomal
AMR	Resistência antimicrobiana
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
BHI	Infusão de cérebro-coração, do inglês " <i>Brain Heart Infusion</i> "
Ca	cálcio
CA-MRS	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina associado a comunidade, do inglês "Community associated – Methicilin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> "
CAZ	ceftazidima
CCBH	Coleção de Culturas de Bactérias Hospitalares
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
cm	centímetro
CTX	Cefotaxima
CTX-M	Beta-lactamase Cefotaximase
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês " <i>Deoxyribonucleic acid</i> "
dNTP	deoxinucleotídeo
ERT	Ertapenem
ESBL	β-lactamase de espectro estendido, do inglês " <i>Extended spectrum beta-lactamase</i> "
et al.	e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	do inglês "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing"
FEP	cefepime
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FOX	Cefoxitina
FOSF	Fosfomicina/trometranol
GES	do inglês "Guiana extended spectrum beta-lactamase"
GN	Gentamicina

g	grama
GIM	German imipenemase
h	hora
HCl	ácido clorídrico
IMP	activeonimipenem
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPM	imipenem
IRAS	Infecções relacionadas à assistência em saúde
kb	kilo base (mil pares de base)
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemase
L	litro
LEMEF	Laboratório de Entomologia Médica e Forense
LPS	lipopolissacarídeos
M	molar
MALDI-TOF MS	do inglês, "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry"
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MEM	Meropenem
Mg	magnésio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
min	minuto
mL	mililitro
MLST	do inglês, "Multi-locus sequence type"
mM	milimolar
MRSA	Staphylococcus aureus resistente à meticilina, do inglês "Methicilin-resistant Staphylococcus aureus"
NCBI	do inglês, "National Center for Biotechnology Information"
ND	não determinado
NHE	Enterotoxina não-hemolítica, do inglês <i>non-hemoliticenterotoxin</i>
NI	não identificado
NDM	New Delhi metalo-β-lactamase
ng	nanograma
OXA	Oxacilinase
PABA	ácido para-amino-benzoico

pb	Pares de base
PBPs	Proteínas ligadoras de penicilina
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Polimorfismo em eletroforese de campo pulsado, do inglês " <i>Polimorphisms field gel electrophoresis</i> "
POL	Polimixina B
pmol	picomol
RAPD	Polimorfismo de DNA amplificado randomicamente, do inglês " <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> "
RFLP	Polimorfismos de comprimentos de restrição, do inglês " <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> "
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês " <i>Ribonucleic acid</i> "
rpm	rotação por minuto
seg	segundo
SDS	do inglês, "Sodium dodecil sulfato"
SHV	do inglês, "Beta-lactamase Sulfhydryl variable"
SIM	Seoul imipenemase
SPM	São Paulo metalo- $\beta$ -lactamase
ST	do inglês, " <i>Sequence type</i> "
SXT	Sulfametoxazole/ Trimetropima
Taq	do inglês, " <i>Thermus aquaticus</i> "
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEM	Beta-lactamase Temoneira
tRNA	RNA transportador
TSA	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
U	unidade
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
V	volt
VIM	Verona integron-encoded metalo- $\beta$ -lactamase
VRE	Enterococcus resistente à vancomicina, do inglês " <i>Vancomycin-resistant enterococci</i> "

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Dípteros muscoides

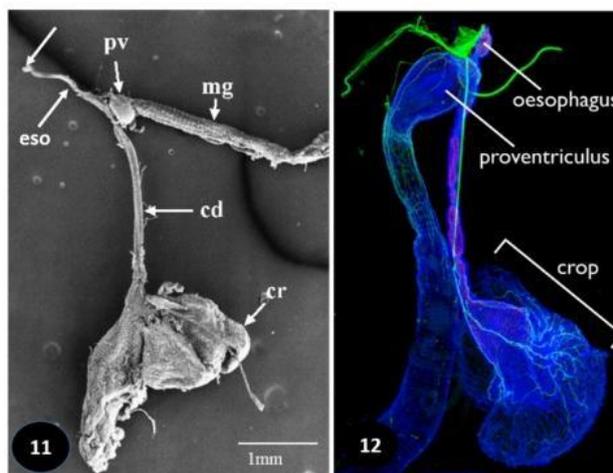
A ordem Diptera compreende os insetos conhecidos popularmente como moscas e é uma das ordens mais ricas e variadas em termos ecológicos com mais de 150.000 espécies descritas, sendo provavelmente o grupo mais diverso dentre as quatro ordens de insetos. A monofilia de dípteros está bem estabelecida, incluindo a transformação das asas traseiras e os elementos de partes do aparelho bucal, sendo uma importante característica de sinapomorfia que a distingue das demais ordens da Classe Insecta (1).

Dípteros muscoides são importantes vetores de patógenos (2), e os carregam em sua boca, asas, patas e superfície corporal, assim como podem liberá-los através do conteúdo de sua regurgitação e defecação. Destacam-se devido à sinantropia e a importância médica-sanitária que apresentam (3). As moscas são consideradas importantes vetores de patógenos humanos e alguns pequenos animais por estarem amplamente distribuídas, tanto em áreas urbanas como rurais e são capazes de voar longas distâncias. Além disso, são atraídas por matéria orgânica em decomposição e se movimentam entre fezes e carcaças, ou seja, são comuns em ambiente insalubre (4) (5) (6) (7).

Entre os microrganismos que podem ser transportados, vale ressaltar as bactérias, protozoários, vírus e ovos de helmintos, que causam disenteria, febre tifóide, antraz, shigelose, tuberculose, intoxicação alimentar, cólera, helmintíase, infecções nosocomiais, entéricas e antropozoonóticas e diarreia infantil (8) (9) (10).

Trabalhos como o de Fukuda et al., (2015) (11) e Stoffolano, (2019) (12) mostraram que o intestino da mosca fornece um ambiente adequado para o transporte de bactérias resistentes aos antimicrobianos e transferência horizontal de genes de resistência, pois cria um local seletivo para diferentes microrganismos capazes de amplificarem seu potencial patogênico, seja por conta de temperatura ou até mesmo o pH. Essa atividade de transferência pelo inseto pode ser considerada tanto mecânica quanto biológica, sendo as pernas e o aparelho bucal estruturas imprescindíveis para o seu envolvimento na transmissão de microrganismos. O órgão identificado como "*crop*" ou "papo" ou mesmo divertículo ventral (Figura 1)

está ligado a essa habilidade de vetoração, pois é nessa região que os microrganismos podem ser armazenados e posteriormente transmitidos para diferentes superfícies, inclusive na regurgitação. O "crop" é considerado uma região segura para as bactérias, pois contém poucos peptídeos antimicrobianos, e nele podem ocorrer a multiplicação bacteriana e a troca gênica, sendo portanto um local de amplificação e promoção de diversidade genética (12).



**Figura 1:** "Crop" designado por Stoffolano, 2019 - *Fly foregut and transmission of microbes* (Fonte: Stoffolano, 2019).

Quando se trata da possibilidade de transmissão de microrganismos, existem diferentes rotas para a contaminação. Os patógenos se fixam por adesão e as moscas podem carrear-los e contaminar assim os substratos por contato. A carga inicial bacteriana ou o tempo de exposição no substrato contaminado influenciam as taxas de aquisição de bactérias pelas moscas (13).

## 1.2 Principais famílias de dípteros muscoides

Muscidae é uma família que possui amplo número de espécies descritas, entre elas *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) que, popularmente, é conhecida como mosca doméstica. Esta espécie é considerada como praga e grande problema em áreas urbanas quando não há o manejo sanitário apropriado. Está relacionada à doenças como diarreia, cólera e intoxicação alimentar (8) (14) (15). É uma família muito rica em espécies, relatada em diferentes regiões biogeográficas, desde áreas muito arborizadas e de ampla altitude até áreas expostas, mesmo que em menor frequência (16). Assim como em outros diferentes grupos, possui características como a fácil movimentação e a forte interação com humanos. Destaca-se o fato de carrear diferentes microrganismos tais como: *Salmonella* spp., *Shigella* spp.,

*Escherichia coli* produtora de ESBL apresentando o gene que codifica para a enzima CTX-M em plasmídeo conjugativo e *Pseudomonas* sp. portadora do gene *bla*<sub>TEM</sub> em fazendas de frango; ou *Staphylococcus aureus* isolado a partir dessa espécie de mosca coletada em fazendas de gado (17) (18) (8).

A família Fanniidae é encontrada em todas as regiões biogeográficas, exceto nos pólos, sendo mais predominante em regiões temperadas. Alguns representantes são conhecidos por sua importância forense, médica e higiênica, e é encontrada principalmente em áreas de floresta, enquanto suas larvas são mais comuns em locais com acúmulo de matéria orgânica. Poucas espécies podem causar doenças ou produzir algum tipo de miíase intestinal (19) (20).

Sarcophagidae é uma grande família dentre os Calyptrados de Muscomorpha e são importantes em relação à Entomologia Forense devido aos seus hábitos alimentares, principalmente aqueles exercidos por suas larvas. São capazes de parasitar outros insetos e ocasionar miíases, tanto em humanos quanto em animais. Podem ter participação em doenças como micoses, hanseníase e até poliomielite (21).

Dentre as famílias amplamente conhecidas, Calliphoridae é extensamente distribuída devido a sua persistência em variados ambientes. São conhecidas como moscas-varejeiras e podem desempenhar importante papel nas áreas médica e forense. Podem transmitir ovos de helmintos e causar miíases. Dentre elas, *Chrysomya megacephala* é uma espécie que está associada a algumas doenças como diarreia e miíases secundárias (22) (23) (24). Atualmente é uma das espécies mais encontradas nos lixões de grandes cidades brasileiras e relatos a respeito de bactérias multirresistentes isoladas a partir delas têm sido publicados (25) (15) (26) (27). Outra família que ganha destaque é a de Psychodidae, pois tem sido amplamente estudada, principalmente devido ao papel dessas moscas como vetores de vários parasitas, incluindo espécies de *Leishmania*, *Bartonella* e arbovírus que causam doenças em humanos e outros vertebrados (28).

### **1.3 Infecções relacionadas à assistência em saúde e bactérias patogênicas**

As infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS) são a principal causa de morte e morbidade em pacientes internados em todo o mundo, principalmente, em pacientes imunocomprometidos (29). As IRAS constituem um relevante problema de Saúde Pública, sendo responsáveis pelo aumento no tempo

de hospitalização e, conseqüentemente, elevados custos adicionais para o tratamento do doente. No Brasil, as IRAS têm sido motivo de preocupação entre os órgãos governamentais, especialmente, para o Sistema Único de Saúde (SUS) (30). Kappel et al., (2013) (3) observaram moscas sinantrópicas voando em todos os quartos selecionados de uma enfermagem pediátrica e na UTI neonatal no hospital universitário do Triângulo Mineiro, de onde foram isoladas bactérias a partir da superfície externa desses insetos, inclusive espécies bacterianas relacionadas à IRAS.

Entre o grupo de patógenos associado às IRAS, as bactérias são os microrganismos que mais se destacam, principalmente as espécies inseridas no grupo do acrônimo: "ESKAPE", o qual inclui os Gram-positivos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* e os Gram-negativos *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e a família Enterobacteriaceae (31). Este grupo tem como característica a capacidade de aquisição de diversos mecanismos de resistência a antimicrobianos, o que dificulta a terapêutica antimicrobiana e tem o grupo das bactérias Gram-negativas como significativos patógenos oportunistas. No ambiente hospitalar, esse mesmo grupo tem sido associado a uma grande variedade de infecções (32).

A tabela 1 traz alguns dados referentes a classe de risco para clínica humana, hospedeiro e reservatório sobre alguns microrganismos isolados a partir de moscas e que podem estar relacionados a infecções tanto em alas hospitalares quanto na própria comunidade, como indicado pelo Ministério da Saúde.

**Tabela 1:** Dados sobre classificação de risco, hospedeiro (s) e reservatório (s) sobre alguns microrganismos carreados por dípteros muscoides.

<b>Microrganismo</b>	<b>Classe de risco</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Reservatório</b>
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	2	Humanos imunocomprometidos	Fontes aquáticas, humanos e animais
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2	Humanos	Ambientes aquáticos
<i>Bacillus cereus</i>	2	Humanos imunocomprometidos e animais	Humanos, animais, fezes, organismos no solo, palha e alimentos

<i>Bacillus simplex</i>	2	Animais e humanos	Solo, água, alimentos e fezes
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	Humanos, animais domésticos e de criação	TGI de aves, mamíferos, aves, répteis e insetos
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i>	1	Humanos e animais	Alimentos
<i>Glutamicibacter mysorens</i>	1	Humanos e animais	Água, sedimentos, alimentos, urina e moscas
<i>Glutamicibacter protophormiae</i>	1	Humanos e animais	Fonte aquática, humanos, moscas, raízes e alimentos
<i>Hafnia alvei</i>	1	Humanos e animais	Humanos, água e animais
<i>Lactobacillus</i>	1	Humanos e animais	Animais, vegetais e humanos
<i>Lactococcus garvieae</i>	1	Humanos e animais	Humanos, água e animais
<i>Microbacterium sp.</i>	2	Humanos imunocomprometidos e animais	Solo e água
<i>Providencia alcalifaciens</i>	2	Humanos imunocomprometidos	Água e alimentos contaminados
<i>Pseudomonas fulva</i>	1	Insetos	Plantas e grãos
<i>Pseudomonas sp.</i>	2	Humanos, animais e plantas	Humanos infectados
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	Humanos	Ambiente hospitalar
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	Humanos	Ambiente hospitalar
<i>Wautersiella falsenii</i>	1	Humanos imunocomprometidos	Humanos

Classificação de risco: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006)

A classificação de risco de um determinado microrganismo patogênico é baseada, principalmente, pelo seu grau e potencial de risco que pode oferecer a um indivíduo ou meio ambiente. Cada país adota uma classificação que tende a variar de acordo com a realidade epidemiológica local. No Brasil, a Instrução Normativa nº 7, de julho de 1997, que estabelece normas para o trabalho em contenção com organismos geneticamente modificados, apresenta, em seu anexo, a classificação de agentes etiológicos humanos e animais com base no risco apresentado. Esta instrução agrupa os microrganismos em classes de 1 a 4, sendo a classe 1 a de menor risco e a classe 4 a de maior risco. Os riscos mais baixos e moderados fazem parte das classes 1 e 2, encontradas no presente estudo, que vão desde um risco ausente ou muito baixo, como a Classe de risco 1, que possui uma baixa probabilidade de causar infecções. A classe de risco 2 inclui os microrganismos cujo o risco individual é moderado e para a comunidade é baixo; esses microrganismos são capazes de causar infecções, porém o seu risco de propagação é limitado, pois contra eles existem medidas terapêuticas e profiláticas eficientes (33) (34).

#### **1.4 Resistência antimicrobiana**

Alexander Fleming estava ciente das consequências potenciais do uso intenso de antibióticos já em 1945, devido à produção em massa dos medicamentos desde a década de 1940 e alertava então sobre os riscos futuros de uma resistência emergente. Logo após suas declarações, um hospital de Londres relatava altas taxas de resistência à penicilina por *S. aureus*.

É compreendido que a resistência antimicrobiana antecede ao uso de antibióticos no século XX, tanto que genes de resistência já foram identificados em DNA bacteriano congelado no Ártico datado de aproximadamente 30.000 anos, e em bactérias datadas em mais de 4 milhões de anos, presentes numa caverna subterrânea (35).

Para encontrar genes ancestrais de resistência aos antibióticos clinicamente relevantes, é necessário investigar o ambiente natural, onde a capacidade de resistir especificamente a cada classe de antibióticos é um dos múltiplos mecanismos usados pelas bactérias para lidar com estímulos externos. Genes de resistência já foram detectados em animais selvagens e em comunidades humanas remotas com pouca ou nenhuma exposição a antibióticos. Entender as diferentes vias biológicas e ambientais em que as bactérias e seus genes se propagam é fundamental para formular melhores políticas de uso dos antimicrobianos e o controle mais rígido do

seu uso. Trabalhos apontam que bactérias multirresistentes podem ser identificadas em populações com baixa ou nenhuma exposição a antimicrobianos (36) (37). Porém, com o uso frequente em diferentes regiões do globo, cada introdução sucessiva desses medicamentos foi seguida pelo surgimento de resistência, principalmente em ambientes hospitalares (38).

As principais fontes de bactérias resistentes a antibióticos, além dos hospitais, são esgotos domésticos e instalações de produção animal. Em 2015, apenas 39% da população global (2,9 bilhões) utilizava um serviço de saneamento com gestão segura (39). Até mesmo em regiões onde processos adequados de tratamento de águas residuais são implementados, a contaminação de córregos, lagos, rios e solos com bactérias resistentes a antibióticos pode ser inevitável. A disseminação generalizada da resistência aos antimicrobianos no meio ambiente pode resultar na contaminação da vida selvagem, na cadeia alimentar humana e nas áreas de lazer, e os insetos, incluindo as moscas, por frequentarem esses ambientes tornam-se potenciais agentes dispersores desta resistência (40).

Quando se trata do ambiente em seus diferentes nichos ecológicos, nem sempre o potencial das moscas em disseminar bactérias resistentes a antibióticos é questionado, sendo a origem do problema apontada a alimentos de origem animal, pelo contato humano direto com animais ou através de rotas ambientais, que geralmente incluem os animais domésticos e de produção, o uso do esterco e o cultivo de vegetais. O fato de microrganismos resistentes a antibióticos poderem sobreviver em uma ampla gama de nichos e de se adaptar a hospedeiros alternativos contribui para a ampliação de sua capacidade em adquirir ou transmitir novos determinantes de virulência e resistência (36). A aquisição da resistência antimicrobiana está relacionada à pressão seletiva sofrida e a natureza da transferência horizontal, determinada pelos mecanismos de conjugação, transformação e transdução. A transferência de genes de resistência deve-se principalmente ao mecanismo de conjugação, através de plasmídeos e transposons (41) (36).

Como consequência da transferência gênica pode-se exemplificar a ocorrência de infecções com taxas mais altas de resistência e potencialmente mais virulentas, principalmente por bactérias Gram-negativas resistentes aos antimicrobianos mais utilizados na prática clínica e esse efeito faz com que os antibióticos considerados de última linha sejam utilizados como única opção disponível. Nesse contexto, a contaminação no ambiente por antimicrobianos ou

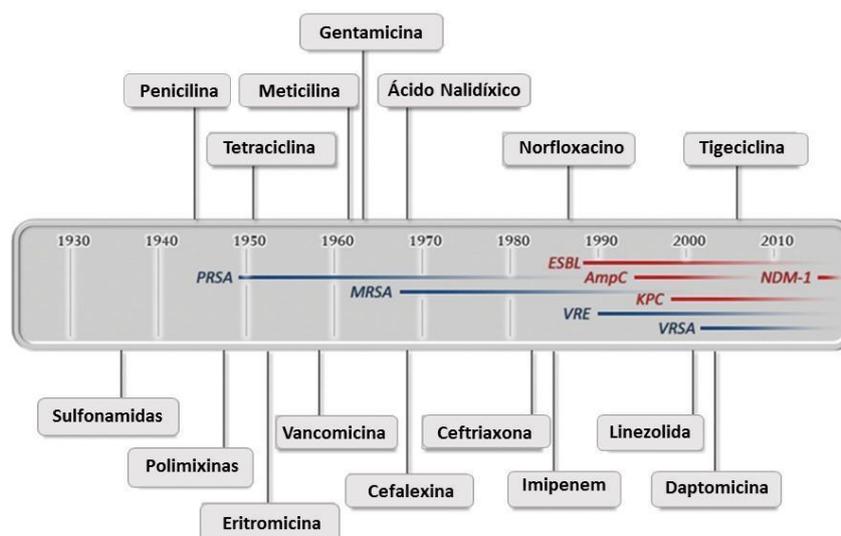
outros poluentes leva ao aumento de resistências devido a processos de seleção natural e transferência gênica (42).

Além da transmissão local entre habitats conectados, essa relação pode ocorrer dentro de uma escala mais ampla, exigindo ações de saúde global mais coordenadas, visto que a disseminação da resistência aos antibióticos pode expandir clones resistentes, o que leva a um maior potencial de alterar a genética de populações bacterianas em diferentes níveis (42). Nos últimos anos, observou-se um aumento no diagnóstico de doenças transmitidas por insetos vetores entre humanos e animais não humanos, o que pode ser em parte devido ao desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico mais modernas que identificam esses patógenos ou como outros fatores que incluem mudanças climáticas, tendo em vista que essa realidade pode interferir na densidade numérica destes insetos, ou seja, a modificação no ecossistema gera uma reação em cadeia em diferentes âmbitos, influenciando inclusive o sistema biológico de diversos seres vivos (43) (44).

A resistência antimicrobiana tornou-se um problema global, e é o mais representativo exemplo da necessidade da aplicação da consciência do conceito de Saúde Única, devido ao uso inadequado dos antimicrobianos tanto na medicina humana quanto animal.

A Figura 2 ilustra que a produção de medicamentos não acompanha as mutações bacterianas. A consequência disso é uma previsão de que até 2050 os patógenos resistentes aos antibióticos causarão cerca de 10 milhões de mortes em todo o mundo. Ressalta-se que entre 1990 e 2015 aproximadamente 1000  $\beta$ -lactamases relacionadas à resistência foram identificadas, incluindo novas classes de genes (45). Essas enzimas são importantes para degradar, como o próprio nome diz, os antibióticos beta-lactâmicos pela catálise hidrolítica do anel beta-lactâmico, inativando a propriedade bactericida desses fármacos. Desse modo, ocorre falha no mecanismo de ação desses antibióticos e a bactéria continua a biossíntese normal da parede celular, o que geralmente leva à falha terapêutica (46).

Conseqüentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elaborou um Plano de Ação Global a fim de combater a resistência aos antimicrobianos. Dentre as medidas, exemplifica-se o controle e formas de financiamento que incentivem a inovação, assim como o saneamento básico (47).



**Figura 2:** Linha do tempo com o ano aproximado da introdução dos antimicrobianos e do surgimento de suas respectivas resistências (Fonte: Molton, 2013).

O estudo de Klein et al., (2018) (48) analisa as tendências que impulsionaram o consumo de antibióticos entre os anos de 2000 a 2015 em 76 países e o consumo global total de antibióticos projetado até 2030 com base nas 131.000 toneladas de antimicrobianos que foram utilizados globalmente na produção de alimentação animal até 2013 (49). Apesar dos regulamentos e controles para reduzir o uso de antimicrobianos foi relatado um aumento de 200%, significando 200.000 toneladas até 2030 (50).

O surgimento de cepas Gram-negativas resistentes a muitas classes de antibióticos tem sido atribuído a sua rápida capacidade em acumular mecanismos de resistência bem como sua plasticidade para transferência genética. Existe uma preocupação especial quanto aos  $\beta$ -lactâmicos, especialmente os carbapenêmicos, que por anos foram os agentes mais importantes para o tratamento de infecções causadas por cepas multirresistentes, porém suas taxas de suscetibilidades vêm declinando de forma considerável podendo superar até 50%. Compreendem um importante grupo de antibióticos utilizados no tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas e, assim, os mecanismos de resistência a este grupo passam a ter uma grande relevância (51).

Dentre as cepas Gram-positivas, os diferentes mecanismos de resistência desses microrganismos são ameaças à saúde pública. *S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis* e *Streptococcus pneumoniae*, representam as principais espécies desse

grupo em que a prevalência e disseminação dos mecanismos de resistência podem variar de acordo com o microrganismo em questão (52). Duas estratégias principais nesses mecanismos podem incluir a degradação enzimática do antibiótico pela produção de  $\beta$ -lactamases ou pela diminuição da afinidade e a susceptibilidade do seu local no alvo, a proteína de ligação à penicilina (PBP), por qualquer aquisição de DNA exógeno ou por alterações nos genes PBP nativos (53).

### 1.5 Dípteros muscoides como vetores de resistência bacteriana

Diversos fatores podem influenciar a disseminação de resistência antimicrobiana, assim, é necessária a determinação precoce e de vigilância dessa propagação em escala global. A literatura apresenta a presença em moscas de bactérias resistentes em diferentes locais e destacam: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae*. Portanto, as moscas podem funcionar como vetores sinantrópicos de vários patógenos e podem ser reservatórios de microrganismos resistentes (54) (55) (9) (56).

De acordo com a OMS, áreas de clima tropical e subtropical são as mais afetadas, onde as doenças transmitidas por vetores são responsáveis por cerca de 17% de todas as doenças infecciosas (10).

Dentre as bactérias patogênicas mais comumente encontradas, principalmente em *M. domestica*, incluem-se *Bacillus* spp., *Campylobacter* spp., *E. faecalis*, *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *S. aureus*, *Vibrios* pp. (57) (58) (59) (60) (61) (25).

Bactérias produtoras de ESBLs ( $\beta$ -lactamases de espectro estendido) puderam ser isoladas a partir de moscas desde fazendas de criação de aves até mesmo em aeroportos, sendo estes insetos potencialmente eficazes para a transferência horizontal de genes e consequente disseminação de genes de resistência e virulência entre bactérias (5) (6) (62).

No Brasil são poucos os trabalhos que visam relacionar o papel dos dípteros muscomorfos no transporte de bactérias resistentes, mesmo que no atual cenário regulatório exista um sistema de fiscalização. Neste contexto, Carramaschi et al., (2019) (63) publicaram o primeiro relato de *Raoultella ornithinolytica* carreando *bla<sub>KPC-2</sub>* isolada de um díptero da espécie *Malacophagomya filamenta*. Em 2021, Carramaschi et al., (2021) (27) apresentam diferentes espécies de dípteros muscoides: *C. megacephala*, *Lucilia cuprina*, *Malacophagomya filamenta* e *M. domestica*, carreando grande diversidade bacteriana, principalmente da ordem

*Enterobacterales*. Entre 10 bactérias MDR (5%), 5 cepas (2,5%) foram positivas, por PCR, para um ou mais dos seguintes genes de resistência a antibióticos: *aac(6')-Ib*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>KPC-2</sub>* e *bla<sub>NDM-1</sub>*. A tabela 2 apresenta uma revisão da literatura mundial até a presente data (31/08/2021) onde se encontram os dípteros muscoides, as espécies bacterianas, os locais de isolamento e os genes de resistência encontrados.

**Tabela 2:** Revisão entre os principais trabalhos sobre interação de moscas e bactérias.

<b>Genes Ligados a Resistência</b>	<b>Plataforma Genética</b>	<b>Espécies Bacterianas</b>	<b>Dípteros (Moscas) Espécie ou Família</b>	<b>Ambiente (s)</b>	<b>Referência</b>
ND	ND	<i>Klebsiella</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Viridans streptococci</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus</i> spp.	<i>Musca domestica</i>	Hospital e área urbana	Fotedar et al., 1992
ND	ND	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Musca domestica</i>	Hospital	Fotedar et al., 1992
ND	ND	<i>Escherichia coli</i>	<i>Musca domestica</i>	Escola	Kobayashi et al., 1999

ND	ND	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> sp. <i>Shigella sonnei</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Edwardsiella tarda</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Providencia</i> spp. <i>Serratia</i> spp. <i>Erwinia</i> spp. <i>Aeromonas</i> spp. <i>Flavobacterium</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Xanthomonas</i> spp. <i>Weeksella zoohleicum</i> <i>Pasteurellas</i> pp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.	<i>Musca domestica</i>	Hospital, área urbana e matadouro	Rahuma et al., 2005
<i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>tet(W)</i> , Tn916, Tn1545, <i>ermB</i> <i>tet(M)</i> , Tn916, Tn1545	ND	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Musca domestica</i>	Restaurantes fast food	Macovei e Zurek, 2006
ND	ND	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i>	<i>Musca domestica</i>	Sala contendo galinhas	Holt et al., 2007
ND	ND	<i>Myroides odoratimimus</i>	Sarcophagidae	Criação e mercado	Dharne et al., 2008

<i>erm</i> (B), <i>msr</i> (C), Tn916 <i>erm</i> (B), Tn916 <i>msr</i> (A/B)	ND	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus</i> spp.	Muscidae, Calliphoridae	Fazendas avícolas	Graham et al., 2008
<i>tet</i> M	pCF10	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Musca</i> <i>domestica</i>	ND	Akhtar et al., 2009
ND	ND	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Providencia</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.	<i>Periplaneta</i> <i>americana</i> , <i>Musca</i> <i>domestica</i>	Áreas residenciais	Bouamamaa et al., 2010
ND	ND	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Musca</i> <i>domestica</i>	Fazendas e áreas urbanas	Chakrabarti et al., 2010
ND	ND	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Citrobacter freundii</i>	<i>Musca</i> <i>domestica</i>	Hospitais e matadouros	Davari et al., 2010
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>dhfr1</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>FloR</i> , <i>cat</i>	ND	<i>Escherichia coli</i>	<i>Musca</i> <i>domestica</i>	Fazenda de gado leiteiro	Rybaříková et al., 2010
<i>tet</i> (S), <i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (K), <i>ermB</i>	ND	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus hirae</i> <i>Enterococcus</i> <i>casseliflavus</i>	<i>Musca</i> <i>domestica</i>	Fazenda de suínos	Ahmad et al., 2011
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> <i>catA1</i> , <i>strA</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B)	<i>InchI1</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Musca</i> <i>domestica</i>	Clínica equina	Dolejska et al., 2011
ND	ND	<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella</i> spp., <i>Salmonella</i> spp.	<i>Chrysomya</i> spp.	Latrinas de fossa	Lindsay et al., 2012

ND	ND	<i>Nocardia georgica</i> , <i>Micrococcus</i> spp., <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterobacter gergoviae</i> , <i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterobacter gergoviae</i> e <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Telmatoscopus albipunctatus</i>	Diferentes pontos de um hospital	Kappel et al., 2013
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>aac</i> (3)-II, <i>aac</i> (6')-Ib, <i>aphA1</i> , <i>aphA2</i> , <i>qnrS</i>	ND	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Chrysomya gacephala</i>	Aeroporto	Liu et al., 2013
ND	ND	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp.	Calliphoridae, Muscidae, Sarcophagidae	Fazendas leiteiras	Almeida et al., 2014
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>	ND	<i>Escherichia coli</i>	<i>Musca domestica</i> , <i>Fannia canicularis</i> , <i>Lucilia</i> spp., <i>Stomoxys calcitrans</i>	Fazendas avícolas	Blaak et al., 2014
ND	ND	<i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Chrysomya megacephala</i> , <i>Musca domestica</i>	Mercados de alimentos frescos, pilhas de lixo, restaurantes, refeitórios escolares e arrozais	Chaiwong et al., 2014

<i>geIE, asa1, esp, cyla</i>	ND	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Musca domestica</i>	Estações de tratamento de águas residuais	Doud et al., 2014
ND	ND	<i>Pseudomonas putida, Bacillus subtilis, Pseudomonas sp., Staphylococcus, Enterococcus hirae, Enterococcus faecalis, Carnobacterium maltaromaticum, Staphylococcus sp., Vagococcus teuberi, Lactobacillus plantarum</i>	Calliphoridae	Cidades metropolitanas e distrito suburbano	Wei et al., 2014
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	ND	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Musca domestica</i>	Cozinhas, fazendas de gado, hospitais, matadouros e granjas em locais aleatórios	Hemmatinezhad et al., 2015
ND	ND	<i>Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Salmonella spp., Shigella spp., Klebsiella pneumoniae, Serratia spp.</i>	<i>Musca domestica</i>	Escola, periferia e lixão municipal	Muñoz e Rodriguez, 2015

<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>Inc</i> 11, <i>Inc</i> FIA, <i>Inc</i> FIB, <i>Inc</i> P, <i>Inc</i> K, <i>Inc</i> Y <i>Inc</i> 1, <i>Inc</i> FIB, <i>Inc</i> P	<i>Escherichia coli</i>	<i>Musca domestica</i> , <i>Muscina stabulans</i>	Fazendas avícolas	Solà-Ginés et al., 2015
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D), <i>tet</i> (E), <i>tet</i> G10	ND	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lucilia sericata</i> <i>Stomoxys calcitrans</i> <i>Musca domestica</i>	Fazenda de suínos e bovinos	Usui et al., 2015
ND	ND	<i>Escherichia coli</i> , <i>Campylobacter</i> sp.	<i>Musca domestica</i>	Granjas e dentro ou perto de aviários	Evers et al., 2016
ND	ND	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Estafilococos coagulase-negativos</i> (SNC), <i>Klebsiella</i> sp., <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp. e <i>Proteus</i> spp.	<i>Musca domestica</i>	Fazendas de gado	Mohammed et al., 2016
ND	ND	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Musca domestica</i>	Fazendas bovina/avícola, cozinhas de casas, açougue, hospitais humanos/veterinários	Ranjbar et al., 2016
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	ND	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Calliphoridae spp., <i>Musca domestica</i>	Áreas urbanas e rurais	Schaumburg et al., 2016

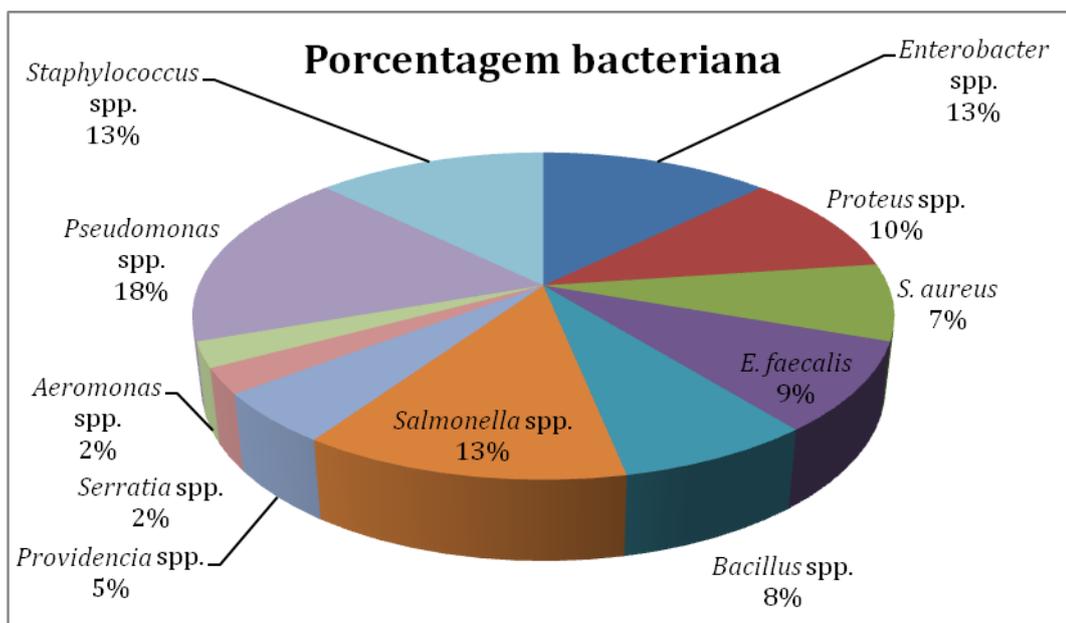
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>EAST1</i> , <i>stx-1</i> , <i>stx-2</i>	ND	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp.	<i>Musca domestica</i>	Mercados de alimentos	Songe et al., 2016
ND	ND	<i>Clostridioides difficile</i>	<i>Musca domestica</i>	Criação em laboratório	Davies et al., 2016
ND	ND	<i>Enterobacterales</i> , <i>Campylobacteraceae</i> , <i>Staphylococcaceae</i> , <i>Enterococcaceae</i>	<i>Musca domestica</i>	Fazendas	Bahrndorff et al., 2017
<i>mcr-1</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>aadA1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA14</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>IncX4</i> , <i>IncFII</i> , <i>IncFIB</i> , <i>IncN</i> , <i>IncQ1</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Musca domestica</i>	Fazenda de suínos	Guenther et al., 2017
ND	ND	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus coagulase-negativo</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp.	<i>Musca domestica</i>	Hospitais, centro de frutas/vegetais e um abate de gado	Nazari et al., 2017
<i>bla</i> <sub>NDM</sub> <i>mcr-1</i>	<i>IncX3</i> , <i>IncX4</i>	<i>Escherichia coli</i>	ND	Fazendas, granjas e matadouros	Wang et al., 2017
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet(A)</i> , <i>bla</i> <sub>AMPC</sub>	<i>Int1</i> ( <i>dfrA7</i> )	<i>Escherichia coli</i>	<i>Musca domestica</i>	Fazendas leiteiras	Alves et al., 2018

<i>mcr-1</i> <i>mcr-2</i> <i>mcr-3</i>	ND	<i>Escherichia coli</i> , <i>Providencia stuartii</i> , <i>Providencia alcalifaciens</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Musca domestica</i> <i>Protophormia terraenovae</i>	Campus universitário	Zhang et al., 2017
<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> , <i>mcr-1</i> , <i>mcr-3</i> , <i>CMY-2</i> <i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	ND	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Kluyvera georgiana</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Kluyvera ascorbata</i> <i>Leclercia adcarboxilata</i> <i>Enterobacter asburiae</i>	Muscidae, Calliphoridae, Sarcophagidae	Áreas urbanas, fazendas de suínos e avícolas	Fukuda et al., 2018
ND	ND	<i>Salmonella</i> sp.	ND	Fazendas de gado	Xu et al., 2018
ND	ND	<i>Pantoea</i> sp., <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>Raoultella terrigena</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Escherichia hermannii</i> , <i>Escherichia vulneris</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus</i> ssp.	Calliphoridae, Psychodidae, Phoridae, Sphaeroceridae Cecidomyiidae, Sciaridae, Fanniidae	Diferentes pontos de um hospital	Boiocchi et al., 2019
<i>IncK</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> , <i>aac(6)</i> - <i>lb</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	<i>Malacophagom ia filamenta</i>	Locais próximos a um hospital	Carramaschi et al., 2019

ND: Não definido

A partir desta tabela, é possível notar que a maioria dos insetos coletados são da família Muscidae e espécie *M. domestica*. As principais espécies de bactérias

isoladas podem ser visualizadas na Figura 3. *E. faecalis*, *E. coli*, *Enterobacter* sp., *Bacillus* spp. e *S. aureus* (7), são as espécies mais encontradas, porém, muitos trabalhos fazem o isolamento através de meios seletivos, já causando essa seleção prévia.



**Figura 3:** Principais bactérias isoladas em diferentes estudos a partir de moscas.

## 1.7 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são compostos capazes de causar a morte ou inibir o crescimento de microrganismos, podendo ter sua origem natural, sintética ou semissintética. Esses medicamentos são amplamente utilizados nas práticas clínicas e possuem diferentes classificações, variando de acordo com seu mecanismo de ação (64).

### 1.7.1 $\beta$ -lactâmicos

Para compreender melhor as  $\beta$ -lactamases e a resistência bacteriana aos antibióticos, é importante destacar os principais antibióticos utilizados na prática clínica e testados em laboratório. Todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos apresentam na sua estrutura o anel  $\beta$ -lactâmico, responsável pela ação destes fármacos. Os  $\beta$ -lactâmicos podem ser divididos nas seguintes classes/categorias (e subclasses) de antibióticos: Penicilinas (penicilinas e combinações penicilina/inibidor de beta-lactamases); Cefens (principalmente as subclasses das cefalosporinas e

cefamicinas; combinações cefalosporinas/inibidor de beta-lactamases); Monobactâmico (aztreonam) e Penens (principalmente a subclasse dos carbapenêmicos). Todos os beta-lactâmicos têm como mecanismo de ação a inibição da formação da parede celular através da ligação do  $\beta$ -lactâmico às proteínas ligadoras de penicilina (PBPs, do inglês *Penicillin-Binding Proteins*), (enzimas bacterianas que atuam no processo de transpeptidação durante a biossíntese da parede celular) (65) (46).

#### 1.7.2 Tetraciclinas

As tetraciclinas são antibióticos bacteriostáticos e têm um amplo espectro de atividade. No passado, as tetraciclinas eram desacreditadas devido à alta prevalência de isolados com resistência adquirida, mas agora estão recuperando o *status* devido à incorporação de novos componentes mais ativos. A doxiciclina é atualmente a tetraciclina mais comumente usada e é considerada um medicamento essencial pela OMS. A tigeciclina, um antibiótico da classe das glicilciclinas, é semelhante à tetraciclina, possui um espectro de atividade mais amplo e é uma opção alternativa para o tratamento de infecções complicadas por organismos multirresistentes (66) (67) (68).

#### 1.7.3 Sulfonamidas

As sulfonamidas são antibióticos bacteriostáticos sintéticos de amplo espectro. Por causa da toxicidade associada e altas taxas de resistência, seu uso agora é muito limitado. Possui alta atividade bactericida contra bactérias anaeróbias, algumas bactérias microaerofílicas e protozoários, e permanece muito útil no tratamento de infecções bacterianas e parasitárias (64) (66).

#### 1.7.4 Quinolonas

As quinolonas são uma classe de agentes antibacterianos para o tratamento de várias doenças infecciosas (por exemplo, infecções do trato urinário e respiratório). Elas são usadas em todo o mundo devido ao seu amplo espectro de atividade, alta biodisponibilidade e bom perfil de segurança (69).

Utilizadas na prática clínica desde 1960, as quinolonas foram derivadas do protótipo do ácido nalidíxico. Após duas décadas com o acréscimo de um átomo de flúor a composição da quinolona surgiram as fluoroquinolonas que possuem um maior espectro de ação para bacilos Gram-negativos e boa atividade contra cocos

Gram-positivos. Os principais representantes desta classe são o ácido nalidíxico e ciprofloxacina (64).

#### 1.7.5 Aminoglicosídeos

Aminoglicosídeos são antibióticos de amplo uso clínico, em função de sua eficácia contra bacilos Gram-negativos e de seu sinergismo positivo com outros antibióticos no tratamento de infecções por agentes Gram-positivos. São muito utilizados na prevenção e no tratamento de infecções pós-operatórias em cirurgia cardíaca. O principal efeito colateral desta classe de antibióticos é a nefrotoxicidade, que pode ocorrer em até 20% dos pacientes (30). Embora estivessem entre os primeiros antibióticos descobertos e usados clinicamente e nunca tenham caído completamente em desuso, sua importância diminuiu devido ao surgimento de outros antibióticos de amplo espectro com menos efeitos colaterais.

#### 1.7.6 Macrolídeos

Os macrolídeos representam uma grande família de inibidores da síntese de proteínas de grande interesse clínico devido à sua aplicabilidade na medicina humana. Atuam ligando-se à subunidade ribossômica 50S bacteriana e interferindo na síntese de proteínas, possuem amplo espectro devido a estrutura altamente conservada dos ribossomos dentre as espécies bacterianas. Desde a descoberta do macrolídeo progenitor, eritromicina, em 1950, muitos derivados foram sintetizados, levando a compostos mais aprimorados (70). Os antibióticos macrolídeos inibem a síntese de proteínas, tendo como alvo o ribossomo bacteriano e se ligam ao túnel de saída do peptídeo nascente e o obstruem parcialmente. Assim, os macrolídeos têm sido vistos como 'tampões de túnel' que interrompem a síntese de todas as proteínas. A ação específica do contexto dos macrolídeos é a base para a regulação da expressão de genes de resistência (71).

#### 1.7.7 Glicopeptídeos

Os glicopeptídeos, como vancomicina e teicoplanina, passaram a desempenhar um papel significativo na terapia de infecções bacterianas Gram-positivas. Em particular, a vancomicina é a escolha para a terapia empírica dessas infecções, principalmente devido à sua atividade contra *S. aureus* resistente à meticilina. Embora a resistência entre os *Enterococcus* tenha sido observada inicialmente e continue a aumentar, a lenta fluência da suscetibilidade intermediária

à vancomicina e o medo da resistência franca entre os *Staphylococcus* precipitaram um trabalho crescente, levando à criação de novos análogos semissintéticos (72).

#### 1.7.8 Cloranfenicol

O cloranfenicol foi isolado pela primeira vez a partir de *Streptomyces venezuelae*. Esta droga liga-se à subunidade 30S do ribossomo, interrompendo o movimento dos ribossomos ao longo do mRNA, provavelmente pela inibição da peptidil transferase, responsável pela extensão da cadeia peptídica. Uma vez que o cloranfenicol se liga à mesma região que os macrolídeos e as lincosamidas, eles não podem ser administrados em associação. Os grupamentos nitro e ambos os grupamentos álcool estão envolvidos nas interações. O grupo dicloroacetamida também é importante, porém pode ser substituído por outros grupos eletronegativos (64).

#### 1.7.9 Polimixinas

Os antimicrobianos desta família incluem cinco compostos quimicamente distintos, sendo apenas dois deles, as polimixinas B e E (ou colistina) utilizados na clínica médica. Após alguns anos, o surgimento de bactérias Gram-negativas (BGN) resistentes a quase todas as classes de antimicrobianos, culminou na reintrodução do uso de polimixinas como opção de último recurso para infecções graves por BGN multirresistentes (73). Os dois componentes principais da colistina são colistina A (polimixina E1) e colistina B (polimixina E2) que diferem na cadeia lateral do ácido graxo. Na medicina humana duas formas de colistina estão comercialmente disponíveis colistinametanosulfonato (CMS) de uso parenteral e terapia de aerossol e sulfato de colistina (CS) para utilização oral e tópica (73). O alvo inicial das polimixinas é o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa de BGN. Inicialmente a polimixina se liga a porção lipídeo A do LPS através de interação eletrostática entre os resíduos de ácido diaminobutírico (Dab) carregados positivamente da polimixina e grupos fosfato carregados negativamente do lipídeo A, que possui papel crucial no controle de permeabilidade da célula bacteriana (74) (75). Atualmente são utilizadas para o tratamento de infecções causadas por Gram-negativos resistentes a múltiplos fármacos (MDR) como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (75), além de ser um composto muito utilizado para ração animal em diferentes regiões do globo (76) (48).

## 1.8 Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos

### 1.8.1 $\beta$ -lactamases

As principais enzimas que degradam antibióticos são denominadas  $\beta$ -lactamases, que atuam inibindo os antibióticos classificados como  $\beta$ -lactâmicos. Historicamente, essas enzimas são classificadas com base nas propostas de Ambler (1980) e Bush et al., (1995), e de Jacoby e Medeiros (1991), sendo divididas em classes moleculares (A, B, C e D), de acordo com a estrutura de cada proteína/enzima. As enzimas que pertencem às classes A, C e D, são serina-beta-lactamases, as quais possuem um aminoácido serina no centro ativo e as enzimas da classe B que são metalo-beta-lactamases (MBL), as quais são dependentes de um metal (geralmente zinco) como cofator para a atividade enzimática (77). A produção dessas enzimas é o principal mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em bacilos Gram-negativos, tais como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (46). A Figura 4 representa a classificação das beta-lactamases segundo Bush e Jacoby (2010), resumida e adaptada (78).

**Figura 4:** Esquema de classificação para  $\beta$ -lactamases, de acordo com revisão feita por Bush e Jacoby (adaptado de Bush e Jacoby, 2010).

Grupo Funcional Bush-Jacob	Classe Molecular	Exemplos	Características
1	C	AmpC de <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> ; CMY-2, FOX-1, MIR-1.	Enzimas cromossômicas e plasmidiais produzidas por bactérias Gram-negativas. Conferem resistência a todos os $\beta$ -lactâmicos, exceto os carbapenemas. Não são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
1e	C	GC1, CMY-37.	Enzimas que promovem a hidrólise de penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
2a	A	PC1 e outras penicilinas de <i>Staphylococcus</i> sp.	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência à penicilina. Inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2b	A	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TEM-90.	Enzimas que possuem hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações, inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2be	A	ESBL: CTX-M-15, CTX-M-44, PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26.	Conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
2br	A	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26.	Enzimas que possuem hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações, entretanto não são bem inibidas por ácido clavulânico.
2ber	A	TEM-50, TEM-68, TEM-89	Promovem a hidrólise de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2c	A	PSE-1, CARB-3	Enzimas que hidrolisam penicilinas e carbenicilina, inibidas por ácido clavulânico.
2d	D	OXA-1, OXA-10	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina, levemente inibidas por ácido clavulânico.
2de	D	OXA-11, OXA-15	Hidrólise de penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, pouco inibidas por ácido clavulânico.
2df	D	OXA-23, OXA-48	Hidrolisam carbapenemas e cloxacilina, pouco inibidas por ácido clavulânico.
2e	A	CepA	Cefalosporinas inibidas por ácido clavulânico e tazobactam, mas não por aztreonam.
2f	A	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2	Enzimas que hidrolisam carbapenemas e possuem uma serina no seu sítio ativo. Tais enzimas são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
3a	B	IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1	Hidrólise de todos os beta-lactâmicos exceto monobactâmicos. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
3b	B	CphA, Sfh-1	Hidrólise preferencial de carbapenemas. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.

### 1.8.2 $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL)

As  $\beta$ -lactamases de espectro estendido são enzimas das classes moleculares A ou D, ou dos grupos funcionais 2be ou 2d com capacidade de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração e oximino-monobactâmicos. São inativadas por compostos como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (79). No início da década de 1980, as cefalosporinas de 3ª geração foram amplamente utilizadas, gerando, portanto, alta pressão seletiva, resultando na resistência a esses antibióticos. Mutações em genes como *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>TEM-2</sub> e *bla*<sub>SHV-1</sub> promoveram amplificação e divergência nesses genes e seus produtos, as enzimas, passaram a conferir espectro de hidrólise estendido às cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações (chamadas de cefalosporinas de “amplo espectro” ou “espectro estendido”), sendo então denominadas de ESBL, ou seja, beta-lactamases de espectro estendido (*Extended Spectrum Beta-Lactamases*) (46).

Mais tarde a presença de ESBLs foi associada a grandes surtos de infecções causadas por *E. coli* e *K. pneumoniae*, na Europa e nos Estados Unidos. Foi também relatada a ocorrência de ESBL com menos frequência em: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* (77). Com o aumento de amostras produtoras de ESBLs, os antibióticos carbapenêmicos começaram a ser altamente utilizados na clínica devido ao seu espectro de ação mais elevado e maior estabilidade frente as ESBLs. Logo em resposta ao aumento da utilização deste antimicrobiano surgiram isolados apresentando carbapenemases.

### 1.8.3 Carbapenemases

As carbapenemases são um grupo de enzimas com capacidade de hidrolisar a maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos como penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas. Essas enzimas são classificadas nas classes moleculares A (serino carbapenemases, por exemplo, KPC e GES), B (metallo-carbapenemase, por exemplo, IMP, VIM e NDM) e D (oxacilinas, por exemplo, OXA-48) (80).

Serino carbapenemases compõem uma família de beta-lactamases emergentes pertencentes ao grupo funcional 2f classe A. Este grupo possui capacidade de hidrolisar a maioria dos antibióticos beta-lactâmicos, incluindo carbapenêmicos que são geralmente estáveis à hidrólise por todas as outras beta-lactamases (77). Além destas, as metalo- $\beta$ -lactamases pertencentes ao grupo funcional 3 e classe molecular B, compõem outra família de carbapenemases.

As metalo-beta-lactamases, até então, eram responsáveis pela resistência a carbapenêmicos em organismos como *Stenotrophomonas maltophilia* e *Aeromonas* spp. Contudo em 1990, a identificação de IMP-1, uma MBL codificada em plasmídeo tornou-se um problema clínico no sul da Europa, no Japão, no Brasil e Ásia. Outra enzima pertencente a essa família é a VIM; estas enzimas foram identificadas primeiramente em *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Atualmente encontram-se difundidas entre os demais membros da família Enterobacteriaceae. Já as oxacilinas foram definidas inicialmente pela sua capacidade de hidrólise relacionada à oxacilina e cloxacilina mas foi identificado um subgrupo OXA atuando na diminuição da suscetibilidade a carbapenemas em bactérias não fermentadoras como *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (77).

#### 1.8.4 Glicopeptídeos

Esta classe atua na síntese da parede celular bacteriana. A vancomicina, por exemplo, é um dos principais antibióticos dessa classe e é eficaz em bactérias Gram-positivas. Ela se liga à parede celular bacteriana, formando ligações de hidrogênio com D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala), o motivo peptídico C-terminal do precursor de peptidoglicano. A fim de contornar o impacto deletério da vancomicina, o mecanismo de resistência é a substituição da D-alanina terminal do peptidoglicano precursor, pelo D-lactato, e assim, o local de ligação regular da vancomicina é modificado, resultando em uma menor afinidade de ligação com o antibiótico, ou seja, menos ligações de hidrogênio são formadas entre a vancomicina e o precursor. Algumas cepas resistentes expressam um D-alanil-D-serina (D-Ala-D-Ser) que se acredita exercer um impedimento estérico. Em geral, a resistência aos glicopeptídeos pode ser codificada por seis tipos de genes *van*: *van A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *L*, *M* e *N*. Enquanto que *van A*, *B* e *D* usam o precursor D-Ala-D-Lac para evitar o efeito da vancomicina e *van C*, *E* e *G* fazem uso do D-Ala-D-Ser C-terminal alternativo. As resistências *van A* e *B* mais relevantes no uso clínico diferem principalmente em sua suscetibilidade à teicoplanina. o gene *vanA* confere resistência a altos níveis de vancomicina enquanto o gene *vanB*, pode resultar em uma faixa ampla de Concentrações Mínimas Inibitórias, correspondendo desde sensibilidade até resistência a altos níveis de vancomicina (81) (82).

### 1.9 Multirresistência

Magiorakos et al., (2012) (83) propõe uma classificação para os perfis de resistência a fim de uniformizar a terminologia pelos laboratórios de microbiologia clínica, de referência e de saúde pública e facilitar o entendimento da epidemiologia da resistência. Essa padronização tem o intuito de tornar os dados comparáveis e rastreáveis com segurança, além de se inferir as tendências de resistência antimicrobiana local e internacional. É importante observar que essas definições se destinam apenas ao uso em saúde pública e propósitos epidemiológicos. Eles não têm como objetivo substituir o julgamento clínico, contribuir para a tomada de decisões terapêuticas ou oferecer orientação nas práticas de controle de infecção. 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. Desta forma criou-se as siglas: MDR, XDR e PDR:

cepas multirresistentes (*multidrug-resistant*, MDR) - não suscetíveis a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas.

cepas extensivamente resistentes (*extensively drug-resistant*, XDR) - não suscetíveis a pelo menos um agente em todas, exceto duas ou menos categorias antimicrobianas.

cepas pan-resistentes (*pandrug-resistant*, PDR) - não suscetíveis a todos os agentes, em todas as categorias antimicrobianas.

## **1.10 Métodos de identificação bacteriana**

### **1.10.1 Métodos fenotípicos**

Os métodos de identificação bacteriana baseiam-se em princípios de identificação tradicionais, através de características fenotípicas clássicas de identificação que compreendem categorias do tipo morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, por exemplo. Alguns métodos fenotípicos tradicionais envolvem meios de determinação como: morfologia celular, coloração de Gram, reações bioquímicas como catalase, coagulase, oxidase, entre várias outras ligadas ao metabolismo, como padrões de utilização de fontes de carbono. A Tabela 3 mostra algumas características fenotípicas usadas na identificação de microrganismos (84).

**Tabela 3:** Características fenotípicas que podem ser empregadas na identificação microbiana.

<b>Categorias</b>	<b>Características</b>
Cultura	Morfologia da colônia, cor e tamanho da colônia, produção de pigmentos
Morfológicas	Morfologia celular, tamanho das células, tipo de flagelos, material de reserva, reação tintorial nas colorações de Gram, Zielh-Nielsen e presença ou não de esporos
Fisiológicas	Tolerância ao oxigênio, faixa de pH, temperatura ótima de crescimento e halófilas
Bioquímicas	Utilização de fontes de carbono, oxidação ou fermentação de carboidratos, padrões de enzimas
Sorológicas	Aglutinação
Inibição	Biletolerância, resistência a antibióticos
Quimiotaxonômica	Perfis de ácidos graxos, toxinas e toda composição celular

**Fonte:** Adaptado de (Sutton e Cundell, 2004).

Mais recentemente, métodos quimiotaxômicos, como a espectrometria de massa (*Mass Spectrometry* - MS), têm sido usados na identificação de microrganismos. Essa metodologia produz resultados em menor tempo e custo, além de aumentar a produtividade e eficiência (85) (86).

### **1.10.2 MALDI-TOF MS**

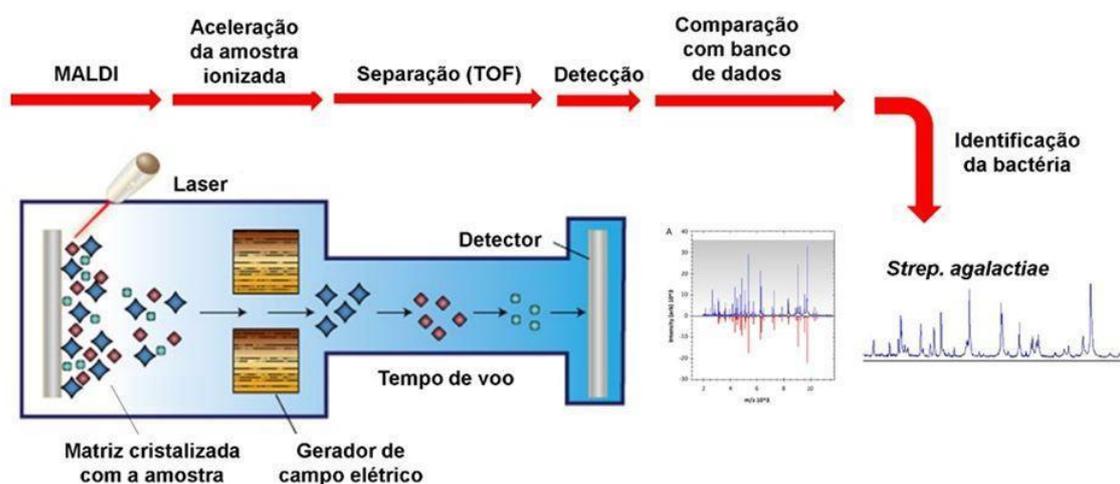
A técnica de “dissorção/ionização a laser assistida por matriz” (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization*), é uma técnica de espectrometria de massa para identificação dos componentes químicos presentes numa amostra. Essa técnica tem sido bastante utilizada para identificação de biomoléculas. Um espectrômetro de massa moderno consiste em três módulos (86): a fonte ionizante, o analisador de massas e o detector. Já o seu funcionamento segue os seguintes passos, como exemplificado na Figura 5: a vaporização de uma amostra no espectrômetro de massa; ionização da amostra e formação de partículas carregadas positivamente; aceleração dessas partículas em campo magnético; computação da

relação massa-carga; detecção de íons. Este tipo de espectrometria utiliza a dissorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI) como forma de ionização e o tempo de voo (TOF, do inglês, *time offlight*) como separador de massas e cargas (87) (88).

Desenvolvida no final dos anos 1980 com sensibilidade relativamente alta para vários tipos de amostras, a aplicação do MALDI-TOF MS é uma ferramenta útil, rápida e precisa para análises laboratoriais de rotina e tem sido usada para identificação microbiana, caracterização e tipagem.

A identificação precisa e rápida de bactérias é fundamental para tratamentos antimicrobianos, sendo imprescindível tanto na questão da acurácia quanto na agilidade de detecção (89). Porém, apesar de seu uso substituir outras práticas já existentes no diagnóstico clínico, a sua aplicabilidade na área de pesquisa em ecologia microbiana ainda é limitada, principalmente na falta de dados sobre microrganismos não clínicos. Por isso a confiabilidade do método depende da precisão e tamanho do banco de dados de referência. Além da expansão e aprimoramento constantes, necessários para que as correlações feitas entre posições e intensidades dos picos entre os espectros das amostras e daqueles que estão no banco de dados sejam usados para gerar uma pontuação que represente de fato um nível de confiança. Quando os picos se destacam na mesma posição é possível criar uma assinatura proteômica que ajuda na identificação das amostras. O padrão espectral que é característico na análise é o que permite criar a assinatura desses microrganismos (85) (90) (91).

Alguns testes em comparação ao MALDI-TOF MS representam não somente um maior gasto de tempo, mas de reagentes e material biológico.



**Figura 5:** Funcionamento do MALDI-TOF (Fonte:“Conhecendo a técnica de MALDI-TOF MS para a identificação de bactérias causadoras de mastite”).

### 1.11 Métodos genotípicos

A tipagem molecular ou genotipagem é usada para discriminar as cepas bacterianas da mesma espécie, sendo uma ferramenta capaz de investigar surtos e realizar vigilância. Dentre os primeiros experimentos de tipagem, os bioquímicos foram realizados e seus resultados foram baseados no fenótipo das bactérias testadas, na sua resistência a antibióticos e na sorotipagem (92). Porém, com o advento da biologia molecular, a tipagem baseada em DNA, novos métodos como Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE do inglês *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) e aqueles baseados na Reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*). como DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD do inglês "random amplified polymorphic DNA"), Consenso intergênico repetitivo de enterobactérias (ERIC-PCR do inglês *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), Elementos repetitivos utilizados para a análise molecular (BOX-PCR), Tipagem de Sequência Multilocos (MLST do inglês *Multi Locus Sequence Typing*), Mini-satélites ou repetição em tandem de número variável (VNTR do inglês *Variable number of tandem repeats*), entre outros, ganharam notoriedade, com resultados reprodutíveis devido à natureza estável do DNA. Os métodos genotípicos, na bacteriologia, detectam polimorfismos ao nível dos ácidos nucleicos, distinguindo seus diferentes clones.

Dentre as principais ferramentas, inclui-se a PCR. Esta ferramenta, muito difundida e com diferentes aplicabilidades, é muito utilizada na tipagem molecular através de suas diferentes variáveis. Basicamente a PCR consiste na multiplicação de um trecho específico do DNA utilizando desoxinucleotídeos como monômeros até um ponto em que sua concentração em dada solução seja tão alta que possa ser facilmente detectável por métodos simples e clássicos de separação e identificação de substâncias. Portanto, a técnica tenta resolver a dificuldade que é a análise de ácidos nucleicos devido a sua baixa quantidade na maioria dos tecidos vivos. A multiplicação destes trechos específicos se dá alternando-se a temperatura de ensaio entre a denaturação das cadeias do DNA genômico, que varia dependendo da etapa da PCR, o anelamento dos iniciadores que são usados para delimitar a sequência a ser amplificada, a temperatura ótima específica da enzima: 72 °C e o reinício do ciclo.

Em resumo, o processo ocorre após a desnaturação das fitas-molde (pareamento dos iniciadores), e a enzima adiciona os desoxinucleotídeos complementarmente às fitas-mãe. As fitas-filha são complementarmente após o pareamento das fitas-mãe, que serão sintetizadas a partir da adição dos desoxinucleotídeos pela DNA polimerase, sendo a *Taq* o reagente mais utilizado e sua concentração varia de 0.5 a 4U por microlitro de solução. Normalmente, a maioria das DNA polimerases disponíveis no mercado são fornecidas conjuntamente com uma solução-tampão específica, cuja composição varia de acordo com o fabricante. Basicamente, estas soluções contêm íons diversos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ , entre outros) que otimizam as condições de reação. Alguns tampões contêm ainda detergentes que inibem a formação de dímeros das cadeias enzimáticas, proteínas e algumas substâncias que agem na denaturação da cadeia molde para quebrar as pontes de hidrogênio entre as bases. Um reagente de importância crítica é o  $\text{MgCl}_2$ , doador muito estável de íons  $\text{Mg}^{2+}$ , que são cofatores indispensáveis para atividade da enzima. Os desoxinucleotídeos (dNTPs) são a matéria-prima propriamente dita para a síntese das fitas-filhas e são compostos por nucleotídeos (ATP, TTP, CTP, GTP) desoxilados no carbono 5' da desoxirribose. Os dNTPs são adicionados pela polimerase complementarmente à fita-mãe. Adiciona-se uma mistura de todos os dNTP's em concentrações iguais à reação. Os dNTP's são ligados à fita-mãe pela polimerase numa área delimitada pelos primers, que são pequenas sequências de DNA (12 a 35 bases) complementarmente às bordas (93) (94).

A Biologia Molecular pode ainda ser aplicada a estudos ao nível da sistemática e filogenia e nesses casos se utiliza a hibridização DNA:DNA, o sequenciamento do 16S rRNA e o WGS (Sequenciamento do Genoma Completo, do inglês "*Whole Genome Sequencing*").

O sequenciamento do gene 16S rRNA (RNA ribossomal porção 16S), parte integrante da subunidade 30S do ribossomo dos procariotos, vem sendo utilizado na taxonomia e filogenia bacteriana devido as características deste gene: baixa variabilidade, está presente em todas as espécies bacterianas e possui um tamanho suficientemente longo (1500 pb) (95). A maioria das novas tecnologias utilizadas no estudo da ecologia microbiana é baseada na filogenia molecular do rRNA. A sequência do gene 16S rRNA é a mais utilizada como marcador filogenético na ecologia devido a alta conservação presente na sequência o que possibilita uma

estimativa da distância filogenética, por isso o seu uso é comum para a identificação de gênero e espécie para isolados de difícil identificação ou de difícil cultivo em laboratório. Os amplicons obtidos através da região 16S rDNA são sequenciados e analisados usando um banco de dados onde estão depositadas sequências do gene 16S rRNA por meio de programas apropriados. A sequência 16S rRNA apresenta nível de resolução taxonômico, viável para a classificação das bactérias que não são identificadas pelos métodos bioquímicos convencionais e possuem dificuldade em diferenciar e classificar quanto às subespécies (91)(96). É um método muitas vezes aplicado em associação a outros como o próprio MALDI-TOF MS (97) (98).

Outra ferramenta é o WGS, que devido aos custos decrescentes tem tornado possível a avaliação do genoma bacteriano em sua totalidade a custos mais acessíveis em um curto espaço de tempo (99). Porém, o uso extensivo da tecnologia WGS em aplicações como detecção e rastreamento de surto, por exemplo, tem-se tornado cada vez mais comum, mas não chega a ser o método mais recomendado para detectar resistência antimicrobiana, pois a presença do gene de resistência pode não significar a sua expressão (100).

A Hibridização do DNA total (DNA:DNA) determina o grau de semelhança genética entre combinações de sequências de DNA. Esta técnica é um método que fornece maior resolução do que o sequenciamento do 16S rDNA, e o critério de 70% tem sido a base para a descrição de uma espécie bacteriana (101).

A Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE do inglês *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) é considerada a “abordagem molecular de terceira geração” para tipagem de bactérias (102). Ocorre em gel de agarose e tem como finalidade a separação do DNA em fragmentos (macrorestrição). Busca-se principalmente tipar, rastrear e comparar cepas da mesma espécie, de onde poder-se-á estabelecer se estão ou não envolvidas em surtos ou terem sua dispersão monitorada. É uma técnica dependente do tamanho molecular de cada fragmento restrito que tem como base a reorientação periódica pulsada de campos eletroforéticos em um gel de agarose. Como os genomas bacterianos têm um tamanho de 2–4 Mbp, a eletroforese de campo pulsado permite uma separação mais clara de fragmentos de DNA de vários tamanhos (de kb a Mb), o que não seria possível num gel em uma cuba de orientação única. A técnica já foi considerada o "padrão ouro" para tipagem

de bactérias e vários protocolos de PFGE foram desenvolvidos para a tipagem de diferentes espécies, tornando-o um dos métodos mais amplamente utilizados para estudos de vigilância de segurança alimentar, controle de infecção e investigação de surtos (103).

Por fim, outra técnica que vale destaque é a Tipagem De Sequência Multilocos (MLST do inglês *Multi Locus Sequence Typing*), que foi desenvolvida há duas décadas como um método molecular para fornecer a caracterização definitiva de um isolado bacteriano e tem emergido como uma ferramenta poderosa para a genotipagem de espécies bacterianas específicas. O MLST utiliza fragmentos internos de vários genes constitutivos e a combinação de cada alelo define o tipo de sequência (ST) para cada isolado. O método padrão para investigar surtos hospitalares de curto prazo ainda é PFGE, porém a análise de STs e complexos clonais (CC) (STs intimamente relacionados) permite a identificação e compreensão de um clone específico (104) (108). O método é adotado atualmente como uma ferramenta universal de tipagem molecular detalhada e tem sido aplicado a numerosos microrganismos (105).

## **Justificativa**

No Brasil e no mundo já foram detectados genes de resistência dentro e fora do ambiente hospitalar. Entretanto, a pesquisa sobre bactérias resistentes a antibióticos isoladas a partir de moscas, realizada em outros países, é deficiente em nosso país. Por isso, é de fundamental importância a melhor compreensão da resistência bacteriana e os principais mecanismos dessa disseminação, inclusive com o entendimento do papel dos dípteros muscóides como insetos que se destacam como transportadores e reservatórios dessas bactérias.

Este estudo contribui com a formação de uma coleção de bactérias resistentes isoladas a partir de moscas coletadas em ambiente hospitalar e não hospitalar, que está em andamento no Laboratório de Entomologia Médica e Forense (Lemef) do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ e que é de suma importância para a pesquisa e estudos futuros.

Nosso país ainda é carente no setor de desenvolvimento de políticas públicas de saúde ligadas ao controle de insetos e melhorias em projetos de saneamento

básico, o que implica no desenvolvimento de ambientes propícios para a multiplicação destes insetos e consequente transmissão de patógenos.

As bactérias multirresistentes não são somente um problema restrito ao ambiente hospitalar, pois são encontradas também em outros locais, podendo estar intimamente relacionadas ao intenso consumo de antimicrobianos ao longo dos anos em escala global. Além desse conjunto de fatores, os insetos, principalmente as moscas, apresentam características de sucesso como importantes vetores mecânicos e isso pode agravar a problemática da disseminação dessa resistência na comunidade. Os resultados deste estudo contribuem com o Plano de Ação Global que busca combater a Resistência Antimicrobiana. Entender a relação entre a disseminação das bactérias resistentes e seu transporte por dípteros muscóides é importante para compreender suas interações e o desenvolvimento dos mecanismos de resistência que ocorrem, principalmente, em ambientes não hospitalares.

# OBJETIVOS

## Objetivo Geral

Verificar a diversidade de espécies bacterianas resistentes a antimicrobianos de importância clínica, isoladas a partir de dípteros muscoides em Jacarepaguá, numa área próxima a fábrica de carne de aves.

## Objetivos Específicos

1. Coletar dípteros muscoides em Jacarepaguá (22°57'4.48''S 43°20'48.41''W);
2. Identificar os dípteros muscoides coletados;
3. Identificar as amostras bacterianas isoladas a partir de dípteros muscoides por MALDI-TOF MS;
4. Verificar o perfil de susceptibilidade das amostras isoladas através do método de difusão em ágar;
5. Detectar cepas de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE), através do meio *CHROMagar™ VRE*;
6. Investigar determinantes genéticos de resistência por PCR.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Coleta e identificação de dípteros muscoides

As coletas dos dípteros muscoides foram realizadas no período de julho de 2018 em Jacarepaguá, em local próximo a uma fábrica de carne de aves (22°57'4.48''S 43°20'48.41''W) no Rio de Janeiro. As coletas foram realizadas com armadilha confeccionada a partir de garrafa plástica (Figura 6) contendo isca atrativa (carne bovina putrefata, com mais de 24 h de decomposição em temperatura ambiente) em seu interior. A garrafa plástica é pintada de preto para evitar a passagem de luz, uma vez que dípteros possuem fototaxia positiva. São também feitos pequenos cortes na parte lateral pois estes permitem a entrada dos insetos e, na parte superior, um saco plástico transparente é amarrado para imobilização dos dípteros. Os insetos foram transportados vivos até o LEMEF, anestesiados em *freezer* com temperatura -20 °C e identificados com auxílio de microscópios de campo claro e estereoscópicos, através de chaves dicotômicas (106).



**Figura 6:** Garrafa plástica para coleta de dípteros e garrafa posionada em local próximo a fábrica de carnes. Fonte: LEMEF.

### 3.2 Isolamento de bactérias e estocagem

Após a identificação, as moscas foram maceradas em PBS, com o auxílio de pistilos estéreis e descartáveis. Os macerados foram diluídos até  $10^{-4}$  e plaqueados em meio Ágar Nutriente (AN) (Merck - Darmstadt, Alemanha) sem antimicrobiano e, paralelamente, foram plaqueados no mesmo meio contendo ceftriaxona (1 mg/L)

com incubação a 30 e 37 °C. Crescimento em meio adicionado de ceftriaxona na concentração 1mg/mL é eficiente no isolamento seletivo de bactérias resistentes em amostras ambientais por ser uma cefalosporina de terceira geração, de característica importante no cenário clínico, porém não muito restritivo ao crescimento de determinadas bactérias. Representantes das diferentes colônias foram subcultivados no mesmo meio para obtenção de culturas puras. As diferentes colônias isoladas a partir do meio (AN) com ceftriaxona foram purificadas no respectivo meio e estocadas em caldo BHI, do inglês "*Brain Heart Infusion*" (Merck - Darmstadt, Alemanha) com 20% de glicerol (Sigma) a -20 °C na coleção de bactérias do LEMEF.

### **3.3 Coloração de Gram**

A coloração de Gram foi realizada em todos os isolados estocados, provindos das diferentes colônias obtidas a partir do macerado dos insetos (107). Realizou-se o esfregaço a partir da suspensão de colônias bacterianas crescidas em Ágar Nutriente (AN), em salina estéril. Após secar, o esfregaço foi fixado com auxílio da chama do bico de Bunsen. Após a fixação, foi corado com cristal violeta por 1 minuto, seguido de lavagem em água. Em seguida, foi aplicado lugol 1%, como fixador do corante anterior, durante 1 minuto, seguido novamente de lavagem com água. O próximo passo foi a aplicação rápida de álcool para descorar o esfregaço, seguida de lavagem em água. Finalmente, como contra corante, a fucsina fenicada foi aplicada por 30 segundos, mais uma vez seguida de lavagem com água. Após o esfregaço corado secar, foi levado ao microscópio de luz para observação em objetiva de imersão (100X).

### **3.4 Identificação bacteriana por MALDI-TOF MS**

A identificação por espectrofotometria de massa foi realizada por MALDI-TOF MS no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM), no Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, na UFRJ. A partir de culturas bacterianas puras, aproximadamente  $10^5$  células microbianas foram depositadas em pequenos poços na placa amostral que é fornecida pelo próprio fabricante do equipamento MALDI-TOF *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. Depois de uma breve secagem adicionou-se 1 µL da matriz composta por ácido  $\alpha$ -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 $\alpha$ , processada da mesma maneira conforme as amostras teste. Após secagem da mistura e formação dos cristais, a placa metálica foi inserida no aparelho. A metodologia direta de análise dos resultados de identificação foi feita de acordo com os scores empregados pelo equipamento: (\*) significa identificação ao nível provável de gênero com pontuações entre 1,7 - 2,0; (\*\*) significa certeza de gênero e possível espécie, com pontuações entre 2,0 - 2,3; (\*\*\*) significa identificação confiável, com pontuações acima de 2.3.

### **3.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos por disco difusão (Kirby-Bauer, 1966)**

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) foi realizado através da difusão do antibiótico em Ágar Muller-Hinton (AMH) seguindo-se as recomendações do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCast), 2019 e do CLSI, 2019.

Os antibióticos utilizados para ambas as bactérias Gram positivas e negativas foram: cloranfenicol (30  $\mu$ g), ciprofloxacina (5  $\mu$ g), cefoxitina (30  $\mu$ g) e sulfametoxazol-trimetoprim (23,75/1,25 $\mu$ g). Para as Gram negativas foram testados os discos de cefepima (30  $\mu$ g), ceftazidima (30  $\mu$ g), imipenem (10 $\mu$ g), ertapenem (10 $\mu$ g), meropenem (10 $\mu$ g). Como controles do teste foram utilizadas as amostras *Escherichia coli* ATCC 25922 e *E.coli* ATCC 35218 (para combinações de  $\beta$ -lactâmicos com inibidor de  $\beta$ -lactamase). No caso de Gram-positivas, os antibióticos utilizados foram vancomicina (30  $\mu$ g), teicoplanina (30  $\mu$ g), gentamicina (10 $\mu$ g), tetraciclina (30  $\mu$ g) e como controle *E. faecalis* ATCC29212.

Após o crescimento bacteriano em placa por 24 horas, uma suspensão em solução salina foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland. Com auxílio de "swab", a suspensão bacteriana foi inoculada em toda a superfície da placa com ágar Mueller-Hinton em três diferentes direções. Após essa distribuição uniforme do inóculo, as placas ficaram entreabertas para leve secagem. Logo depois, um conjunto de discos de antimicrobianos foi aplicado com auxílio de pinça. Depois da aplicação, as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 35 °C durante 18 horas.

A leitura do diâmetro dos halos de inibição foi realizada em milímetros utilizando-se uma régua e classificando os microrganismos de acordo com a

formação e tamanho dos halos segundo os parâmetros do BrCast e CLSI. As amostras que apresentaram perfil de resistência a pelo menos um antimicrobiano foram submetidas a extração de DNA e subsequente PCR para investigação da presença de genes de resistência.

### **3.6 Semeadura em meio *CHROMagar™ VRE***

Para o isolamento de possíveis amostras de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) foi utilizado o meio *CHROMagar™ VRE*. Esse meio é seletivo para VRE e cromogênico. As colônias de *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes a vancomicina crescem nesse meio e apresentam coloração lilás.

### **3.7 Detecção molecular dos genes de resistência**

#### **3.7.1 Extração de DNA**

Para a extração do DNA foi utilizado o *Kit* Promega (*Wizard SV Genomic DNA Purification System*. Ref: A 2361). 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 Eppendorf 1,5 mL. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 150 µL de tampão de lise (fornecido pelo fabricante) 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 à 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. Adicionou-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 Eppendorf 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  $\mu\text{L}$  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* - Massachusetts, U.S), e armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A seguir, 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.

### 3.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após a obtenção do DNA, este foi diluído para concentração de 5 ng/ $\mu\text{L}$  a fim de ser utilizado na PCR convencional com um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . As concentrações finais dos reagentes para a PCR foram as mesmas descritas na Tabela 4.

**Tabela 4:** Reagentes utilizados na PCR e suas respectivas concentrações finais na reação

Reagente	Concentração final	Quantidade em $\mu\text{L}$
Primer F	10 pmoles	2 $\mu\text{L}$
Primer R	10 pmoles	2 $\mu\text{L}$
Tampão 10X	10X	2,5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> 5X	25 mM	2,5 $\mu\text{L}$
dNTP (Cellco)	2 mM	0,5 $\mu\text{L}$
Taq Platinum (Invitrogen)	1U/ $\mu\text{L}$	0,125 $\mu\text{L}$
Água Milli-Q (Invitrogen)	q.s.p	12,875 $\mu\text{L}$
DNA total	2,5 ng	2,5 $\mu\text{L}$

As reações de PCR foram realizadas no termociclador GeneAmp™ PCR System 9700 (*Thermo Fisher Scientific*) para amplificação dos genes utilizando temperaturas de anelamento e número de ciclos específicos cujas referências estão apontadas na Tabela 6. Algumas dessas reações foram multiplex e o critério para a escolha das amostras levou em conta os resultados dos testes de sensibilidade.

A pesquisa foi feita para os genes de resistência plasmidial à colistina (*mcr-1* e *mcr-2*), genes codificadores de  $\beta$ -lactamases (*bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SPM</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>SIM</sub>*, *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>OXA-143</sub>*), gene codificador de enzima modificadora de aminoglicosídeo (*aac(6)-Ib*) e para a detecção de genes de resistência à vancomicina, em *Enterococcus* sp. foram feitas

PCRs para os genes *van A*, *van B*, *van C1* e *C2*. Os iniciadores utilizados estão descritos na literatura e encontram-se exemplificados na Tabela 5. Os controles positivos correspondentes a cada gene foram utilizados para padronização das reações e estão descritos na Tabela 6. O controle para o gene *van* faz parte do estoque do laboratório, nomeado como cepa 7366 e tem origem hospitalar.

**Tabela 5:** *Primers* utilizados para amplificação dos genes de resistência, respectivo produto gerado em pares de bases e referência

<b>Gene</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Tamanho do Produto</b>	<b>Referência</b>
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	IMP-F: TTGACACTCCATTTACDG	139 pb	Dallene et al. 2010
	IMP-R: GATYGAGAATTAAGCCACYCT		
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	NDM-F: GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621 pb	Poirel et al. 2011
	NDM-R: CGGAATGGCTCATCACGATC		
<i>bla<sub>SPM</sub></i>	SPM-F: CGGATCATGTCGACTTGCCCTAC	513 pb	Carramaschi et al. 2019
	SPM-R: CGACGACATTATCGGGCGAGTG		
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	VIM-F: GATGGTGTGGTTCGCATA	390 pb	Dallene et al. 2010
	VIM-R: CGAATGCGCAGCACCAG		
<i>bla<sub>OXA-23</sub></i>	OXA-23-F: TGACACCAGCGTAGGGCTT	402 pb	Carramaschi et al. 2019
	OXA-23-R: GCTCATCCAGAAGCGTCCGG		
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	OXA-48-F: GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438 pb	Poirel et al. 2011
	OXA-48-R: CATCAAGTTCAACCCAACCG		
<i>bla<sub>OXA-143</sub></i>	OXA-143-F: TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	149 pb	Higgins et al. 2010
	OXA-143-R: TAATCTTGAGGGGGCCAACC		
<i>bla<sub>GIM</sub></i>	GIM-F: TCGACACACCTTGGTCTGAA	477 pb	Poirel et al. 2011
	GIM-R: AACTTCCAACCTTGGCCATGC		
<i>bla<sub>SIM</sub></i>	SIM-F: TACAAGGGATTTCGGCATCG	570 pb	Poirel et al. 2011
	SIM-R: TAATGGCCTGTTCCCATGTG		
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	KPC-F: CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798 pb	Poirel et al. 2011
	KPC-R: CTTGTCATCCTTGTAGGCG		
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	TEM-F: CATTTCGGTGTGCCCCTTATTC	800 pb	Dallene et al. 2010
	TEM-R: CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	SHV-F: AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713 pb	Dallene et al. 2010
	SHV-R: ATCCCGCAGATAAATCACCAC		

<i>bla</i> <sub>CTX-MU</sub>	CTX-MU1-F: ATGTGCAGYACCAGTAARGT	593 pb	Pagani et al. 2003
	CTX-MU2-R: TGGGTRAARTARGTSACCAGA		
<i>bla</i> <sub>GES</sub>	GES1A-F: ATGCGCTTCATTACGCAC	860 pb	Poirel et al. 2000
	GES1B-R: CTATTTGTCCGTGCTCAGG		
<i>aac(6')</i> - <i>lb</i>	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> -F: TTGCGATGCTCTATGAGTGG	482 pb	Warburg et al. 2012
	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> -R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
<i>mcr-1</i>	MCR1-F: CGGTCAGTCCGTTTGTTT	309 pb	Liu et al. 2016
	MCR1-R: CTTGGTCCGGTCTGTAGGG		
<i>mcr-2</i>	MCR2-F: TGGTACAGCCCCTTTATT	567 pb	Xavier et al. 2016
	MCR2-R: GCTTGAGATTGGGTTATGA		
<i>vanA</i>	VanA-F: GGGAAAACGACAATTGC	732 pb	Dutka-Malen et al. 1995
	VanA-R: GTACAATGCGGCCGTTA		
<i>vanB</i>	VanB-F: ATGGGAAGCCGATAGTC	635 pb	Dutka-Malen et al. 1995
	VanB-R: 2GATTTTCGTTCTCGACC		
<i>vanC</i>	VanC-F: GGTATCAAGGAAACCTC	822 pb	Dutka-Malen et al. 1995
	VanC-R: CTTCCGCCATCATAGCT		

Após amplificação da região alvo, os produtos de PCR gerados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose (*Thermo Scientific*) a 1% em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) a concentração de 0,4X. A corrida eletroforética foi realizada sob corrente de 80 Volts em cuba com tamanho de 19 cm de um eletrodo a outro por tempo variável de acordo com o produto: 20 minutos (para os genes *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub>), 30 minutos (para os genes *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>), 35 minutos (para o gene *bla*<sub>NDM</sub>), 40 minutos (para o gene *van*) e 50 minutos (para os genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>) além de dispor do mais longo tempo de corrida esses dois últimos genes também são aplicados em gel de agarose mais concentrada 1,5% para uma melhor separação das bandas de DNA no gel e para facilitar a análise pois ambos possuem tamanhos semelhantes. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5g/L) por 15min, descorado em água pura por 15min, observado sob luz ultravioleta em transiluminador e fotografado.

**Tabela 6:** Cepas utilizadas como controles positivos para os genes investigados e suas respectivas origens.

<b>Controles positivos (gene)</b>	<b>Espécie bacteriana</b>	<b>Origem</b>
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LAPIH- Fiocruz
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFRJ
<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	INCQS - Fiocruz
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFRJ
<i>bla</i> <sub>OXA-143</sub>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	INCQS Fiocruz
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	INCQS Fiocruz
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFRJ
<i>bla</i> <sub>SIM</sub>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	UFRJ
<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFRJ
<i>bla</i> <sub>GIM</sub>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFRJ
<i>bla</i> <sub>GES (16)</sub>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFRJ
<i>bla</i> <sub>GES (5)</sub>	<i>Enterobacter asburiae</i>	UFRJ
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFRJ
<i>bla</i> <sub>SHV/TEM</sub>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFRJ
<i>mcr-1</i>	<i>Escherichia coli</i>	INCQS Fiocruz
<i>aac6-lb</i>	<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 RESULTADOS

#### 4.1 Coleta e identificação de dípteros muscoides

Ao todo foram coletados 59 dípteros muscoides cuja identificação, realizada por especialista do LEMEF, foi classificada ao nível de família e está demonstrada na Tabela 7.

**Tabela 7:** Família de dípteros e seus respectivos exemplares.

Família	Exemplares
Fanniidae	33
Muscidae	16
Sarcophagidae	6
Psychodidae	2
NI	2

NI: Não identificado

#### 4.2 Morfologia de colônia e contagem de UFC/mL

Após o isolamento, 54 cepas foram numeradas conforme organização da coleção em estoque. Esses dados, bem como as características morfocoloniais estão demonstrados na Tabela 8.

**Tabela 8:** Características morfocoloniais dos isolados bacterianos.

Cepas*	Morfologia de colônia
147	pequena, mucóide, brilhosa, leitosa/transparente, regular
148	pequena, regular, leitosa, branca, brilhosa

149	pequena, clara, leitosa, regular, brilhosa
150	média, rosa escura, centro escuro, borda clara, brilho metálico
151	pequena, rosa escura, centro escuro, borda clara, brilho metálico
152	média, amarela, mucóide, brilhosa, regular
153	média, brilhosa, branca, irregular
154	grande, branca, rugosa, sem brilho
155	média, brilhosa, centro mais denso, borda quase transparente
156	pequena, clara, brilhosa
157	média, rosa escura, centro escuro, borda clara, brilho metálico
158	pequena, rosa escura, centro escuro, borda clara, brilho metálico
159	pequena, rosa clara, brilhosa, centro escuro, borda clara
160	média, bege, brilhosa, mucóide, regular
161	média, bege, brilhosa, mucóide, regular
162	média, rosa escura, centro escuro, borda clara, brilho metálico

163	pequena, rosa escura, centro escuro, borda clara, brilho metálico
164	pequena, rosa clara, brilhosa, centro escuro, borda clara
165	pequena, borda regular, brilhosa, clara, centro mais escuro
166	achatadas, borda irregular, rugosa, amarelada
167	grande, redonda, rugosa, borda irregular
168	grande, esbranquiçada, rugosa, borda irregular clara, centro escuro
169	pequena, regular, leitosa, branca, brilhosa
170	grande, redonda, rugosa, borda irregular
171	grande, branca, centre escuro e liso, borda clara e rugosa, irregular
172	achatadas, borda irregular, rugosa, amarelada
173	achatadas, borda irregular, rugosa, amarelada
174	achatadas, borda irregular, rugosa, amarelada
175	grande, branca, rugosa, sem brilho
176	média, brilhosa, branca, irregular

177	pequena, regular, leitosa, branca, brilhosa
178	média, brilhosa, branca, irregular
179	pequena, regular, leitosa, branca, brilhosa
180	grande, transparente, brilhante, rugosa
181	grande, redonda, rugosa, borda irregular
182	média, branca com centro escuro, borda clara regular
183	pequena, redonda, brilhante, amarela
184	grande, redonda, brilhante, mucóide, centro elevado, borda fina, amarela
185	pequena/regular, fosca, branca, centro destacado e elevado
186	média, transparente, formato irregular, brilhante, mucóide
187	pequena/regular, fosca, branca, centro destacado e elevado
188	média, brilhante, regular, amarela clara
189	pequena, branca, brilhante, regular
190	pequena, clara, borda regular, brilhante

191	pequena, lilas, centro escuro, borda clara,borda regular
192	pequena, roxa, borda regular, brilhante
193	pequena, roxa, borda regular, brilhante
194	pequena, branca, brilhante, regular
195	pequena, lilas, centro escuro, borda clara,borda regular
196	pequena, transparente, redonda, regular
197	pequena, transparente, redonda, regular
198	pequena, transparente, redonda, regular
199	pequena, transparente, redonda, regular
200	pequena, transparente, redonda, regular
201	grande, branca, redonda, fosca, centro destacado, borda riscada
202	pequena, transparente, regular, brilhante
203	pequena, transparente, regular, brilhante
204	pequena, branca, regular, centro escuro, borda clara
205	média, transparente, regular, brilhante

ND: Não determinado; \* Número na coleção de bactérias do LEMEF.

### 4.3. Identificação bacteriana

A partir dos 59 dípteros coletados, foram obtidos 54 isolados bacterianos. Os resultados do Gram (Gram-positivos = 37, 75,5%; Gram-negativos = 12, 24,4%) foram coerentes com os resultados do MALDI-TOF MS. Dentre os isolados bacterianos, 51 foram identificados como: *Acinetobacter bereziniae* (n=1; 1,9%), *Acinetobacter johnsonii* (n=4; 7,8%), *Bacillus cereus* (n=10; 19,6%), *Bacillus simplex* (n=1; 1,9%), *Enterococcus faecalis* (n=19; 37,2%), *Glutamicibacter arilaitensis* (n=1; 1,9%), *Glutamicibacter mysorens* (n=1; 1,9%), *Glutamicibacter protophormia* (n=1; 1,9%), *Hafnia alvei* (n=1; 1,9%), *Lactobacillus sakei* (n=1; 1,9%), *Lactococcus garvieae* (n=1; 1,9%), *Microbacterium* sp. (n=1; 1,9%), *Providencia alcalifaciens* (n=2; 3,9%), *Pseudomonas fulva* (n=1; 1,9%), *Staphylococcus aureus* (n=1; 1,9%), *Staphylococcus epidermidis* (n=2; 3,9%) e *Wautersiella falsenii* (n=2; 3,9%) que estão mostrados na Tabela 9.

Os grupos taxonômicos mais frequentemente isolados foram *Enterococcus faecalis* (19/51; 37,2%), seguido de *Bacillus cereus* (10/51; 19,6%), essas espécies estavam presentes principalmente nas famílias Muscidae e Fanniidae.

**Tabela 9:** Identificação dos dípteros muscoides ao nível de família e dos isolados bacterianos por MALDI-TOF MS.

Isolado <sup>1*</sup>	Família <sup>2</sup>	Identificação <sup>3</sup> MALDI-TOF
147	Fanniidae	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
148	Fanniidae	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
149	Fanniidae	<i>Staphylococcus aureus</i>
150	Fanniidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
151	Fanniidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
152	Fanniidae	<i>Wautersiella falsenii</i>
153	Fanniidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
155	Fanniidae	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
156	Fanniidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
157	Fanniidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
158	Fanniidae	<i>Lactococcus garvieae</i>
159	Fanniidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
160	Fanniidae	<i>Hafnia alvei</i>

162	Fanniidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
165	Fanniidae	<i>Lactobacillus sakei</i>
166	Fanniidae	<i>Bacillus cereus</i>
167	Muscidae	<i>Bacillus cereus</i>
168	Muscidae	<i>Bacillus cereus</i>
169	Muscidae	<i>Pseudomonas fulva</i>
170	Muscidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
171	Muscidae	<i>Bacillus cereus</i>
172	Muscidae	<i>Bacillus cereus</i>
173	Muscidae	<i>Bacillus cereus</i>
174	Muscidae	<i>Bacillus cereus</i>
175	Sarcophagidae	<i>Providencia alcalifaciens</i>
176	Sarcophagidae	<i>Providencia alcalifaciens</i>
177	Sarcophagidae	<i>Hafnia alvei</i>
178	Sarcophagidae	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
179	Sarcophagidae	<i>Wautersiella falsenii</i>
180	Sarcophagidae	<i>Acinetobacter bereziniae</i>
181	Muscidae	<i>Bacillus cereus</i>
182	Muscidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
183	Muscidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
184	Muscidae	<i>Glutamicibacter mysorens</i>
185	Muscidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
186	Muscidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
187	Muscidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
188	Muscidae	<i>Glutamicibacter protophormiae</i>
189	Fanniidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
190	Fanniidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
191	Fanniidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
192	Fanniidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
193	Fanniidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
194	Fanniidae	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
197	NI	<i>Bacillus cereus</i>
198	NI	<i>Bacillus cereus</i>

201	Fanniidae	<i>Bacillus simplex</i>
202	Fanniidae	<i>Enterococcus faecalis</i>
203	Fanniidae	<i>Microbacterium paraoxydans</i>
204	Fanniidae	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
205	Fanniidae	<i>Glutamicibacter arilaitensis</i>

\*1-isolado bacteriano(número na coleção de bactérias do LEMEF), 2-Identificação do díptero ao nível de família, 3-identificação bacteriana por MALDI-TOF MS. \*NI (não identificado).

Dos 54 isolados, 3 destes não puderam ser recuperados, seja por dificuldade no crescimento ou falha na identificação. Dentre os resultados gerados pelo MALDI-TOF MS, 17 cepas foram ranqueadas na fase amarela, cuja confiabilidade se aplica somente ao nível de gênero. As cepas com identificação segura ao nível de gênero (nos dois experimentos realizados) são: 147, 149, 152, 158, 165, 166, 168, 170, 172, 173, 176, 177, 178, 181, 188, 194, 204.

#### **4.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos**

A tabela 10 apresenta que treze dos 51 isolados (25,4%) demonstraram resistência fenotípica a pelo menos um antimicrobiano. Aqui chamamos atenção para *E. faecalis*, isoladas de Fanniidae (cepa 187) e Muscidae (cepa 189) que apresentaram resistência a tetraciclina, cloranfenicol, teicoplanina e ciprofloxacina.

**Tabela 10:** Comparação entre os testes de sensibilidade e PCR para *E. faecalis*.

Cepas§	Díptero	TET	IMP	TEC	VAN	CIP	vanB
150	Fanniidae	24*	28*	18*	18*	20*	+
151	Fanniidae	28*	32*	18*	18*	22*	+
153	Fanniidae	20*	22*	ND	ND	27*	-
156	Fanniidae	26*	ND	16*	16**	16*	-
157	Fanniidae	26*	28*	16*	18*	18*	+
159	Fanniidae	28*	30*	18*	18*	22*	+
162	Fanniidae	30*	28*	18*	18*	22*	-
170	Muscidae	20*	ND	16*	18*	26*	-
182	Muscidae	24*	28*	18*	16**	20*	-
183	Muscidae	26*	30*	16*	18*	20*	-
185	Muscidae	26*	32*	18*	18*	22*	-
186	Muscidae	28*	26*	20*	18*	20*	-
187	Muscidae	10***	ND	5***	ND	7***	-
189	Fanniidae	10***	ND	5***	ND	7***	-
190	Fanniidae	ND	ND	ND	ND	ND	-
191	Fanniidae	ND	ND	ND	ND	ND	-
192	Fanniidae	18**	30*	16*	18*	20*	-
193	Fanniidae	30*	26*	12***	16**	20*	-
202	Fanniidae	ND	ND	ND	ND	ND	-

ND: Não Determinado; TET (Tetraciclina); IMP (Imipenem); TEC (Teicoplanina); VAN (Vancomicina); CIP(Ciprofloxacina); + (Positivo para o gene); - (Negativo para o gene); \* (Susceptível); \*\* (Intermediário); \*\*\* (Resistentes); §(Número na coleção de bactérias do LEMEF).

A Tabela 11 apresenta os resultados do TSA com a medição dos halos definidas em mm. Os resultados não incluem todos os microrganismos isolados, pois a interpretação do halo para algumas espécies não é aplicável, como para *Wautersiella* e *Glutamicibacter*, por exemplo. Além disso, não é possível realizar a leitura de ceftazidima e vancomicina segundo parâmetros do BrCast e sim utilizando os critérios do CLSI, pois as concentrações dos discos pelo BrCast são diferentes. A leitura dos halos de acordo com o CLSI encontram-se no Apêndice I.

**Tabela 11:** Resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, de acordo com o BrCast 2019.

Cepas"	Identificação	TET	IMP	ERT	M E R	FOX	CLOR	GEN	TEC	CIP	TMP- SMX
147	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	NC	16***	NC	ND	NC	NC	ND	NC	18***	20*
148	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	NC	32*	NC	ND	NC	NC	ND	NC	24**	17*
149	<i>Staphylococcus aureus</i>	22*	NC	NC	NC	22*	22*	ND	NC	30*	ND
150	<i>Enterococcus faecalis</i>	24*	28*	NC	NC	ND	NC	ND	18*	20*	NC
151	<i>Enterococcus faecalis</i>	28*	32*	NC	NC	NC	NC	ND	18*	22*	NC
152	<i>Wautersiella falsenii</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
153	<i>Enterococcus faecalis</i>	20*	22*	NC	NC	NC	NC	ND	ND	27*	NC
155	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	NC	12***	ND	ND	ND	NC	ND	NC	23**	15*
156	<i>Enterococcus faecalis</i>	26*	ND	NC	NC	ND	NC	3	16*	16*	NC
157	<i>Enterococcus faecalis</i>	26*	28*	ND	NC	ND	NC	ND	16*	18*	NC

158	<i>Lactococcus garvieae</i>	32*	42*	16*	ND	22*	32*	ND	NC	NC	NC
159	<i>Enterococcus faecalis</i>	28*	30*	NC	NC	ND	NC	ND	18*	22*	NC
160	<i>Hafnia alvei</i>	NC	ND	4***	ND	ND	5***	7***	ND	10***	ND
162	<i>Enterococcus faecalis</i>	30*	28*	NC	NC	ND	24*	ND	18*	22*	NC
165	<i>Lactobacillus sakei</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
166	<i>Bacillus cereus</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
167	<i>Bacillus cereus</i>	ND	ND	ND	ND	14	ND	ND	16	16	12
168	<i>Bacillus cereus</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
169	<i>Pseudomonas fulva</i>	NC	30*	NC	24*	NC	NC	NC	NC	24***	NC
170	<i>Enterococcus faecalis</i>	20*	ND	NC	NC	34*	NC	ND	16*	26*	22*
171	<i>Bacillus cereus</i>	ND	ND	26*	ND	32*	ND	ND	NC	NC	ND
172	<i>Bacillus cereus</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
173	<i>Bacillus cereus</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
174	<i>Bacillus cereus</i>	ND	ND	30*	ND	NC	ND	ND	NC	NC	NC
175	<i>Providencia alcalifaciens</i>	NC	24**	26*	9***	20*	22*	5***	NC	22**	16*
176	<i>Providencia alcalifaciens</i>	NC	ND	26*	16**	18***	26*	8***	NC	22**	18*
177	<i>Hafnia alveii</i>	NC	24*	22***	ND	20*	20*	ND	NC	26*	18*

178	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	NC	ND	NC	5***	ND	NC	6***	NC	9***	ND
179	<i>Wautersiella falsenii</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
180	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	NC	32*	NC	ND	NC	NC	ND	NC	26**	18*
181	<i>Bacillus cereus</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
182	<i>Enterococcus faecalis</i>	24*	28*	NC	NC	ND	NC	ND	18*	20*	28*
183	<i>Enterococcus faecalis</i>	26*	30*	NC	NC	ND	NC	ND	16*	20*	28*
184	<i>Glutamicibacter mysorens</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
185	<i>Enterococcus faecalis</i>	26/*	32*	NC	NC	ND	NC	ND	18*	22*	28*
186	<i>Enterococcus faecalis</i>	28*	26*	NC	NC	ND	NC	ND	20*	20*	28*
187	<i>Enterococcus faecalis</i>	10***	ND	NC	NC	ND	NC	NC	5***	7***	28*
188	<i>Glutamicibacter protophormiae</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
189	<i>Enterococcus faecalis</i>	10***	ND	NC	NC	ND	NC	NC	5***	7***	28*
190	<i>Enterococcus faecalis</i>	ND	ND	NC	NC	ND	NC	ND	ND	ND	ND

191	<i>Enterococcus faecalis</i>	ND	ND	NC	NC	ND	NC	ND	ND	ND	ND
192	<i>Enterococcus faecalis</i>	18**	30*	NC	NC	ND	NC	ND	16*	20*	28*
193	<i>Enterococcus faecalis</i>	30*	26*	NC	NC	ND	NC	ND	12***	20*	26*
194	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5***	NC	NC	NC	ND	8***	4***	NC	10***	ND
197	<i>Bacillus cereus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
198	<i>Bacillus cereus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
201	<i>Bacillus simplex</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
202	<i>Enterococcus faecalis</i>	ND	ND	NC	NC	ND	NC	ND	ND	ND	ND
203	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
204	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ND	ND	NC	NC	ND	ND	ND	NC	ND	ND
205	<i>Glutamicibacter arilaitensis</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

NC: Não Consta no manual do BrCast; ND: Não Determinado; TET (Tetraciclina), IMP (Imipenem), ERT (Ertapenem), MER (Meropenem), CAZ (Ceftazidima), FOX (Cefoxitina), CLOR (Cloranfenicol), GEN (Gentamicina), TEC (Teicoplanina), VAN (Vancomicina), CIP(Ciprofloxacina), TMP-SMX (Sulfametoxazol-trimetoprim); \* (Susceptível); \*\* (Intermediário); \*\*\* (Resistentes); Cepas (Número na coleção de bactérias do LEMEF).

De acordo com os critérios estabelecidos por Magiorakos et al., (2012) (83) 6 (11,7%) isolados foram classificados como MDR, apresentando resistência a pelo menos um antibiótico de 3 ou mais classes de antimicrobianos, sendo identificados como *A. johnsonii* (178), *H. alvei* (160), *S. epidermidis* (194), *P. alcalifaciens* (175) e duas cepas de *E. faecalis* (187 e 189).

#### **4.5 Semeadura em meio CHROMagar VRE**

Todas as amostras identificadas como *E. faecalis* foram semeadas no meio CHROMagar VRE. Embora este meio seja destinado à detecção direta e diferenciação de cepas de *Enterococcus* sp. de importância epidemiológica resistentes à vancomicina, neste trabalho o utilizamos com o objetivo de confirmar a identificação quimiotaxonômica e comparar com a resistência detectada na PCR. Sabe-se que *E. faecalis* e *E. faecium* podem possuir resistência transmissível através dos genes *vanA* e *vanB*, gerando uma coloração rosa a lilás no meio. Nossos resultados indicaram que três cepas (15,7%) (182, 185 e 190) apresentaram crescimento, bem como formaram colônias de coloração lilás, confirmando serem *E. faecalis* VRE.

#### **4.6 Detecção de genes de resistência**

As reações de PCR foram negativas para a maioria dos genes investigados. Entretanto, quatro amostras de *E. faecalis* foram positivas para o gene *vanB*, e uma amostra de *A. johnsonii* para o gene *bla<sub>GIM</sub>*. A Figura 7 demonstra que apenas a cepa controle (7366) de *vanA* (732 bp) apresentou resultado positivo, sendo as outras bandas presentes no gel inespecíficas. A Figura 8 demonstra a amplificação das quatro cepas de *E. faecalis* (150, 151, 157, 159) para o gene *vanB*. A Figura 9 apresenta a amplificação do gene *bla<sub>GIM</sub>* de *A. johnsonii* (cepa 148).

**Figura 7:** Resultado da PCR para o gene *vanA*.



Legenda: Poço 1- Marcador de peso molecular Ludwig 100bp; 2- Cepa 7366 (controle positivo), 3- cepa 150, 4- cepa 151, 5- cepa 153, 6- cepa 156, 7- cepa 157, 8- cepa 159, 9- cepa 162, 10- cepa 170, 11- cepa 185, 12- cepa 186, 13- cepa 187, 14- cepa 189, 15- cepa 190, 16- cepa 191, 17- cepa 192, 18- 193, 19- controle negativo, 20- vazio. Foto: Acervo pessoal.

**Figura 8:** Resultado da PCR para o gene *vanB*.



Legenda: Poço 1- Marcador de peso molecular Ludwig 100bp; 2- Cepa 7366 (controle positivo), 3- cepa 150 (*vanB*+), 4- cepa 151(*vanB*+), 5- cepa 153, 6- cepa 156, 7- cepa 157 (*vanB*+), 8- cepa 159 (*vanB*+), 9- cepa 162, 10- cepa 170, 11- cepa 185, 12- cepa 186, 13- cepa 187, 14- cepa 189, 15- cepa 190, 16- cepa 191, 17- cepa 192, 18- 193, 19- controle negativo, 20- vazio. Foto: Acervo pessoal.

**Figura 9:** Resultado da PCR para o gene *bla*<sub>GIM</sub>.



Legenda: Poço 1- Marcador de peso molecular Invitrogen 100bp, 2- Cepa *P. aeruginosa* - UFRJ (controle positivo de *bla<sub>GIM</sub>*), 3- cepa 147, 4- cepa 148 (*bla<sub>GIM</sub>*+), 5- cepa 152, 6- cepa 155, 7- cepa 169, 8- cepa 175, 9- cepa 176, 10- cepa 179, 11- controle negativo, 12- controle negativo para *bla<sub>OXA-48</sub>*, 13- cepa *Klebsiella pneumoniae* - UFRJ (controle positivo de *bla<sub>OXA-48</sub>*), 14- cepa 147, 15- cepa 148, 16- cepa 152, 17- cepa 155, 18- cepa 169, 19- cepa 175, 20- cepa 176. Foto: Acervo pessoal.

## 4 DISCUSSÃO

As bactérias multirresistentes não são somente um problema restrito ao ambiente hospitalar, pois são também encontradas em outros locais, podendo estar intimamente relacionadas ao intenso consumo de antimicrobianos ao longo dos anos em escala global. Os insetos, principalmente as moscas, são importantes vetores mecânicos que podem contribuir com a disseminação da resistência na comunidade. Fotedar et al., (1992) (58) relatam sobre o transporte *Klebsiella* spp por moscas domésticas (*Musca domestica*) dentro de ala hospitalar e em área urbana. Rahumaet al., (2005) (108) também investiga essa relação fazendo a comparação entre essas duas áreas, incluindo um matadouro. Enquanto que Rahuma et al., (2005) (108) analisam *Pseudomonas* spp. resistentes a pelo menos dez agentes antimicrobianos e dois isolados de *S. aureus*, ambos resistentes à meticilina, e sugerem que moscas domésticas carregam patógenos dos hospitais para as comunidades vizinhas e *vice-versa*. Em nosso estudo, foram isoladas tanto *Pseudomonas* quanto *S. aureus*, porém, entre as amostras de *S. aureus* isoladas não foi verificada resistência pelo método de disco difusão a nenhum dos antibióticos testados. Por outro lado, umas das amostras de *S. epidermidis* (cepa 194), uma espécie que pode causar infecções graves, especialmente em pacientes hospitalizados, apresentou perfil de multirresistência, com resistência à tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina e ciprofloxacino. Em *Pseudomonas* spp., gênero composto por bacilos Gram-negativos não fermentadores, de distribuição ubíqua e grande diversidade foi isolada uma amostra de *P. fulva*. Apesar do isolamento de apenas uma cepa a partir de Muscidae (cepa 169), a presença de um marcador de resistência, ciprofloxacino, foi detectada. Nos últimos anos foram descritas mais de 70 novas espécies, que foram isoladas em diferentes ambientes, incluindo solo, água, sedimentos, ar, animais, plantas, fungos, algas, fontes humanas e animais (109) (110). As infecções causadas por *P. fulva* permanecem sendo uma preocupação rara, mas emergente. É descrito um caso de ventriculite por *Enterobacter cloacae* e *P. fulva* após a colocação de um dreno ventricular externo. Semelhante a outros relatórios, o organismo foi inicialmente identificado incorretamente como *Pseudomonas putida*. A infecção foi tratada com sucesso com levofloxacina (111). Sivolodsky et al., (2014) (112) detectaram a resistência adquirida às cefalosporinas de 3ª geração e ao cloranfenicol em dois isolados de *P.*

*fulva*. Em Uddin et al., (2018) (113) é relatado pela primeira vez um caso de bacteremia devido a *P. fulva* resistente a antimicrobianos.

Andar em superfícies contaminadas faz das moscas um bom vetor para o transporte de bactérias e outros patógenos (13) (15). Além de funcionar como vetores mecânicos, é possível afirmar que estes insetos atuam como vetores biológicos e possuem fundamental importância como sentinelas para a resistência antimicrobiana (44) (9) (27). As moscas podem contaminar os substratos por contato sendo que a carga inicial bacteriana e/ou o tempo de exposição na fonte contaminada importantes fatores que contribuem para uma maior ou menor taxa de adesão dos patógenos às moscas (13).

Diferentes trabalhos reportam a prevalência de insetos da família Muscidae, especificamente moscas domésticas, inclusive em hospitais de países do primeiro mundo como o Reino Unido (26). No presente estudo, Muscidae (27,1%) foi a segunda família mais comumente coletada, atrás de Fanniidae (55,9%). Ambas são predominantes em regiões temperadas e facilmente localizadas em áreas de floresta, intensa vegetação, inclusive no meio rural. Tais famílias possuem características que tornam esses insetos extremamente adaptados ao ambiente, tanto rural como urbano e conseguem transmitir organismos patogênicos (vírus, bactérias, protozoários, helmintos) para o homem e animais, principalmente ao levar em conta seus hábitos, tais como a necessidade de constante alimentação e capacidade de digerir uma grande variedade de substâncias. Essa capacidade de ingerir o alimento, depositar uma gota de saliva sobre o mesmo para dissolvê-lo e em seguida realizar a sucção, compreende uma tática excelente de absorver, amplificar e devolver bactérias potencialmente resistentes ao meio (114).

As características de tais locais propícios podem ser observadas na região de Jacarepaguá no Rio de Janeiro, sendo um ambiente com clima favorável à presença de insetos, bastante arborizado, com bosques e disponibilidade de lixo próximo ao local de coleta, além de água e animais que provavelmente encontram-se na fábrica. Possivelmente, essas características podem ter influenciado nossos resultados, pois conseguimos isolar bactérias resistentes a diferentes antibióticos, principalmente aqueles utilizados para alimentar animais de produção, presentes na ração e/ou bebedouros. A presença dessas bactérias nestes locais, principalmente em contato direto com estes produtos pode ser favorável para um ciclo entre animais, insetos e humanos (40).

Dentro dessas perspectivas, pode-se dizer que um exemplo disso é a bactéria *Providencia alcalifaciens*, uma espécie que tem sido relacionada com quadros de diarreia, especialmente nos últimos anos (115). Wang et al., (2014) (116) investigaram uma cepa desta espécie causadora de doença típica em leitões que sofriam de dispneia grave e pneumonia hemorrágica. Esse isolado era resistente a 12 antibióticos e intermediário a 10 antibióticos dos 34 antibióticos testados, demonstrando resistência ao grupo de tetraciclina, macrolídeos, antibióticos polipeptídicos, de cefalosporina,  $\beta$ -lactâmicos resistentes à penicilinase, aminoglicosídeos e nitrofurano. Este estudo foi o primeiro a relatar uma doença pulmonar grave em leitões, causada por *P. alcalifaciens* multirresistente. Por conseguinte, mais atenção durante a vigilância e o diagnóstico devem ser dados a esta espécie que possui importância zoonótica (116). No presente estudo, duas amostras de *P. alcalifaciens* (175 e 176), foram isoladas de Sarcophagidae, sendo essa espécie um membro da família Morganellaceae da Ordem Enterobacteriales, que tem sido comumente implicado como agente causador de infecções diarreicas em humanos e animais. Surtos de *P. alcalifaciens* em países em desenvolvimento e desenvolvidos levantam questões de saúde pública, visto que é uma espécie que pode ser transferida via cadeia alimentar. Nosso local de coleta é próximo a uma fábrica de carnes e o questionamento é sobre a possibilidade dos dípteros muscoides estarem carregando essas bactérias de dentro para fora da fábrica ou vice-versa. A cepa 175 é multirresistente, pois apresentou perfil de resistência para meropenem, ceftazidima, cefoxitina e gentamicina. Tanto a cepa 175 quanto 176 são intermediárias para ciprofloxacino (117).

O gênero *Glutamicibacter* é encontrado em diferentes locais como solo, ar e água, alimentos como queijo, plantas e até mesmo amostras clínicas como sangue e urina (118). Três espécies diferentes deste gênero foram isoladas e são provindas tanto da família Muscidae quanto de Fanniidae. A presença ambiental das cepas de *Glutamicibacter* sp. pode ser considerada devido a sua versatilidade nutricional e capacidade de responder a estresses ambientais. A esse gênero pertence a espécie *G. creatinolyticus* que pode estar tanto associada a processos biotecnológicos como presente em alguns casos clínicos relacionados a processos de infecção, como bacteremia e infecções do trato urinário (119).

Além de estudos que destacam a presença de bactérias resistentes em insetos (12), outra possibilidade preocupante é o elo existente entre a possibilidade de ocorrer a multiplicação de bactérias, bem como Zurek e Ghosh, (2014) (120)

destacam, apontando ainda a transferência horizontal de genes de resistência aos antibióticos no trato digestório de insetos, principalmente nas moscas. Trabalhos como de Rybaříková et al., (2010) (121), Dolejska et al., (2011) (122), Akhtar et al., (2009) (41), Bouamama et al., (2010) (4), Solà-ginés et al., (2015) (18), Usui et al., (2015) (123), Schaumburg et al., (2016) (124) destacam a presença de diversos genes de resistência, tais como: *tet<sub>M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *tet<sub>(S)</sub>*, *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M-9</sub>*, *tet<sub>(A)</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* sendo estes os genes similares incluídos em nossa metodologia. Entretanto, nossos resultados foram negativos para os genes codificadores de beta-lactamases investigados, com exceção daquele obtido de uma cepa de *A. johnsonni* (cepa 148), isolada a partir de uma mosca da família Fanniidae, positiva para *bla<sub>GIM</sub>* que é codificador de uma metalo-beta-lactamase. Essa espécie, em nosso estudo, apresentou resistência para ciprofloxacino, meropenem e gentamicina (cepa 178). Duas cepas (147 e 155) apresentaram resistência ao mesmo antibiótico: imipenem.

Na última década, as espécies de *Acinetobacter* tornaram-se um grande problema de saúde pública. Isso se deve principalmente ao aumento da resistência a uma ampla gama de antibióticos que causam desafios ao tratamento (125). As espécies de *Acinetobacter* são também ubiqüitárias. A infecção mais comum por representantes deste gênero é a pneumonia, especialmente a pneumonia associada à ventilação mecânica, e nos últimos 20 anos têm sido a principal causa de infecções hospitalares (126). Além da capacidade das espécies conseguirem adquirir rápida resistência aos antibióticos, o conhecimento limitado sobre os mecanismos de multirresistência aos antibióticos dificulta as opções de tratamento para essas infecções (127). Em diferentes regiões do Brasil, *Acinetobacter* spp. multirresistentes produtores de carbapenemases, dos tipos OXA e NDM, puderam ser isoladas e caracterizadas, demonstrando que existe um grande desafio em relação a disseminação desses genes. Dentro deste mesmo gênero foi possível isolar *A. bereziniae* em nosso estudo a partir da família Sarcophagidae (cepa 180) que, embora não tenha apresentado resistência, teve resultado intermediário para o antibiótico ciprofloxacino. Chagas et al., (2014) (128) afirmam que existe uma relevância dessa espécie no ambiente pois existe uma grande capacidade de estar associada a genes de carbapenemase. Alertam ainda para a emergência de espécies de *Acinetobacter* não-baumannii multirresistentes, que podem servir como reservatórios de determinantes genéticos de resistência (128). *A. bereziniae* é um patógeno oportunista com resistência a múltiplos antibióticos e, embora raro, já foi relatado como responsável por infecções hospitalares em indivíduos

imunocomprometidos (129). Grosso et al., (2015) (130) enfatizam o papel de espécies não-baumannii de *Acinetobacter* como importantes reservatórios de genes de resistência clinicamente relevantes, incluindo carbapenemas, podendo contribuir para sua emergência como patógenos ligados às IRAS.

A espécie *A. johnsonii* foi por nós isolada a partir da família Fanniidae, que é um inseto encontrado em todas as regiões biogeográficas, exceto nos pólos, sendo mais predominante em regiões temperadas (131). Castillo-Ramírez et al., (2020) (132) realizaram estudo sobre análise filogeográfica dessa espécie bacteriana e foi possível constatar que existe uma transmissão intercontinental de *A. johnsonii*, uma vez que linhagens muito semelhantes geneticamente aparecem em países diferentes, como por exemplo no Chile, Argentina, China, Austrália e Marrocos. Por outro lado, diferentes linhagens circulam dentro de um único país. Além disso, esta espécie também é reservatório de genes de resistência a antibióticos, uma vez que pode carrear diferentes genes de carbapenemases, como *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-58</sub> (133) (134). A primeira descrição de *A. johnsonii* positivo para *bla*<sub>NDM-1</sub> ocorreu em dois isolados recuperados de esgoto na China em 2010 (134), e outro isolado (também coletado em esgoto) coproduziu as carbapenemases plasmidiais NDM-1, OXA-58 e PER-1 (133). Castillo-Ramírez et al., (2020) (132) lembram que NDM-1 também foi encontrado em fagos não apenas em *A. johnsonii* (135), mas também em *A. baumannii* (136).

A enzima GIM (*German imipenemase*) (137) foi originalmente descrita em uma cepa de *P. aeruginosa* isolada na cidade de Düsseldorf, Alemanha, em 2002. Estes isolados foram provenientes do trato respiratório de humanos e apresentaram resistência a todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, sendo sensíveis apenas à polimixina B. Os testes fenotípicos indicaram a produção de MBLs e a análise genotípica revelou um novo gene denominado *bla*<sub>GIM-1</sub> representando a quarta subclasse de MBL adquirida a ser identificada (138). Esse mesmo gene (*bla*<sub>GIM</sub>) que foi amplificado em nossa cepa de *A. johnsonii*, ocorre em outras cepas de *Acinetobacter* spp., o que indica mobilidade interespecie, uma vez que esse gene é facilmente encontrado em elementos móveis. Pode-se especular que o integron que abriga *bla*<sub>GIM-1</sub> é apoiado por um contexto genético que está sujeito à mobilização e esta observação pode demonstrar a importância de monitorar esta carbapenemase mais cuidadosamente (137).

A resistência a carbapenemas em *Acinetobacter* spp. é causada principalmente por carbapenemases de classe D, como OXA-23, OXA-40, OXA-58

ou OXA-143 e em algumas cepas por MBLs, como IMP, SIM ou NDM (139). Na América Latina, dentre os 33 países participantes do programa SENTRY, a maior concentração de microrganismos produtores de MBL está no Brasil e na Argentina. Dentre os países participantes, entre os anos de 1997 - 2001, o Brasil contribuiu com 90% dos isolados de *P. aeruginosa* MDR. Segundo dados deste mesmo programa no período de 2001-2003, 70% dos isolados de *P. aeruginosa* era do Brasil e 73% de *Acinetobacter* spp. da Argentina eram produtores de MBL (140) (141).

Em relação aos enterococos, Macovei e Zurek, 2006 (142) demonstraram que moscas domésticas em instalações de manipulação e distribuição de alimentos carregavam enterococos resistentes a antibióticos e potencialmente virulentos com capacidade de transferência horizontal de genes de resistência. A maioria desses isolados eram 88,2% de *E. faecalis* resistentes à eritromicina portadores de *erm* (B). Semelhante ao nosso estudo o maior percentual de isolamento foi de amostras pertencentes a essa espécie (37,2%), e em adição, duas dessas amostras apresentaram multirresistência.

*Enterococcus* spp. estão presentes em diferentes habitats, desde solo e folhagem até o trato digestório de pessoas e animais. São importantes patógenos oportunistas causadores de IRAS, tais como infecções de corrente sanguínea ou do trato urinário. Dentre as principais espécies causadoras dessas infecções, destacam-se *E. faecalis* e *E. faecium* (143) (142). Possuem características como as de adquirir e transferir genes de resistência via elementos genéticos móveis e a transferência horizontal de genes que conferem resistência à vancomicina. O surgimento de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) e a consequente limitação das opções terapêuticas para as infecções causadas por esses patógenos tornaram-se uma preocupação clínica e epidemiológica consideráveis (144), tanto que nas últimas duas décadas, *Enterococcus* emergiu como um importante agente responsável pela infecção adquirida em hospitais, tais como bacteremia, sepse, endocardite, infecção do trato urinário (ITU) e infecções abdominais e pélvicas (145). Vários fatores de virulência contribuem para a adesão, colonização, evasão da resposta imune do hospedeiro e patogenicidade e gravidade da infecção. *E. faecalis* é a espécie mais comum e virulenta deste gênero, podendo causar infecções em pacientes hospitalizados. É uma importante bactéria Gram-positiva, que coloniza o trato gastrointestinal e geniturinário humano, por isso certas condições, como hospitalização prolongada, imunodeficiência e terapia antibiótica,

causam um alto risco de aquisição de infecções enterocócicas em pacientes (146). Além disso, o tratamento de infecções enterocócicas tem sido clinicamente desafiador devido ao aumento da resistência a uma ampla gama de agentes antimicrobianos, incluindo  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos, fluoroquinolonas, glicopeptídeos e aminoglicosídeos (147) (148) (149).

Em estudos de Macovei et al., (2008) (143) verificou-se que em ambiente de criação animal com gado confinado, realizando uma triagem fenotípica, isolados de *E. faecalis* eram resistentes à ciprofloxacina (17,4%), tetraciclina (13,0%), eritromicina (13,0%) e cloranfenicol (4,3%), demonstrando inclusive a capacidade das moscas contaminarem alimentos com enterococos em um curto espaço de tempo. Além disso, há grande preocupação com o surgimento de VREs em diferentes regiões do globo (150). Existe a possibilidade de uma rota de infecção entre animais e humanos, podendo os dípteros muscoides estarem ligados a esse processo atuando como: reservatórios, amplificadores e dispersores destas bactérias e/ou seus genes (151). Em nosso estudo, a resistência à vancomicina não foi detectada pelos testes de sensibilidade, porém, 15,7% de cepas de *E. faecalis* foram resistentes a outros antibióticos testados. Porém, quatro cepas (21,0%) (cepas 150, 151, 157 e 159), sensíveis pelo teste de disco-difusão, conseguiram amplificar o gene *vanB*. Este resultado sugere que essa resistência à vancomicina pode ser estar sendo determinada por outros mecanismos que não os genes *van*. Por outro lado, a expressão do produto do gene *vanB* pode não ter sido suficiente para conferir resistência fenotípica detectada através do método de disco-difusão, uma vez que amostras portadoras desse gene podem apresentar uma ampla faixa de CIM (concentração inibitória mínima) de 4 - 10 mg/L e que amostras com valores de CIM = 4mg/L são consideradas sensíveis (152). Embora *E. faecalis* seja comumente isolado a partir de insetos, esse é o primeiro relato da presença de *vanB* numa amostra bacteriana presente em díptero muscoide, por isso a importância do alerta sobre o quadro crescente de VRE's e conseqüentemente o aumento da presença de genes *van*.

O primeiro relato desses genes, especificamente *vanA*, ocorreu em 1987 na Europa e em apenas uma década já representava um aumento de mais de 25% de enterococos associados a infecções em outros países. Willems et al., (2005) (150) detalha a possibilidade desses genes tornarem-se mais virulentos à partir de uma linhagem genética de *E. faecium* (complexo-17) que é caracterizada por resistência à ampicilina, possui uma ilha de patogenicidade e esta associado a surtos

hospitalares (150). Os *Enterococcus* são encontrados em vários habitats, incluindo o trato intestinal de animais, de insetos ( $10^2$  a  $10^4$  UFC por mosca doméstica) a humanos ( $10^4$  a  $10^6$  UFC por grama de fezes / fezes), e ambientes contaminados por material fecal animal ou humano, bem como em alimentos e rações derivadas de animais. São considerados reservatórios de genes de resistência a antibióticos incluindo  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos em concentrações elevadas, frequentemente usados para tratar infecções de cocos Gram-positivos. Os enterococos têm sido implicados na disseminação de genes de resistência a antibióticos e virulência devido a sua capacidade de adquirir e transferir resistência a antibióticos por meio da transferência de plasmídeos e transposons. Além disso, a aquisição enterocócica de resistência à vancomicina deixa poucas opções para o manejo terapêutico (142) (41) (153) (61) (154) (155) (156) (157).

No presente estudo, duas cepas de *E. faecalis* (187 e 189) se destacam no TSA, apresentando características com resistência para diferentes classes de antimicrobianos como: tetraciclina, cloranfenicol, ciprofloxacina e teicoplanina. Além das duas cepas, *E. faecalis* (193) também foi resistente ao glicopeptídeo teicoplanina, para o qual foi observada a maior taxa de resistência. Estes resultados possuem similaridade ao que Macovei e Zurek, (2006) (142) relatam, porém, as cepas que amplificaram o gene de resistência *vanB* (150, 151, 157, 159) não são as mesmas que apresentaram resultado positivo (182, 185, 190) ao utilizar o método com meio da CHROMagar, que é indicado por ser um meio seletivo para triagem de cepas VRE com resistência transmissível. A utilização desse meio é uma ferramenta simples, rápida e confiável, ainda assim, com o uso de diferentes técnicas com a mesma espécie é possível extrair diferentes resultados. A resistência para antibióticos da classe de glicopeptídeos (codificadas por genes *van*), ocorre através da aquisição de genes, principalmente *vanA* e *vanB* via plasmídeos (158). Tais características são importantes e podem gerar impactos negativos assim como demonstrado por Rushton-Green et al., (2019) (159) que conseguiu desencadear um estudo retrospectivo de sequenciamento genômico que sugere inclusive a origem de uma linhagem resistente de *E. faecalis* a vancomicina na avicultura que pode inclusive ser encontrada em amostras clínicas humanas.

Os fenótipos de VRE são definidos pela expressão de fatores de resistência e virulência relacionados à vancomicina, independentemente dos genes expressos, mas principalmente relacionados às suas características clínicas (160). Tanto *E. faecium* quanto *E. faecalis* são importantes reservatórios de resistência adquirida

aos glicopeptídeos e de multirresistência por transportarem os genes *van* mais comuns e essa variabilidade nos genótipos foi atribuída aos diferentes padrões de uso de antimicrobianos entre diferentes países (158) (160). VREs colonizaram o trato gastrointestinal de animais e de seres humanos e se espalharam como resultado, também, do uso de antibióticos como promotores de crescimento animal. Nesta ótica obtivemos enterococos advindos de uma coleta realizada próxima a um ambiente que trabalha com animais de produção. Entretanto, as quatro cepas detectadas como portadoras do gene *vanB*, não apresentaram resistência fenotípica a vancomicina (147).

A presença de insetos nesses ambientes de produção e/ou manipulação de animais potencializa o risco desses insetos atuarem como reservatórios de resistência e aumentar a transmissão de *Enterococcus* (161), pois é um gênero que faz parte da flora natural desses animais de criação, estando presentes nas fezes dos mesmos, propiciando um vínculo entre as moscas e a comunidade que faz uso desse local. Este cenário é similar ao do nosso estudo em que diferentes espécimes de dípteros foram coletados e a partir destes, grande diversidade microbiana foi isolada, entre eles *Enterococcus* resistentes à vancomicina. Ejaz, (2019) (162) reforça a problemática do aumento significativo da resistência à vancomicina desde a década de 1980 e em seu estudo verificou a forte presença de VRE em diferentes fontes clínicas. Porém, é observado que amostras de VRE continuam emergindo dentro do ambiente hospitalar, mas não tem permanecido restrito a estes locais.

O MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) é órgão responsável pela inspeção de alimentos no Brasil (163) e implementou o Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Agropecuária com objetivo de avaliar riscos, tendências e padrões na ocorrência e disseminação da resistência aos antimicrobianos por meio de alimentos de origem animal produzidos no Brasil, bem como prover dados essenciais para análises de risco relevantes à saúde animal e humana. Estudos futuros são necessários para determinar se a presença de *vanB* é um fator de risco.

Em um estudo realizado no aeroporto internacional de Chengdu, na China, foi relatado que foi possível isolar *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *A. hydrophila*, resistentes a antibióticos e com presença de genes do tipo *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>, a partir de *C. megacephala* (5). Ahmad et al., (2007) (153) demonstra que moscas domésticas podem desempenhar um papel na disseminação de *E. coli* para animais de fazenda enquanto que posteriormente Ahmad et al., (2011) (61) relata *E.*

*faecalis* como bactéria mais comum em seu estudo. *E. faecalis* e *E. faecium* multirresistentes também já foram isolados a partir de moscas pertencentes à família Calliphoridae de acordo com Wei et al., (2014) (164). Ambos estudos possuem características similares em relação ao presente estudo, pois mostraram resultados com bactérias resistentes a partir de moscas coletadas em áreas extra-hospitalares.

Graham et al., (2009) (165) exploram a produção agrícola em seu estudo e conseguem isolar *E. faecalis*, *E. faecium* e *Staphylococcus spp.* portando genes de resistência, tais como *erm*<sub>(B)</sub>, *msr*<sub>(C)</sub>, *erm*<sub>(B)</sub> e *msr*<sub>(A/B)</sub> de moscas do gênero Muscidae e Calliphoridae. Em nosso estudo, Calliphoridae não foi coletada porque provavelmente o ambiente, no momento de coleta, não apresentava características ideais para sua captura, pois é uma família de dípteros com hábitos diversos e seu desenvolvimento é mais comum em carcaças e são importantes na cadeia de reciclagem de nutrientes (166).

Blaak et al., (2014) (6) também no ambiente rural, próximo a uma fábrica de alimentos, demonstram que este cenário é uma importante via de disseminação de genes de resistência adquiridos tais como: *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>TEM-52</sub>. *E. coli* produtora de ESBLs foi detectada em moscas domésticas e varejeiras em tal estudo, sendo uma das bactérias mais comuns entre os principais resultados de trabalhos nesse contexto. Além de *E. faecalis*, *E. coli* é uma importante espécie patogênica facilmente isolada de moscas, pois consegue suportar diferentes condições de pH e temperatura corporal dos dípteros muscoides (7). No nosso estudo não detectamos *E. coli*, provavelmente por serem, neste caso, sensíveis a ceftriaxona utilizada logo na triagem inicial do trabalho. Assim como *E. coli* que tem sua relevância clínica e é capaz de colonizar insetos com frequência, *K. pneumoniae* que é capaz de causar infecções adquiridas em hospitais e na comunidade, também tem sido isolada a partir de moscas (167) (27). Ambos os trabalhos reforçam uma considerável diversidade bacteriana a partir de moscas, corroborando com nossos resultados que envolvem 17 espécies bacterianas a partir de 51 isolados.

Duas amostras isoladas em nosso estudo foram identificadas como *Hafnia alvei* e a cepa 160 apresentou resistência para ertapenem, cloranfenicol, gentamicina e ciprofloxacina, sendo mais um isolado com características de multirresistência. Essa espécie tem sido erroneamente identificada por métodos convencionais ou de sistemas automatizados, porém, em nosso estudo foi identificada com *score* entre 2,0 - 2,3, o que significa identificação confiável por MALDI-TOF MS. Para algumas espécies como esta, existem dificuldades na sua

identificação, pois os gêneros *Serratia*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Yokenella*, *Obesum bacterium* ou *Salmonella* podem apresentar determinadas similaridades. Embora o isolamento de *H. alvei* de espécimes clínicos humanos permaneça incomum, o desenvolvimento de resistência a drogas entre amostras desta espécie está emergindo e é provável que este organismo ganhe importância crescente no futuro. O microrganismo coloniza predominantemente o trato gastrointestinal e, com menos frequência, a uretra e cateteres, por exemplo (168). Existem relatos de infecções adquiridas na comunidade como: colecistite, apendicite e endocardite protética (169).

Os gêneros *Empedobacter* e *Wautersiella* apresentam dificuldade de identificação (170) pois cepas de ambos os gêneros compartilham características bioquímicas e fenotípicas, sugerindo pertencer a um único gênero. Embora a infecção por *W. falsenii* continue rara, essa bactéria não deve ser subestimada, principalmente por causa de sua resistência natural a muitos antimicrobianos disponíveis como por exemplo, amicacina, ampicilina-sulbactam, cefotaxime, ceftazidima, doripenem, gentamicina e imipenem (171). Em nosso trabalho, ambas as cepas de *W. falsenii* foram isoladas de moscas de famílias distintas, uma em Fanniidae (cepa 152) e outra em Sarcophagidae (cepa 179). Apesar dos poucos relatos de casos detalhando a doença clínica associada com *W. falsenii*, grande parte destaca-a como bactéria de infecção localizada. É a única espécie reconhecida entre o gênero *Wautersiella*, além de ter sido sugerido como um agente potencial de infecções adquiridas em hospitais, o microrganismo também foi isolado a partir do solo, sedimento poluído e pele de roedor, sendo um potencial agente patogênico em aerossóis e fluidos para usinagem de metais (171).

Heiden et al., (2020) (114) empregaram MALDI-TOF MS para a identificação de bactérias isoladas a partir de moscas em ambiente hospitalar, e destacam a identificação de Gram-negativas multirresistentes. Essa alta prevalência de patógenos humanos transportados pelas moscas também foi relatada por Khamesipour et al., (2018) (15) e Boiocchi et al., (2019) (26). Estes isolaram bactérias a partir de moscas detectadas ao nível de família e encontram resistência a vancomicina entre cepas de *Enterococcus* e *Clostridium*. Seus resultados são baseados em uma coleta de mais de 19 mil insetos, sendo a maioria díptera (mais de 70%) e as bactérias mais comuns foram *Bacillus* e *Staphylococcus*.

No estudo de Chaiwonget al., (2014) (172), *Bacillus* sp. foi uma das espécies mais prevalentes, isoladas a partir de *C. megacephala* e *M. domestica* na Tailândia.

Devido a sua capacidade de formar esporos resistentes ao calor, ser ubiqüitária, formar biofilmes e produzir toxinas responsáveis pela intoxicação alimentar, *B. cereus*, por exemplo, tornou-se um problema na indústria de alimentos. *B. cereus* foi a segunda espécie mais frequente em nosso trabalho (19,6%). Nos últimos anos, *B. cereus* tem sido cada vez mais reconhecido como uma causa de infecções sistêmicas potencialmente fatais fora do trato gastrointestinal, particularmente em pacientes de alto risco, como neonatos, pacientes com cateteres centrais, indivíduos imunocomprometidos e pacientes cronicamente debilitados (173). Outra espécie deste gênero foi isolada, *B. simplex*, porém uma única cepa a partir da família Fanniidae (cepa 201). Tal espécie compõe a diversidade bacteriana no solo o que leva a inevitáveis interações entre espécies e gera diversos comportamentos antagônicos e mutualistas, o que permite uma adaptação bacteriana à complexa vida comunitária. Essa interação pode induzir resistência a vários antibióticos ou pode eliminar espécies rivais competindo por nutrientes. A maioria atua na natureza num dinâmico sistema de biofilmes, o que pode gerar um isolamento biológico e um sistema imunológico capaz de proteger contra antibióticos (174). O sucesso deste grupo compactua com outros trabalhos (25) (175) (7) (176), que apontam este gênero como bactérias bem sucedidas no ambiente e que podem ser isoladas com frequência.

Em relação ao gênero, *Lactobacillus*, este é taxonomicamente complexo e é composto por mais de 170 espécies que não podem ser facilmente diferenciadas fenotipicamente e frequentemente requerem identificação molecular. Embora façam parte da flora gastrointestinal e vaginal humana normal, também podem ser patógenos humanos ocasionais. As espécies de *Lactobacillus* são geralmente resistentes a ácidos e são capazes de sobreviver à ingestão. Geralmente são resistentes ao metronidazol, aminoglicosídeos e ciprofloxacina (177). *Lactobacillus sakei* é uma bactéria anaeróbia facultativa e pode ser isolada a partir de uma variedade de fontes, incluindo carne, salsichas fermentadas, saquê, fermento, chucrute ou kimchi (178) e é altamente adaptada ao ambiente da carne, o que provavelmente condiz com nossa metodologia de captura das moscas ao utilizar carne moída putrefata. Por este motivo, cepas selecionadas são frequentemente utilizadas como cultura inicial na produção de embutidos fermentados, especialmente, nos países mediterrâneos (179).

Já *Staphylococcus* compreendem um gênero diverso de organismos comensais, não móveis, que habitam a pele e as membranas mucosas de humanos

e outros mamíferos. Em geral, são bactérias que fazem parte da microbiota, mas muitas espécies têm a capacidade de serem patógenos oportunistas, principalmente infectando indivíduos que têm implantes de dispositivos médicos ou que são imunocomprometidos. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* são as principais espécies do gênero associadas com infecções adquiridas em hospitais e são as causas mais comuns de infecções de sítio cirúrgico e de corrente sanguínea associadas a dispositivos médicos; ambas as espécies foram isoladas a partir de Fanniidae em nosso estudo. O desenvolvimento de cepas resistentes à penicilina, meticilina e vancomicina mostra que *S. aureus* tem um enorme poder adaptativo. A maioria das cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são adquiridas em hospitais, embora um número crescente seja relatado na comunidade (180).

No âmbito de bactérias isoladas não somente a partir de moscas, mas de outros locais como ambientes terrestres e aquáticos, podemos citar o *Microbacterium*. *Microbacterium paraoxydans* foi isolada a partir de Fanniidae (cepa 203). Embora seja considerada ambiental, já foi relatado um caso de bacteremia em uma criança de cinco anos com leucemia. Sua detecção em isolados clínicos aumentou devido ao aprimoramento dos diagnósticos microbiológicos (181). Outras espécies deste gênero (*Microbacterium liquefaciens*, *Microbacterium esteraromaticum*, *Microbacterium lacticum* e *Microbacterium barkeri*) foram isoladas a partir do trato intestinal de *M. domestica* (120) (182). Informações sobre as características epidemiológicas e clínicas das espécies de *Microbacterium* são escassas. Alguns casos sugerem que infecções por *Microbacterium* spp., inclusive bacteremia por *M. paraoxydans*, podem ocorrer em pacientes com cateteres venosos centrais de longa permanência (183).

No caso do gênero *Lactococcus*, foi isolada em nosso estudo a espécie *L. garvieae* a partir da família Fanniidae (cepa 158) e esse é um patógeno zoonótico emergente que foi originalmente isolado na mastite em roedores e é responsável pela sepse em peixes; é considerado oportunista e apresenta baixa virulência em humanos, com poucos relatos de endocardite, osteomielite, abscesso hepático, sepse e peritonite. No entanto, o difícil diagnóstico diferencial com *Enterococcus* pode levar à subestimação de sua incidência e real importância (184). Essa bactéria é uma das oito espécies pertencentes ao gênero *Lactococcus*, originalmente conhecido como grupo láctico do gênero *Streptococcus*, do qual se separou em 1985, após análise genética. São cocos, facultativamente anaeróbios e catalase negativa. Essas bactérias produzem ácido láctico, que lhes confere

capacidade de fermentação e propriedade bactericida; assim, são utilizados na indústria de alimentos para fermentação e preservação de alimentos (185). Um estudo na Dinamarca descreveu as comunidades bacterianas de 90 moscas domésticas individualmente, coletadas em fazendas leiteiras, e dentre a análise de sequências de genes, *Lactococcus* era um dos mais abundantes encontrados em todas as localidades amostradas (25), a mesma abundância, entretanto, não foi observada em nossos resultados.

Para a rápida e confiável identificação, o uso de MALDI-TOF MS demonstrou ser uma técnica com resultados comparáveis, senão melhores do que aqueles obtidos por outros métodos demorados e de alto custo para identificação microbiana. Embora, o número limitado de banco de dados e falta de programas eficientes capazes de aumentar a resolução para diferenciar espécies intimamente relacionadas e variações entre instrumentos são alguns dos desafios ainda atuais desta tecnologia. O número limitado de bancos de dados contendo poucos organismos que não sejam de interesse clínico, resulta em baixa porcentagem de identificação (43 a 65%) para microrganismos isolados do solo, água e outros ambientes, objetos da microbiologia ambiental e em estudos ecológicos (85) (90). Assim como Onwugamba et al., (2020) (176) que utilizaram o MALDI-TOF MS para realizar a identificação bacteriana a partir de moscas, no nosso estudo essa ferramenta em conjunto com a coloração de Gram, nos permitiu uma identificação rápida e na maioria dos casos precisa.

A relevância do presente estudo evidencia a presença de potenciais patógenos encontrados em moscas. Sendo estes insetos altamente adaptados aos mais diversos ambientes são capazes de disseminar estes microrganismos em diferentes lugares, principalmente próximo a locais com presença de animais, fezes e alimento. Além disso, estes insetos parecem ser importantes indicadores de contaminação ambiental por bactérias resistentes a antibióticos, sendo estes medicamentos, atualmente, os compostos mais valiosos usados no combate a doenças infecciosas. Por mais que esses antimicrobianos e os genes de resistência a eles possam evoluir de forma natural, as pressões sofridas no meio ambiente geram implicações relevantes, tanto na saúde humana quanto na perspectiva ecológica. Essa poluição dos ecossistemas naturais por antibióticos e genes de resistência pode gerar consequências graves para a evolução da microbiosfera (50). É necessário reconhecer os caminhos pelos quais a resistência passa do meio ambiente para o homem e os animais, demonstrando o importante elo na óptica da

Saúde Única, além de poder identificar os principais caminhos pelos quais os vetores de resistência a antibióticos se espalham.

Rahuma et al., (2005) (108), Songe et al., (2016) (54), Wetzker et al., (2019) (55), Poudel et al., (2019) (9), Thamlikitkul et al., (2019) (56) conseguem comparar a presença de dípteros muscoides de ambiente hospitalar com outros insetos de ambiente urbano, inclusive matadouros. Embora nossos resultados não tenham reportado muitas bactérias com fenótipo resistente ou intermediário para os antimicrobianos testados, e sem correlação com a PCR, esse dado não diminui a importância do estudo em questão. De acordo com o critério de Magiorakos et al., (2012) (83), encontramos seis amostras apresentando fenótipos MDR (Tabela 11): *H. alvei* (resistente a ERT, CLOR, GEN, CIP), *Providencia alcalifasciens* (IMP, CAZ, GEN, CIP), *P. alcalifasciens* (CAZ, FOX, GEN, CIP), *A. johnsonii* (MER, GEN, CIP), *E. faecalis* (TET, TEC, CIP), *S. epidermidis* (TET, CLO, GEN, CIP) que apontam a resistência natural presente no ambiente. Ainda, entre os microrganismos isolados durante o trabalho temos patógenos frequente associados com IRAS como *S. aureus* e *E. faecalis*, por exemplo, ou mesmo relacionadas a intoxicações alimentares como do grupo *B. cereus*, além de patógenos oportunistas ou raramente isolados em casos clínicos como *Lactococcus* e *Microbacterium* que podem estar sendo transportados pelas moscas para ambientes domésticos e participar da contaminação de alimentos, por exemplo.

Em nosso estudo podemos concluir que o papel das moscas é relevante nesse processo de disseminação assim como relatado em outros trabalhos (151) (186) que atribuem esse sucesso às diferentes formas de realizar esse processo de transmissão e amplificação dos genes de resistência, principalmente se o ambiente possibilitar que essa troca seja ainda mais potente quando alinhada à exposição de animais e alimentos (187) (188).

## 6 CONCLUSÕES

Os dípteros da família Muscidae foram os insetos mais coletados próximo a fábrica de carnes provavelmente devido a sua ampla distribuição em diferentes ambientes.

Dípteros de diferentes famílias podem estar atuando na disseminação de patógenos em diversos locais, inclusive fora do ambiente hospitalar.

Grande diversidade de microrganismos foi isolada a partir de dípteros muscoides, principalmente bactérias pertencentes à espécie *Enterococcus faecalis*.

Espécies bacterianas isoladas a partir de moscas como *Enterococcus faecalis*, *Hafnia alvei*, *Providencia alcalifaciens*, *Acinetobacter johnsonii* e *Staphylococcus epidermidis* podem apresentar características de multirresistência.

Isolados de *E. faecalis* positivos para *vanB*, gene que codifica resistência à vancomicina, apresentam esse determinante de resistência em ambientes naturais e pode ser disperso por dípteros muscoides.

Um isolado de *A. johnsonii* foi positivo para o gene *bla<sub>GIM</sub>* e resistente em disco-difusão para importantes antimicrobianos como meropenem, gentamicina e ciprofloxacina.

Não foram detectadas amostras positivas para genes que codificam beta-lactamases de espectro ampliado e carbapenemases, com exceção de uma amostra positiva para o gene *bla<sub>GIM</sub>*, sendo necessárias mais pesquisas que visem o monitoramento e identificação de genes que codifiquem para outros mecanismos de resistência aos antimicrobianos, além daqueles que foram investigados no presente estudo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yeates DK, Wiegmann BM, Courtney GW, Meier R, Lambkin C, Pape T. Phylogeny and systematics of Diptera: Two decades of progress and prospects\*. Zootaxa [Internet]. 21 de dezembro de 2007 [citado 18 de janeiro de 2021];1668(1):565–90. Disponível em: <https://www.biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.1668.1.27>
2. Gerry AC. Monitoring House Fly (Diptera: Muscidae) Activity on Animal Facilities. J Insect Sci. 1º de novembro de 2020;20(6).
3. Kappel HB, Oliveira AG, Silva PR da, Pelli A. Non-biting flying insects as carriers of pathogenic bacteria in a Brazilian hospital. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. abril de 2013 [citado 22 de outubro de 2020];46(2):234–6. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822013000200234&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822013000200234&lng=en&tlng=en)
4. Bouamama L, Sorlozano A, Laglaoui A, Lebbadi M, Aarab A, Gutierrez J. Antibiotic resistance patterns of bacterial strains isolated from *Periplaneta americana* and *Musca domestica* in Tangier, Morocco. The Journal of Infection in Developing Countries [Internet]. 10 de fevereiro de 2010 [citado 12 de janeiro de 2021];4(04):194–201. Disponível em: <https://jids.org/index.php/journal/article/view/20440055>
5. Liu Y, Yang Y, Zhao F, Fan X, Zhong W, Qiao D, et al. Multi-drug resistant gram-negative enteric bacteria isolated from flies at Chengdu Airport, China. Southeast Asian J Trop Med Public Health. novembro de 2013;44(6):988–96.
6. Blaak H, Hamidjaja RA, van Hoek AHAM, de Heer L, de Roda Husman AM, Schets FM. Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* on Flies at Poultry Farms. Appl Environ Microbiol [Internet]. janeiro de 2014 [citado 8 de janeiro de 2021];80(1):239–46. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3910986/>
7. 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. abril de 2018;22:8–17.
8. Hemmatinezhad B, Ommi D, Hafshejani TT, Khamesipour F, Hemmatinezhad B, Ommi D, et al. Molecular detection and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from houseflies (*Musca domestica*) in Iran. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases [Internet]. 2015 [citado 12 de novembro de 2020];21:1–5. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1678-91992015000100325&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1678-91992015000100325&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
9. Poudel A, Hathcock T, Butaye P, Kang Y, Price S, Macklin K, et al. Multidrug-Resistant *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus* spp. in

Houseflies and Blowflies from Farms and Their Environmental Settings. *Int J Environ Res Public Health*. 25 de 2019;16(19).

10. Akter S, Sabuj AAM, Haque ZF, Kafi MA, Rahman MT, Saha S. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes from houseflies. *Vet World*. fevereiro de 2020;13(2):266–74.
11. Fukuda A, Usui M, Okubo T, Tamura Y. Horizontal Transfer of Plasmid-Mediated Cephalosporin Resistance Genes in the Intestine of Houseflies (*Musca domestica*). *Microbial Drug Resistance* [Internet]. 18 de dezembro de 2015 [citado 9 de janeiro de 2021];22(4):336–41. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/mdr.2015.0125>
12. Stoffolano JG. Fly foregut and transmission of microbes. In: *Advances in Insect Physiology* [Internet]. Elsevier; 2019 [citado 22 de outubro de 2020]. p. 27–95. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065280619300207>
13. Wasala L, Talley JL, Desilva U, Fletcher J, Wayadande A. Transfer of *Escherichia coli* O157:H7 to spinach by house flies, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Phytopathology*. abril de 2013;103(4):373–80.
14. Muñoz DJ, Rodríguez R. Agentes bacterianos y parasitarios en adultos de la mosca común *Musca domestica* recolectadas en el peñón, estado sucre, Venezuela. *Bacterial and parasite agents in adult housefly *Musca domestica* collected in el peñón, sucre state, Venezuela* [Internet]. abril de 2015 [citado 21 de janeiro de 2021]; Disponível em: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/40201>
15. Khamesipour F, Lankarani KB, Honarvar B, Kwenti TE. A systematic review of human pathogens carried by the housefly (*Musca domestica* L.). *BMC Public Health*. 22 de agosto de 2018;18(1):1049.
16. Pérez S, De Carvalho CJB. FAMILY MUSCIDAE. *Zootaxa*. 14 de junho de 2016;4122(1):814–53.
17. Davari B, Kalantar E, Zahirnia A, Moosa-Kazemi S. Frequency of resistance and susceptible bacteria isolated from houseflies. *Iran J Arthropod Borne Dis*. 2010;4(2):50–5.
18. Solà-Ginés M, González-López JJ, Cameron-Veas K, Piedra-Carrasco N, Cerdà-Cuellar M, Migura-García L. Houseflies (*Musca domestica*) as Vectors for Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* on Spanish Broiler Farms. *Appl Environ Microbiol*. junho de 2015;81(11):3604–11.
19. Chillcott JG. A Revision of the Nearctic Species of Fanniinae (Diptera: Muscidae). *The Memoirs of the Entomological Society of Canada* [Internet]. ed de 1960 [citado 21 de janeiro de 2021];92(S14):5–295. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/memoirs-of-the-entomological-society-of-canada/article/abs/revision-of-the-nearctic-species-of-fanniinae-diptera-muscidae1/2E4A026A9CC386D1E32339396B207C44>
20. Grisales D, Carvalho CJB de, Grisales D, Carvalho CJB de. Checklist de Fanniidae (Insecta, Diptera) do Estado de Mato Grosso do Sul. *Iheringia Série*

- Zoologia [Internet]. 2017 [citado 21 de janeiro de 2021];107. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0073-47212017000200238&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0073-47212017000200238&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)
21. Verves Y, Barták M, Kubík Š. Checklist of flesh flies of Turkey (Diptera, Sarcophagidae). *Zookeys*. 2018;(743):95–136.
  22. Sukontason KL, Bunchoo M, Khantawa B, Piangjai S, Rongsriyam Y, Sukontason K. COMPARISON BETWEEN MUSCA DOMESTICA AND CHRYSOMYA MEGACEPHALA AS CARRIERS OF BACTERIA IN NORTHERN THAILAND. *SOUTHEAST ASIAN J TROP MED PUBLIC HEALTH*. 2007;38(1):7.
  23. Sousa JRP de, Esposito MC, Carvalho Filho F da S. Composition, abundance and richness of Calliphoridae (Diptera) in the forests and gaps with different forest covers from the oil extraction field located at Urucu River, Coari, Amazonas. *Revista Brasileira de Entomologia* [Internet]. junho de 2010 [citado 21 de janeiro de 2021];54(2):270–6. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0085-56262010000200010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0085-56262010000200010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)
  24. Lindsay SW, Lindsay TC, Duprez J, Hall MJR, Kwambana BA, Jawara M, et al. *Chrysomya putoria*, a Putative Vector of Diarrheal Diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases* [Internet]. 1º de novembro de 2012 [citado 21 de janeiro de 2021];6(11):e1895. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001895>
  25. Bahrndorff S, Jonge N de, Skovgård H, Nielsen JL. Bacterial Communities Associated with Houseflies (*Musca domestica* L.) Sampled within and between Farms. *PLOS ONE* [Internet]. 12 de janeiro de 2017 [citado 21 de janeiro de 2021];12(1):e0169753. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0169753>
  26. 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). *Journal of Medical Entomology* [Internet]. 28 de outubro de 2019 [citado 11 de fevereiro de 2021];56(6):1684–97. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jme/tjz086>
  27. Carramaschi IN, Lopes JCO, Leite JA, Carneiro MT, Barbosa RR, Boas MHV, et al. Surveillance of antimicrobial resistant bacteria in flies (Diptera) in Rio de Janeiro city. *Acta Tropica* [Internet]. 1º de agosto de 2021 [citado 23 de agosto de 2021];220:105962. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X21001418>
  28. Galati EAB, Galvis-Ovallos F, Lawyer P, Léger N, Depaquit J. An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Parasite*. 2017;24:26.
  29. Zhu X, Tong A, Wang D, Sun H, Chen L, Dong M. Antibiotic resistance patterns of Gram-negative and Gram-positive strains isolated from inpatients with

nosocomial infections in a tertiary hospital in Beijing, China from 2011 to 2014. *J Chemother.* outubro de 2017;29(5):317–20.

30. Oliveira JFP, Cipullo JP, Burdmann EA. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery* [Internet]. dezembro de 2006 [citado 5 de maio de 2021];21(4):444–52. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0102-76382006000400015&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0102-76382006000400015&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)
31. De Rosa FG, Corcione S, Pagani N, Di Perri G. From ESKAPE to ESCAPE, from KPC to CCC. *Clin Infect Dis.* 15 de abril de 2015;60(8):1289–90.
32. CDC. Antibiotic-resistant Germs: New Threats [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2021 [citado 23 de agosto de 2021]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>
33. Ministério Da Saúde SDC Tecnologia E Insumos Estratégicos. Classificação de riscos dos agentes biológicos. Brasília: Editora MS; 2006.
34. *classificacao\_risco\_agentes\_biologicos\_3ed.pdf* [Internet]. [citado 14 de dezembro de 2021]. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/classificacao\\_risco\\_agentes\\_biologicos\\_3ed.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/classificacao_risco_agentes_biologicos_3ed.pdf)
35. Rolain JM, Canton R, Cornaglia G. Emergence of antibiotic resistance: need for a new paradigm. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 1º de julho de 2012 [citado 18 de fevereiro de 2021];18(7):615–6. Disponível em: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)64554-7/abstract](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)64554-7/abstract)
36. da Costa PM, Loureiro L, Matos AJF. Transfer of Multidrug-Resistant Bacteria between Intermingled Ecological Niches: The Interface between Humans, Animals and the Environment. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. janeiro de 2013 [citado 8 de janeiro de 2021];10(1):278–94. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3564142/>
37. Novais C, Freitas AR, Silveira E, Antunes P, Silva R, Coque TM, et al. Spread of multidrug-resistant *Enterococcus* to animals and humans: an underestimated role for the pig farm environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 1º de dezembro de 2013 [citado 11 de janeiro de 2021];68(12):2746–54. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkt289>
38. 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* [Internet]. 1º de maio de 2013 [citado 23 de outubro de 2020];56(9):1310–8. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/56/9/1310/293355>
39. OPAS/OMS - 2015 [Internet]. [citado 17 de maio de 2021]. Disponível em: [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=list&slug=2015-3&Itemid=270&lang=pt](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=list&slug=2015-3&Itemid=270&lang=pt)

40. Celia Manaia [Internet]. MY SITE. [citado 23 de outubro de 2020]. Disponível em: <https://www.envchemgroup.com/celia-manaia.html>
41. 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.* outubro de 2009;58(3):509–18.
42. Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, Martínez JL. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat Microbiol* [Internet]. setembro de 2019 [citado 25 de outubro de 2020];4(9):1432–42. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41564-019-0503-9>
43. Fuller T, Bensch S, Müller I, Novembre J, Pérez-Tris J, Ricklefs RE, et al. The ecology of emerging infectious diseases in migratory birds: an assessment of the role of climate change and priorities for future research. *Ecohealth.* março de 2012;9(1):80–8.
44. Beugnet F, Chalvet-Monfray K. Impact of climate change in the epidemiology of vector-borne diseases in domestic carnivores. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* dezembro de 2013;36(6):559–66.
45. Laxminarayan R, Matsoso P, Pant S, Brower C, Røttingen J-A, Klugman K, et al. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *The Lancet* [Internet]. 9 de janeiro de 2016 [citado 23 de agosto de 2021];387(10014):168–75. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673615004742>
46. Andrade LN, Darini ALC. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse? *Journal of Infection Control* [Internet]. 14 de março de 2017 [citado 24 de março de 2021];6(1):16–25. Disponível em: <https://jic-abih.com.br/index.php/jic/article/view/173>
47. OMS | Publicações da OMS [Internet]. WHO. World Health Organization; [citado 17 de maio de 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/eportuguese/publications/pt/>
48. Klein EY, Boeckel TPV, Martinez EM, Pant S, Gandra S, Levin SA, et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *PNAS* [Internet]. 10 de abril de 2018 [citado 21 de janeiro de 2021];115(15):E3463–70. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/115/15/E3463>
49. Boeckel TPV, Glennon EE, Chen D, Gilbert M, Robinson TP, Grenfell BT, et al. Reducing antimicrobial use in food animals. *Science* [Internet]. 29 de setembro de 2017 [citado 12 de fevereiro de 2021];357(6358):1350–2. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/357/6358/1350>
50. Martinez JL. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci* [Internet]. 22 de julho de 2009 [citado 16 de fevereiro de 2021];276(1667):2521–30. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2684669/>

51. Kim UJ, Kim HK, An JH, Cho SK, Park K-H, Jang H-C. Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. *Chonnam Med J* [Internet]. agosto de 2014 [citado 18 de maio de 2021];50(2):37–44. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4161759/>
52. Lozano C, Torres C. [Update on antibiotic resistance in Gram-positive bacteria]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. janeiro de 2017;35 Suppl 1:2–8.
53. Karaman R, Jubeh B, Breijyeh Z. Resistance of Gram-Positive Bacteria to Current Antibacterial Agents and Overcoming Approaches. *Molecules*. 23 de junho de 2020;25(12):E2888.
54. Songe M, Hang'ombe B, Knight-Jones T, Grace D. Antimicrobial Resistant Enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in Houseflies Infesting Fish in Food Markets in Zambia. *IJERPH* [Internet]. 28 de dezembro de 2016 [citado 22 de outubro de 2020];14(1):21. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1660-4601/14/1/21>
55. Wetzker W, Pfeifer Y, Wolke S, Haselbeck A, Leistner R, Kola A, et al. Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* Isolated from Flies in the Urban Center of Berlin, Germany. *IJERPH* [Internet]. 30 de abril de 2019 [citado 22 de outubro de 2020];16(9):1530. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/16/9/1530>
56. Thamlikitkul V, Tiengrim S, Thamthaweechok N, Buranapakdee P, Chiemchaisri W. Contamination by Antibiotic-Resistant Bacteria in Selected Environments in Thailand. *IJERPH* [Internet]. 5 de outubro de 2019 [citado 22 de outubro de 2020];16(19):3753. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/16/19/3753>
57. Greenberg B. Flies and disease. Vol. II. II. Biology and disease transmission. *Flies and disease Vol II II Biology and disease transmission* [Internet]. 1973 [citado 21 de janeiro de 2021]; Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19742704409>
58. Fotedar R, Banerjee U, Samantray JC, Shrinivas null. Vector potential of hospital houseflies with special reference to *Klebsiella* species. *Epidemiol Infect*. agosto de 1992;109(1):143–7.
59. Kobayashi M, Sasaki T, Saito N, Tamura K, Suzuki K, Watanabe H, et al. Houseflies: not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Trop Med Hyg*. outubro de 1999;61(4):625–9.
60. Holt PS, Geden CJ, Moore RW, Gast RK. Isolation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from houseflies (*Musca domestica*) found in rooms containing *Salmonella* serovar Enteritidis-challenged hens. *Appl Environ Microbiol*. outubro de 2007;73(19):6030–5.
61. Ahmad A, Ghosh A, Schal C, Zurek L. Insects in confined swine operations carry a large antibiotic resistant and potentially virulent enterococcal community. *BMC Microbiology* [Internet]. 26 de janeiro de 2011 [citado 11 de

janeiro de 2021];11(1):23. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-23>

62. Guenther S, Falgenhauer L, Semmler T, Imirzalioglu C, Chakraborty T, Roesler U, et al. Environmental emission of multiresistant *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-1* from German swine farms. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1º de maio de 2017 [citado 10 de novembro de 2020];72(5):1289–92. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/72/5/1289/2953468>
63. Carramaschi et al. - 2019 - First report of *Raoultella ornithinolytica* carryin.pdf [Internet]. [citado 23 de novembro de 2020]. Disponível em: [https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/35312/2/IsabelCarramachi\\_KaryneRangel\\_et\\_al\\_IOC\\_2019.pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/35312/2/IsabelCarramachi_KaryneRangel_et_al_IOC_2019.pdf)
64. Guimarães DO, Momesso L da S, Pupo MT. Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents. *Química Nova* [Internet]. 2010 [citado 5 de maio de 2021];33(3):667–79. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0100-40422010000300035&lng=en&nrm=iso&tling=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0100-40422010000300035&lng=en&nrm=iso&tling=pt)
65. Vieira - Técnicas de PCR Aplicações e Padronização de Reaç.pdf [Internet]. [citado 23 de agosto de 2021]. Disponível em: <https://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/aula1.pdf>
66. Vicente D, Pérez-Trallero E. [Tetracyclines, sulfonamides, and metronidazole]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. fevereiro de 2010;28(2):122–30.
67. Nelson M, Levy S. The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1º de dezembro de 2011;1241:17–32.
68. Pereira-Maia EC, Silva PP, Almeida WB de, Santos HF dos, Marcial BL, Ruggiero R, et al. Tetraciclina e glicilciclina: uma visão geral. *Quím Nova* [Internet]. 2010 [citado 25 de outubro de 2021];33:700–6. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/qn/a/W6JcWMb9wzTNhdLfdSZ4HVN/?lang=pt&format=html>
69. Tomé AM, Filipe A. Quinolones: review of psychiatric and neurological adverse reactions. *Drug Saf*. 1º de junho de 2011;34(6):465–88.
70. Dinos GP. The macrolide antibiotic renaissance. *Br J Pharmacol*. setembro de 2017;174(18):2967–83.
71. Vázquez-Laslop N, Mankin AS. How Macrolide Antibiotics Work. *Trends Biochem Sci*. setembro de 2018;43(9):668–84.
72. Pace JL, Yang G. Glycopeptides: Update on an old successful antibiotic class. *Biochem Pharmacol*. 30 de março de 2006;71(7):968–80.
73. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2016 [citado 25 de outubro de 2021];7:1789. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01789>

74. Mendes CAC, Burdmann EA. Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. Rev Assoc Med Bras [Internet]. 2009 [citado 23 de agosto de 2021];55:752–9. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/ramb/a/ZNvsbTFvfcgSYp854CKDVcL/abstract/?lang=pt>
75. Bakthavatchalam YD, Pragasam AK, Biswas I, Veeraraghavan B. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update. Journal of Global Antimicrobial Resistance [Internet]. 1º de março de 2018 [citado 25 de outubro de 2021];12:124–36. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716517301777>
76. Girardello R, Gales AC. Polymyxins resistance: old antimicrobials, last therapeutic options. Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção [Internet]. 5 de abril de 2012 [citado 23 de agosto de 2021];2(2):66–9. Disponível em: <https://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia/article/view/2504>
77. Bush K. Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. outubro de 2018;62(10).
78. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. março de 2010;54(3):969–76.
79. Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. Current Issues in Molecular Biology [Internet]. janeiro de 2015 [citado 25 de outubro de 2021];17(1):11–22. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1467-3045/17/1/2>
80. Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. 1º de dezembro de 2014 [citado 25 de outubro de 2021];32:4–9. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X14701685>
81. Boneca IG, Chiosis G. Vancomycin resistance: occurrence, mechanisms and strategies to combat it. Expert Opin Ther Targets. junho de 2003;7(3):311–28.
82. Mühlberg E, Umstätter F, Kleist C, Domhan C, Mier W, Uhl P. Renaissance of vancomycin: approaches for breaking antibiotic resistance in multidrug-resistant bacteria. Can J Microbiol. janeiro de 2020;66(1):11–6.
83. Magiorakos A-P, 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. março de 2012;18(3):268–81.
84. Melo - 2014 - A UTILIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF .pdf [Internet]. [citado 1º de junho de 2021]. Disponível em: [https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUBD-9ZLG5P/1/a\\_\\_o\\_da\\_espectrometria\\_de\\_massas\\_maldi\\_tof\\_na\\_identifica\\_\\_o\\_.pdf](https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUBD-9ZLG5P/1/a__o_da_espectrometria_de_massas_maldi_tof_na_identifica__o_.pdf)

85. Sandrin TR, Goldstein JE, Schumaker S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom Rev.* junho de 2013;32(3):188–217.
86. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* março de 2012;36(2):380–407.
87. Li Y, Shan M, Zhu Z, Mao X, Yan M, Chen Y, et al. Application of MALDI-TOF MS to rapid identification of anaerobic bacteria. *BMC Infect Dis* [Internet]. 7 de novembro de 2019 [citado 28 de março de 2021];19(1):941. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4584-0>
88. Weis CV, Jutzeler CR, Borgwardt K. Machine learning for microbial identification and antimicrobial susceptibility testing on MALDI-TOF mass spectra: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 1º de outubro de 2020 [citado 23 de abril de 2021];26(10):1310–7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X20301580>
89. Weis CV, Jutzeler CR, Borgwardt K. Machine learning for microbial identification and antimicrobial susceptibility testing on MALDI-TOF mass spectra: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 1º de outubro de 2020 [citado 28 de março de 2021];26(10):1310–7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X20301580>
90. Rahi P, Prakash O, Shouche YS. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Microbial Identifications: Challenges and Scopes for Microbial Ecologists. *Front Microbiol.* 2016;7:1359.
91. Lau SKP, Tang BSF, Teng JLL, Chan T-M, Curreem SOT, Fan RYY, et al. Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry for identification of clinically significant bacteria that are difficult to identify in clinical laboratories. *Journal of Clinical Pathology* [Internet]. 1º de abril de 2014 [citado 28 de março de 2021];67(4):361–6. Disponível em: <https://jcp.bmj.com/content/67/4/361>
92. Foxman B, Zhang L, Koopman JS, Manning SD, Marrs CF. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol Perspect Innov* [Internet]. 25 de novembro de 2005 [citado 2 de junho de 2021];2:10. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1308839/>
93. Vieira DP. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. :18.
94. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. *Biotechniques.* outubro de 2020;69(4):317–25.
95. Wang X, Jordan IK, Mayer LW. Chapter 29 - A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology. In: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, organizadores. *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)* [Internet]. Boston: Academic Press; 2015 [citado 11 de agosto de

- 2021]. p. 517–36. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123971692000299>
96. 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* [Internet]. 11 de julho de 2016 [citado 17 de maio de 2021];(113). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4993432/>
  97. Barreiro - 2011 - Identificação de patógenos causadores de mastite s.pdf [Internet]. [citado 2 de junho de 2021]. Disponível em: [https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10135/tde-03082012-155228/publico/JULIANA\\_R\\_BARREIRO.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10135/tde-03082012-155228/publico/JULIANA_R_BARREIRO.pdf)
  98. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti J-L, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem*. janeiro de 2011;44(1):104–9.
  99. Punina NV, Makridakis NM, Remnev MA, Topunov AF. Whole-genome sequencing targets drug-resistant bacterial infections. *Hum Genomics* [Internet]. 5 de agosto de 2015 [citado 25 de outubro de 2021];9(1):19. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40246-015-0037-z>
  100. Zwe YH, Chin SF, Kohli GS, Aung KT, Yang L, Yuk H-G. Whole genome sequencing (WGS) fails to detect antimicrobial resistance (AMR) from heteroresistant subpopulation of *Salmonella enterica*. *Food Microbiology* [Internet]. 1º de outubro de 2020 [citado 15 de agosto de 2021];91:103530. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002020301192>
  101. Silva-Valenzuela M das G da, Almeida FCS, Matizonkas-Antonio LF, Libório TN, Acquafreda T, Cazal C, et al. Hibridização in situ com sonda não-radioativa para mRNA: princípios e aplicações em patologia. *J Bras Patol Med Lab* [Internet]. junho de 2006 [citado 3 de junho de 2021];42(3):207–13. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-24442006000300010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442006000300010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)
  102. Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 1º de outubro de 2010 [citado 25 de outubro de 2021];10(7):866–75. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156713481000211X>
  103. Neoh H-M, Tan X-E, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol*. outubro de 2019;74:103935.
  104. Matsumura Y. [Multilocus sequence typing (MLST) analysis]. *Rinsho Byori*. dezembro de 2013;61(12):1116–22.
  105. Jelocnik M, Polkinghorne A, Pannekoek Y. Multilocus Sequence Typing (MLST) of *Chlamydiales*. *Methods Mol Biol*. 2019;2042:69–86.

106. Carvalho CJB de, Mello-Patiu CA de. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia* [Internet]. setembro de 2008 [citado 14 de março de 2021];52(3):390–406. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0085-56262008000300012&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0085-56262008000300012&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
107. Amendoeira et al. - 2009 - Conceitos e métodos para a formação de profissional.pdf [Internet]. [citado 15 de março de 2021]. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/8659/2/Livro%20EPSJV%20010023.pdf>
108. Rahuma N, Ghenghesh KS, Aissa RB, Elamaari A. Carriage by the housefly (*Musca domestica*) of multiple-antibiotic-resistant bacteria that are potentially pathogenic to humans, in hospital and other urban environments in Misurata, Libya. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* [Internet]. 1º de dezembro de 2005 [citado 25 de novembro de 2020];99(8):795–802. Disponível em: <https://doi.org/10.1179/136485905X65134>
109. Peix A, Ramírez-Bahena M-H, Velázquez E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect Genet Evol.* dezembro de 2009;9(6):1132–47.
110. Peix A, Ramírez-Bahena M-H, Velázquez E. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infect Genet Evol.* janeiro de 2018;57:106–16.
111. Rebolledo PA, Vu CCL, Carlson RD, Kraft CS, Anderson EJ, Burd EM. Polymicrobial ventriculitis involving *Pseudomonas fulva*. *J Clin Microbiol.* junho de 2014;52(6):2239–41.
112. Sivolodsky EP, Gorelova GV, Bogoslovskaya SP, Zueva EV. [Antibiotic susceptibility and identification of clinical *Pseudomonas fulva* isolates]. *Antibiot Khimioter.* 2014;59(9–10):33–7.
113. Uddin F, Roulston K, McHugh TD, Khan TA, Sohail M. Bacteremia in a human caused by an XDR strain of *Pseudomonas fulva*. *J Infect Dev Ctries.* 31 de julho de 2018;12(7):597–9.
114. Heiden SE, Kurz MSE, Bohnert J, Bayingana C, Ndoli JM, Sendegeya A, et al. Flies from a tertiary hospital in Rwanda carry multidrug-resistant Gram-negative pathogens including extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* sequence type 131. *Antimicrob Resist Infect Control* [Internet]. dezembro de 2020 [citado 24 de fevereiro de 2021];9(1):34. Disponível em: <https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-020-0696-y>
115. Shah MM, Odoyo E, Ichinose Y. Epidemiology and Pathogenesis of *Providencia alcalifaciens* Infections. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. agosto de 2019 [citado 12 de novembro de 2021];101(2):290–3. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6685554/>

116. Wang X, Wang J, Hao H, Qiu L, Liu H, Chen S, et al. Pathogenic *Providencia alcalifaciens* strain that causes fatal hemorrhagic pneumonia in piglets. *Curr Microbiol.* março de 2014;68(3):278–84.
117. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, S. Gupta R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [Internet]. 1º de dezembro de 2016 [citado 23 de outubro de 2020];66(12):5575–99. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.001485>
118. Santos RG, Hurtado R, Gomes LGR, Profeta R, Rifici C, Attili AR, et al. Complete genome analysis of *Glutamicibacter creatinolyticus* from mare abscess and comparative genomics provide insight of diversity and adaptation for *Glutamicibacter*. *Gene.* 30 de maio de 2020;741:144566.
119. Busse H-J 2016. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter gen. nov.*, *Paeniglutamicibacter gen. nov.*, *Pseudoglutamicibacter gen. nov.*, *Paenarthrobacter gen. nov.* and *Pseudarthrobacter gen. nov.*, and emended description of *Arthrobacter roseus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [Internet]. [citado 25 de outubro de 2021];66(1):9–37. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.000702>
120. Zurek L, Ghosh A. Insects represent a link between food animal farms and the urban environment for antibiotic resistance traits. *Appl Environ Microbiol.* junho de 2014;80(12):3562–7.
121. Rybaříková J, Dolejská M, Materna D, Literák I, Čížek A. Phenotypic and genotypic characteristics of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from symbovine flies, cattle and sympatric insectivorous house martins from a farm in the Czech Republic (2006–2007). *Research in Veterinary Science* [Internet]. outubro de 2010 [citado 16 de janeiro de 2021];89(2):179–83. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003452881000069X>
122. Dolejska M, Jurcickova Z, Literak I, Pokludova L, Bures J, Hera A, et al. IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates on a dairy farm. *Veterinary Microbiology* [Internet]. 5 de maio de 2011 [citado 25 de outubro de 2021];149(3):513–6. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113510005729>
123. Usui M, Shirakawa T, Fukuda A, Tamura Y. The Role of Flies in Disseminating Plasmids with Antimicrobial-Resistance Genes Between Farms. *Microbial Drug Resistance* [Internet]. 20 de maio de 2015 [citado 14 de janeiro de 2021];21(5):562–9. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2015.0033>

124. Schaumburg F, Onwugamba FC, Akulenko R, Peters G, Mellmann A, Köck R, et al. A geospatial analysis of flies and the spread of antimicrobial resistant bacteria. *International Journal of Medical Microbiology* [Internet]. novembro de 2016 [citado 15 de janeiro de 2021];306(7):566–71. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422116301333>
125. Dandachi I, Azar E, Hamouch R, Maliha P, Abdallah S, Kanaan E, et al. *Acinetobacter* spp in a Third World Country with Socio-economic and Immigrants Challenges. *J Infect Dev Ctries*. 30 de novembro de 2019;13(11):948–55.
126. Matsunaga N. [*Acinetobacter* spp]. *Nihon Rinsho*. fevereiro de 2012;70(2):236–42.
127. Shin B, Park C, Park W. Stress responses linked to antimicrobial resistance in *Acinetobacter* species. *Appl Microbiol Biotechnol*. fevereiro de 2020;104(4):1423–35.
128. Chagas TPG, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, Carvalho-Assef APD, Asensi MD. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 1º de agosto de 2014 [citado 23 de agosto de 2021];79(4):468–72. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.006>
129. Reyes SM, Bolettieri E, Allen D, Hay AG. Genome Sequences of Four Strains of *Acinetobacter bereziniae* Isolated from Human Milk Pumped with a Personal Breast Pump and Hand-Washed Milk Collection Supplies. *Microbiol Resour Announc*. 29 de outubro de 2020;9(44):e00770-20.
130. Grosso F, Silva L, Sousa C, Ramos H, Quinteira S, Peixe L. Extending the reservoir of bla IMP-5: the emerging pathogen *Acinetobacter bereziniae*. *Future Microbiol*. 2015;10(10):1609–13.
131. Pont AC. A revision of Australian Fanniidae (Diptera : Calypttrata). *Aust J Zoo Supps* [Internet]. 1977 [citado 25 de outubro de 2021];25(51):1–60. Disponível em: <https://www.publish.csiro.au/zs/ajzs051>
132. Castillo-Ramírez S, Mateo-Estrada V, Gonzalez-Rocha G, Opazo-Capurro A. Phylogeographical Analyses and Antibiotic Resistance Genes of *Acinetobacter johnsonii* Highlight Its Clinical Relevance. *mSphere* [Internet]. 26 de agosto de 2020 [citado 23 de outubro de 2020];5(4). Disponível em: <https://msphere.asm.org/content/5/4/e00581-20>
133. Feng Y, Yang P, Wang X, Zong Z. Characterization of *Acinetobacter johnsonii* isolate XBB1 carrying nine plasmids and encoding NDM-1, OXA-58 and PER-1 by genome sequencing. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. janeiro de 2016 [citado 23 de outubro de 2020];71(1):71–5. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkv324>
134. Zong Z, Zhang X. blaNDM-1-carrying *Acinetobacter johnsonii* detected in hospital sewage. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 1º de maio

de 2013 [citado 23 de outubro de 2020];68(5):1007–10. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dks505>

135. Tang L, Shen W, Zhang Z, Zhang J, Wang G, Xiang L, et al. <p>Whole-Genome Analysis of Two Copies of <em>bla</em><sub>NDM-1</sub> Gene Carrying <em>Acinetobacter johnsonii</em> Strain Acsw19 Isolated from Sichuan, China</p>. IDR [Internet]. 23 de março de 2020 [citado 23 de agosto de 2021];13:855–65. Disponível em: <https://www.dovepress.com/whole-genome-analysis-of-two-copies-of-blandm-1-gene-carrying-acinetob-peer-reviewed-fulltext-article-IDR>
136. López-Leal G, Santamaria RI, Cevallos MÁ, Gonzalez V, Castillo-Ramírez S. *Letter to the Editor: Prophages Encode Antibiotic Resistance Genes in Acinetobacter baumannii*. Microbial Drug Resistance [Internet]. 1º de outubro de 2020 [citado 23 de outubro de 2020];26(10):1275–7. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2019.0362>
137. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular Characterization of a  $\beta$ -Lactamase Gene, blaGIM-1, Encoding a New Subclass of Metallo- $\beta$ -Lactamase. Antimicrobial Agents and Chemotherapy [Internet]. 1º de dezembro de 2004 [citado 25 de outubro de 2021];48(12):4654–61. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.48.12.4654-4661.2004>
138. Rieber H, Frontzek A, von Baum H, Pfeifer Y. Emergence of metallo- $\beta$ -lactamases GIM-1 and VIM in multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa in North Rhine–Westphalia, Germany. Journal of Antimicrobial Chemotherapy [Internet]. 1º de abril de 2012 [citado 25 de outubro de 2021];67(4):1043–5. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkr579>
139. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. Journal of Antimicrobial Chemotherapy [Internet]. 1º de fevereiro de 2010 [citado 25 de outubro de 2021];65(2):233–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkp428>
140. Tognim MCB, Gales AC, Penteado AP, Silbert S, Sader HS. Dissemination of IMP-1 Metallo- $\beta$ -Lactamase–Producing Acinetobacter Species in a Brazilian Teaching Hospital. Infection Control & Hospital Epidemiology [Internet]. julho de 2006 [citado 25 de outubro de 2021];27(7):742–7. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/infection-control-and-hospital-epidemiology/article/abs/dissemination-of-imp1-metallolactamaseproducing-acinetobacter-species-in-a-brazilian-teaching-hospital/8CF733B579876420FE487182A864BB2F>
141. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). Diagn Microbiol Infect Dis. agosto de 2012;73(4):354–60.
142. Macovei L, Zurek L. Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of enterococci from houseflies collected in food settings. Appl Environ Microbiol. junho de 2006;72(6):4028–35.

143. Macovei L, Miles B, Zurek L. Potential of houseflies to contaminate ready-to-eat food with antibiotic-resistant enterococci. *J Food Prot.* fevereiro de 2008;71(2):435–9.
144. Miller WR, Murray BE, Rice LB, Arias CA. Vancomycin-Resistant Enterococci: Therapeutic Challenges in the 21st Century. *Infect Dis Clin North Am.* junho de 2016;30(2):415–39.
145. Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, organizadores. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014 [citado 7 de outubro de 2021]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190420/>
146. Heidari H, Hasanpour S, Ebrahim-Saraie HS, Motamedifar M. High Incidence of Virulence Factors Among Clinical *Enterococcus faecalis* Isolates in Southwestern Iran. *Infect Chemother* [Internet]. março de 2017 [citado 18 de maio de 2021];49(1):51–6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5382050/>
147. Zalipour M, Esfahani BN, Halaji M, Azimian A, Havaei SA. Molecular Characterization Of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Among Inpatients At Iranian University Hospitals: Clonal Dissemination Of ST6 And ST422. *Infect Drug Resist.* 2019;12:3039–47.
148. Choi J-M, Woo G-J. Molecular characterization of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* from chicken meat in Korea. *International Journal of Food Microbiology* [Internet]. 1º de julho de 2013 [citado 18 de maio de 2021];165(1):1–6. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160513001141>
149. Niu H, Yu H, Hu T, Tian G, Zhang L, Guo X, et al. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme and virulence genes among enterococci with high-level aminoglycoside resistance in Inner Mongolia, China. *Brazilian Journal of Microbiology* [Internet]. 1º de julho de 2016 [citado 18 de maio de 2021];47(3):691–6. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838216302660>
150. Willems RJL, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis.* junho de 2005;11(6):821–8.
151. Ekdahl K, Normann B, Andersson Y. Could flies explain the elusive epidemiology of campylobacteriosis? *BMC Infectious Diseases* [Internet]. 7 de março de 2005 [citado 14 de outubro de 2021];5(1):11. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-11>
152. BR Cast [Internet]. [citado 12 de novembro de 2021]. Disponível em: <http://brcast.org.br/>
153. Ahmad A, Nagaraja TG, Zurek L. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to cattle by house flies. *Preventive Veterinary Medicine* [Internet]. 15 de junho de

2007 [citado 28 de outubro de 2020];80(1):74–81. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587707000189>

154. Teixeira N, Varahan S, Gorman MJ, Palmer KL, Zaidman-Remy A, Yokohata R, et al. *Drosophila* host model reveals new enterococcus faecalis quorum-sensing associated virulence factors. *PLoS One*. 2013;8(5):e64740.
155. Doud CW, Scott HM, Zurek L. Role of House Flies in the Ecology of *Enterococcus faecalis* from Wastewater Treatment Facilities. *Microb Ecol* [Internet]. fevereiro de 2014 [citado 11 de janeiro de 2021];67(2):380–91. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00248-013-0337-6>
156. Ghosh A, Akhtar M, Holderman C, Zurek L. Significance and survival of Enterococci during the house fly development. *J Med Entomol*. janeiro de 2014;51(1):63–7.
157. Chambers MC, Jacobson E, Khalil S, Lazzaro BP. Consequences of chronic bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. 2019;14(10):e0224440.
158. O’Driscoll T, Crank CW. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist*. 2015;8:217–30.
159. Rushton-Green R, Darnell RL, Taiaroa G, Carter GP, Cook GM, Morgan XC. Agricultural Origins of a Highly Persistent Lineage of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* in New Zealand. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 17 de junho de 2019 [citado 4 de junho de 2021];85(13). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6581176/>
160. Ahmed MO, Baptiste KE. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. *Microbial Drug Resistance* [Internet]. 23 de outubro de 2017 [citado 9 de maio de 2021];24(5):590–606. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/mdr.2017.0147>
161. Osman KM, Badr J, Orabi A, Elbehiry A, Saad A, Ibrahim MDS, et al. Poultry as a vector for emerging multidrug resistant *Enterococcus* spp.: First report of vancomycin (van) and the chloramphenicol-florfenicol (cat-fex-cfr) resistance genes from pigeon and duck faeces. *Microb Pathog*. março de 2019;128:195–205.
162. Ejaz H. Emerging resistance of van genotype in enterococci: A potential menace for therapeutic failure. *Pak J Med Sci* [Internet]. 2019 [citado 7 de outubro de 2021];35(6):1659–63. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6861490/>
163. Nacional I. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 81, DE 19 DE DEZEMBRO DE 2018 - Imprensa Nacional [Internet]. [citado 23 de agosto de 2021]. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia>
164. Wei T, Ishida R, Miyanaga K, Tanji Y. Seasonal variations in bacterial communities and antibiotic-resistant strains associated with green bottle flies (

Diptera: Calliphoridae ). Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 1º de maio de 2014 [citado 18 de fevereiro de 2021];98(9):4197–208. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5498-1>

165. Graham JP, Price LB, Evans SL, Graczyk TK, Silbergeld EK. Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. Sci Total Environ. 1º de abril de 2009;407(8):2701–10.
166. Kosmann et al. - 2017 - Lista das espécies de Calliphoridae (Diptera, Oest.pdf [Internet]. [citado 6 de outubro de 2021]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/isz/a/Xv946d3YC9B7mNdww875f8y/?format=pdf&lang=pt>
167. Liao W, Liu Y, Zhang W. Virulence evolution, molecular mechanisms of resistance and prevalence of ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: A review over the last 10 years. Journal of Global Antimicrobial Resistance [Internet]. 1º de dezembro de 2020 [citado 26 de outubro de 2020];23:174–80. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716520302356>
168. Yarlagadda K, Shrimanker I, Nookala VK. Catheter-associated *Hafnia alvei*-induced Urosepsis. Cureus. 26 de dezembro de 2019;11(12):e6471.
169. Ramos A, Dámaso D. Extraintestinal infection due to *Hafnia alvei*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. setembro de 2000;19(9):708–10.
170. Zhang R-G, Tan X, Liang Y, Meng T-Y, Liang H-Z, Lv J 2014. Description of *Chishuiella changwenlii* gen. nov., sp. nov., isolated from freshwater, and transfer of *Wautersiella falsenii* to the genus *Empedobacter* as *Empedobacter falsenii* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [Internet]. [citado 18 de maio de 2021];64(Pt\_8):2723–8. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.063115-0>
171. Giordano C, Falleni M, Capria A-L, Caracciolo F, Petrini M, Barnini S. First report of *Wautersiella falsenii* genomovar 2 isolated from the respiratory tract of an immunosuppressed man. IDCases [Internet]. 1º de janeiro de 2016 [citado 18 de maio de 2021];4:27–9. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214250916300105>
172. Chaiwong T, Srivoramas T, Sueabsamran P, Sukontason K, Sanford MR, Sukontason KL. The blow fly, *Chrysomya megacephala*, and the house fly, *Musca domestica*, as mechanical vectors of pathogenic bacteria in Northeast Thailand. Trop Biomed. junho de 2014;31(2):336–46.
173. Sankararaman S, Velayuthan S. *Bacillus cereus*. Pediatr Rev. abril de 2013;34(4):196–7.
174. Rosenberg G, Steinberg N, Oppenheimer-Shaanan Y, Olender T, Doron S, Ben-Ari J, et al. Not so simple, not so subtle: the interspecies competition

between *Bacillus simplex* and *Bacillus subtilis* and its impact on the evolution of biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2016;2:15027.

175. Nazari M, Mehrabi 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 Diagn Res*. abril de 2017;11(4):DC04–7.
176. Onwugamba FC, Mellmann A, Nwaugo VO, Süselbeck B, Schaumburg F. Antimicrobial resistant and enteropathogenic bacteria in “filth flies”: a cross-sectional study from Nigeria. *Sci Rep*. 12 de outubro de 2020;10(1):16990.
177. Goldstein EJC, Tyrrell KL, Citron DM. *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clin Infect Dis*. 15 de maio de 2015;60 Suppl 2:S98-107.
178. Eisenbach L, Geissler AJ, Ehrmann MA, Vogel RF. Comparative genomics of *Lactobacillus sakei* supports the development of starter strain combinations. *Microbiol Res*. abril de 2019;221:1–9.
179. Montanari C, Barbieri F, Magnani M, Grazia L, Gardini F, Tabanelli G. Phenotypic Diversity of *Lactobacillus sakei* Strains. *Front Microbiol*. 2018;9:2003.
180. van den Broek PJ. [*Staphylococcus aureus*, a successful pathogen]. *Ned Tijdschr Geneesk*. 31 de maio de 2003;147(22):1045–8.
181. Lam PW, Naimark DM, Leis JA. *Microbacterium* Peritonitis in Peritoneal Dialysis: A Case Report and Review. *Perit Dial Int*. fevereiro de 2018;38(1):9–13.
182. Yang H, Tang H, Chen X-X, Zhang C-J, Zhu P-P, Ding H, et al. Identification of Secretory Proteins in *Mycobacterium tuberculosis* Using Pseudo Amino Acid Composition. *BioMed Research International* [Internet]. 11 de agosto de 2016 [citado 25 de outubro de 2021];2016:e5413903. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/5413903/>
183. Amano J, Hase R, Otsuka Y, Tsuchimochi T, Noguchi Y, Igarashi S. Catheter-related bloodstream infection by *Microbacterium paraoxydans* in a pediatric patient with B-cell precursor acute lymphocytic leukemia: A case report and review of literature on *Microbacterium* bacteremia. *J Infect Chemother*. outubro de 2019;25(10):806–10.
184. Hirakawa TF, Costa FAA da, Vilela MC, Rigon M, Abensur H, Araújo MRE de. *Lactococcus garvieae* endocarditis: first case report in Latin America. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* [Internet]. novembro de 2011 [citado 18 de maio de 2021];97(5):e108–10. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0066-782X2011001400016&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0066-782X2011001400016&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)
185. Vendrell D, Balcázar JL, Ruiz-Zarzuola I, de Blas I, Gironés O, Múzquiz JL. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. julho de 2006;29(4):177–98.

186. Evers EG, Blaak H, Hamidjaja RA, de Jonge R, Schets FM. A QMRA for the Transmission of ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Campylobacter* from Poultry Farms to Humans Through Flies. *Risk Anal.* fevereiro de 2016;36(2):215–27.
187. 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. *Nature Microbiology* [Internet]. 6 de fevereiro de 2017 [citado 22 de novembro de 2020];2(4):1–7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol2016260>
188. Wang Y, Xu C, Zhang R, Chen Y, Shen Y, Hu F, et al. Changes in colistin resistance and mcr-1 abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. *The Lancet Infectious Diseases* [Internet]. 1º de outubro de 2020 [citado 17 de maio de 2021];20(10):1161–71. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309920301493>

## 8 APÊNDICES E/OU ANEXOS

Tabela relevante em relação a uma apresentação facultativa seguindo as recomendações do CLSI 2019 para TSA com as mesmas cepas apresentadas no presente estudo.

Cepa	Identificação	TET	IMP	ERT	CAZ	CLOR	GEN	VAN	CIP	TMP-SMX
147	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	24*	16**	NC	17**	NC	ND	NC	18**	20*
148	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	23*	32*	NC	13***	NC	ND	NC	24**	17*
149	<i>Staphylococcus aureus</i>	22*	NC	NC	NC	22*	ND	NC	30*	ND
150	<i>Enterococcus faecalis</i>	24*	NC	NC	ND	24*	ND	18*	20**	ND
151	<i>Enterococcus faecalis</i>	28*	NC	NC	ND	28*	ND	18*	22*	ND
152	<i>Wautersiella falsenii</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
153	<i>Enterococcus faecalis</i>	20*	NC	NC	ND	20*	ND	ND	27*	ND
155	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	12**	12***	ND	13**	NC	ND	NC	23**	15**

156	<i>Enterococcus faecalis</i>	26*	NC	NC	ND	20*	ND	16**	16**	ND
157	<i>Enterococcus faecalis</i>	26*	NC	ND	ND	22*	ND	18*	18**	ND
158	<i>L. garvieae</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
159	<i>Enterococcus faecalis</i>	28*	NC	NC	ND	24*	ND	18*	22*	ND
160	<i>Hafnia alvei</i>	6***	ND	4**	NC	5***	7***	ND	NC	ND
162	<i>Enterococcus faecalis</i>	30*	NC	NC	ND	NC	ND	18*	22*	ND
165	<i>Lactobacillus sakei</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
166	<i>Bacillus cereus</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
167	<i>Bacillus cereus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
168	<i>Bacillus cereus</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
169	<i>Pseudomonas fulva</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
170	<i>Enterococcus faecalis</i>	20*	NC	NC	ND	22*	ND	18*	26*	ND
171	<i>Bacillus cereus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
172	<i>Bacillus cereus</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
173	<i>Bacillus cereus</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
174	<i>Bacillus cereus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
175	<i>Providencia alcalifaciens</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

176	<i>Providencia alcalifaciens</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
177	<i>Hafniaalveii</i>	20*	24*	22*	NC	20*	ND	NC	NC	18*
178	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	6***	ND	NC	ND	NC	NC	NC	9***	ND
179	<i>Wautersiella falsenii</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
180	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	22*	32*	NC	22*	NC	ND	ND	NC	18*
181	<i>Bacillus cereus</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
182	<i>Enterococcus faecalis</i>	24*	NC	NC	ND	24*	ND	16**	20**	ND
183	<i>Enterococcus faecalis</i>	26*	NC	NC	ND	20*	ND	18*	20**	ND
184	<i>Glutamicibacter mysorens</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
185	<i>Enterococcus faecalis</i>	26*	NC	NC	ND	24*	ND	18*	22*	ND
186	<i>Enterococcus faecalis</i>	28*	NC	NC	ND	22*	ND	18*	20**	ND
187	<i>Enterococcus faecalis</i>	10*	NC	NC	ND	10***	ND	ND	7***	ND
188	<i>Glutamicibacter protophormiae</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

189	<i>Enterococcus faecalis</i>	10***	NC	NC	ND	8***	ND	ND	7***	ND
190	<i>Enterococcus faecalis</i>	ND	NC	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
191	<i>Enterococcus faecalis</i>	ND	NC	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
192	<i>Enterococcus faecalis</i>	18**	NC	NC	ND	26*	ND	18*	20**	ND
193	<i>Enterococcus faecalis</i>	30*	NC	NC	ND	22*	ND	16**	20**	ND
194	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5***	NC	NC	NC	8***	4***	ND	10***	ND
197	<i>Bacillus cereus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
198	<i>Bacillus cereus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
201	<i>Bacillus simplex</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
202	<i>Enterococcus faecalis</i>	ND	NC	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
203	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
204	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ND	NC	NC	NC	ND	ND	ND	ND	ND

NC: Não consta no manual do BrCast; ND: Não determinado; CIP (Ciprofloxacina), CAZ (Ceftazidima), VAN (Vancomicina), IMP (Imipenem) GEN (Gentamicina), CLOR (Cloranfenicol), TET (Tetraciclina), ERT (Ertapenem), TMP-SMX (Sulfametoxazol-trimetoprim); \* (Susceptível); \*\* (Intermediário); \*\*\* (Resistentes); Cepas (Número na coleção de bactérias do LEMEF).