

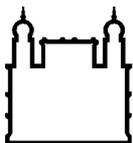
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

DÍPTEROS MUSCOIDES DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA:
LEVANTAMENTO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A
ANTIMICROBIANOS

JONATHAN CHRISTIAN OLIVEIRA LOPES

Rio de Janeiro
Novembro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

JONATHAN CHRISTIAN OLIVEIRA LOPES

Dípteros muscoides de importância sanitária: levantamento de bactérias resistentes a antimicrobianos

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane Zahner

RIO DE JANEIRO

Novembro de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

L864 Lopes, Jonathan Christian Oliveira

Dípteros muscoides de importância sanitária: levantamento de
bactérias resistentes a antimicrobianos / Jonathan Christian
Oliveira Lopes. – Rio de Janeiro, 2016.

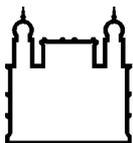
xix, 93 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-
Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2016.

Bibliografia: f. 73-93

1. Dípteros muscoides. 2. Bactérias. 3. Resistência a
antimicrobianos. I. Título.

CDD 595.77



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

AUTOR: JONATHAN CHRISTIAN OLIVEIRA LOPES

DÍPTEROS MUSCOIDES DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA: LEVANTAMENTO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Viviane Zahner

Aprovada em: 22/09/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Leon Rabinovitch - Presidente (IOC - Fiocruz)

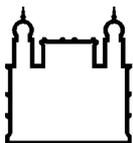
Prof. Dr. José Mario d'Almeida (UFF)

Prof^a. Dr^a. Maria Helena Simões Villas Bôas (INCQS - Fiocruz)

Prof^a. Dr^a. Margareth Maria de Carvalho Queiroz (IOC - Fiocruz)

Prof^a. Dr^a. Deyse Christina Vallim da Silva (IOC - Fiocruz)

Rio de Janeiro, 07 de novembro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Dedico este trabalho a Deus e a
minha família, sem os quais eu
não seria o que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é o meu Senhor, meu Pai e meu melhor amigo. Posso dizer, sem sombra de dúvidas, que se não fosse por Ele, demonstrando todo seu amor e bondade para comigo, eu não teria chegado aqui.

Não posso deixar de agradecer aos meus pais, Edmilson e Andrea, por todo o apoio em cada etapa de minha vida, e agora não foi diferente. Quando eu pensei que não iria conseguir concluir, vocês me encorajaram a continuar.

Agradeço ao meu irmão, Juninho, por todo o companheirismo e a minha tia “coruja” Ozelia, por sempre orar e torcer por mim. Agradeço também a todos os meus familiares: avós, tios e primos.

Não há como não falar dos meus amigos. Muito obrigado por toda a força que vocês sempre dão. Se eu tentar listar nomes, eu poderia esquecer de alguém. Cada um tem um lugar especial na minha vida.

Não tenho palavras suficientes para agradecer a minha orientadora, Prof^a Dr^a Viviane Zahner. Orientar no mestrado um aluno que não fez iniciação científica e totalmente cru no que diz respeito a vida científica não é tarefa fácil. Você não apenas topou este desafio, mas acreditou em mim mais do que eu mesmo. E mesmo quando eu tirei sua paciência, você não desistiu de mim e deste projeto. Muito obrigado!

Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Entomologia Médica e Forense pela conviência neste período. Agradeço à Dra. Margareth Queiroz por me receber em seu laboratório e a todos os demais colegas.

Obrigado Jéssica, Isabel, Lorrane e Isadora por toda a ajuda prestada nos pequenos e grandes favores, principalmente nesta fase final.

Agradeço também à Dra. Paloma Mendonça e ao Prof. Lucas Cortinhas por toda a prestatividade em dividirem o seu conhecimento de entomologia.

Muito obrigado Luiz Eduardo D'elia Oliveira e Carlos Dutok Sánchez por todas as risadas que demos juntos quando íamos além do horário de expediente no laboratório. Obrigado também por ouvirem os meus desabafos.

Não posso deixar de agradecer à Dra. Maria Helena Villas-Boas e a Dra. Karyne Rangel por cederem espaço e equipamentos de seu laboratório para técnicas essenciais neste trabalho.

Agradeço também à Dra. Luciane Medeiros pela colaboração com a técnica de MALDI-TOF, que foi imprescindível para a conclusão deste trabalho.

Agradeço também à Dra. Renata Picão pelo fornecimento das amostras controle para as reações de PCR.

Agradeço também ao Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, a minha nova casa na Fiocruz, pela acolhida e pela torcida para a conclusão deste mestrado. Muito obrigado, Dra. Marilda Siqueira, pela liberação para que eu pudesse concluir este mestrado.

Meu muito obrigado à querida Jalusy Bezerra, que ouviu todos os meus desabafos nos momentos em que o nervosismo apertou.

Obrigado aos amigos do café no Pavilhão Hélio e Peggy Pereira. Vocês alegram meu dia.

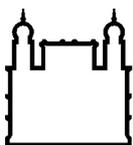
Minha gratidão também aos professores que fizeram parte da minha jornada até aqui, investindo na minha formação. E entre eles, não posso deixar de honrar a professora Regina Reis, que me incentivou a fazer o Curso de Especialização Técnica em Biologia Parasitária e Biotecnologia em 2011, marcando o começo da minha trajetória nesta instituição. Obrigado por acreditar no meu potencial e continuar torcendo por mim.

Por último, mas não menos importante, agradeço à revisora e à banca examinadora pelas contribuições. Muito obrigado também ao Curso de Pós-graduação em Biodiversidade e Saúde por esta grande oportunidade e ao Instituto Oswaldo Cruz, pela concessão de fomento necessário para este trabalho.

“Bendirei ao Senhor pra sempre
Proclamarei que o Senhor é bom”
(Nívea Soares)

“E sabemos que todas as coisas
contribuem juntamente para o bem
daqueles que amam a Deus,
daqueles que são chamados
segundo o seu propósito.”
(Romanos 8.28 – Bíblia Sagrada)

“Só há duas maneiras de viver a
vida: a primeira é vivê-la como se os
milagres não existissem. A segunda
é vivê-la como se tudo fosse
milagre.”
(Albert Einstein)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

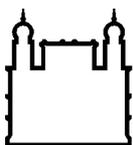
DÍPTEROS MUSCOIDES DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA: LEVANTAMENTO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Jonathan Christian Oliveira Lopes

Este trabalho teve como objetivo a prospecção e identificação de bactérias resistentes a β -lactâmicos transportadas por dípteros muscoides na cidade do Rio de Janeiro, além da pesquisa de genes de resistência a um grupo de antimicrobianos nas mesmas. Foram realizadas 18 coletas em vários pontos da cidade do Rio de Janeiro, obtendo dípteros das famílias Caliphoridae, Muscidae, Sarcophagidae, Fannidae, Ulidiidae e outros “acaliptrados”. Destas coletas, foram obtidos 172 isolados, dos quais 166 foram submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos, baseado no *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) 2014, utilizando-se empiricamente os critérios para Enterobacteriaceae, onde 80 apresentaram fenótipos intermediários ou de resistência. Estes isolados foram identificados por sequenciamento do gene 16S rRNA e/ou Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz: tempo de voo (MALDI-TOF EM). Amostras não resistentes também foram identificadas por MALDI-TOF EM para estimar a diversidade bacteriana. As técnicas de MALDI-TOF EM e/ou sequenciamento do gene 16S rRNA identificaram 82 estirpes dos gêneros *Myroides*, *Proteus*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Acinetobacter*. As amostras que, por MALDI-TOF EM foram identificadas como *Proteus penneri/vulgaris* foram diferenciadas por testes bioquímicos. A pesquisa dos genes de resistência apresentou resultados negativos. A pesquisa pelo gene de virulência *hblA* em *Bacillus cereus* apresentou resultado positivo. A análise de polimorfismo genético em *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas* sp. revelou alta similaridade entre os nossos isolados provenientes de diversas localidades do Campus Fiocruz e do Campo de Santana. O presente trabalho mostrou a diversidade de bactérias patogênicas transportadas por dípteros muscoides, além da possibilidade destes dípteros estarem transportando bactérias pertencentes a um mesmo genótipo pelo Rio de Janeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

HEALTH IMPORTANCE DIPTERAEE: ANTIMICROBIAL RESISTANT BACTERIA ASSESSMENT

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Jonathan Christian Oliveira Lopes

This study aimed to carry out the exploration and identification of bacteria resistant to β -lactam antibiotics transported by dipterae in Rio de Janeiro as well as the research for antibiotic resistance genes in these bacteria. 18 collections were made in various locations at Rio de Janeiro city, obtaining flies from Calliphoridae, Muscidae, Sarcophagidae, Fannidae and Ulidiidae families, besides other "acalyprate" flies. From these collections, 172 bacterial samples were obtained, 166 among them were submitted to sensibility test to antimicrobial agents, based on *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) 2014, using Enterobacteriaceae criteria empirically, where 80 showed intermediate or resistant phenotypes. These samples were identified by 16S rRNA gene sequencing and/or Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Not resistant samples were also identified by MALDI-TOF MS to assess bacterial diversity. Using 16S rRNA gene sequencing and/or MALDI-TOF MS, 82 bacteria strains from *Myroides*, *Proteus*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* and *Acinetobacter* genera were identified. Samples identified as *Proteus penneri* and *Proteus vulgaris* using MALDI-TOF MS were subjected to biochemical tests to confirm their identities. Resistance genes research obtained negative results. Virulence gene *hblA* research in *Bacillus cereus* showed positive results. Genetic polymorphism analysis in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas* sp. strains revealed a high similarity among our isolates from various locations at Campus Fiocruz and Campo de Santana. The present study showed the high diversity of pathogenic bacteria carried by dipterae, as well as the possibility of the transport by dipterae of bacteria belonging to the same genotype in Rio de Janeiro.

ÍNDICE

RESUMO.....viii

ABSTRACT.....ix

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Dípteros muscoides.....	1
	1.1.1 Muscidae.....	1
	1.1.2 Calliphoridae.....	2
	1.1.3 Sarcophagidae.....	3
	1.1.4 Faniidae.....	3
	1.1.5 Dípteros acalitrados.....	3
1.2	Infecções relacionadas a assistência em saúde e bactérias patogênicas.....	4
	1.2.1 Infecções relacionadas a assistência em saúde.....	4
	1.2.2 Bastonetes Gram-negativos não-fermentadores.....	5
	1.2.3 Enterobacteriaceae.....	7
	1.2.4 <i>Enterococcus</i>	8
	1.2.5 <i>Streptococcus</i>	8
	1.2.6 <i>Staphylococcus</i>	9
	1.2.7 <i>Bacillus</i>	10
1.3	Antimicrobianos.....	10
	1.3.1 β -lactâmicos.....	11
	1.3.2 Tetraciclinas.....	13
	1.3.3 Aminoglicosídeos.....	13
	1.3.4 Macrolídeos e lincosamidas.....	14
	1.3.5 Glicopeptídeos e lipodepsipeptídeos.....	14
	1.3.6 Estreptograminas.....	15
	1.3.7 Cloranfenicol.....	15
	1.3.8 Rifamicinas.....	15
	1.3.9 Polimixinas.....	16

	1.3.10 Inibidores de β -lactamases.....	16
	1.3.11 Nitrofuranos.....	16
	1.3.12 Sulfonamidas.....	17
	1.3.13 Quinolonas e fluoroquinolonas.....	17
	1.3.14 Oxazolidinonas.....	18
1.4	Resistência aos antimicrobianos.....	18
	1.4.1 β -lactamases.....	18
	1.4.2 Multi-resistência.....	19
1.5	Métodos de identificação bacteriana.....	20
	1.5.1 Bioquímica convencional.....	20
	1.5.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA.....	21
	1.5.3 MALDI-TOF EM.....	22
1.6	Métodos de tipagem.....	23
	1.6.1 PFGE.....	23
	1.6.2 Outros métodos.....	24
2	JUSTIFICATIVA.....	26
3	OBJETIVOS.....	26
	3.1 Objetivos gerais.....	26
	3.2 Objetivos específicos.....	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
	4.1 Coleta e identificação de dípteros muscoides.....	27
	4.2 Isolamento de bactérias e estocagem.....	28
	4.3 Coloração de Gram.....	29
	4.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	29
	4.5 Extração de DNA.....	30
	4.6 Identificação bacteriana.....	32
	4.6.1 Sequenciamento do gene 16S rRNA.....	32
	4.6.2 MALDI-TOF EM.....	32

4.6.3	Bioquímica convencional.....	33
4.7	Detecção de genes de resistência.....	33
4.8	Detecção do gene de virulência <i>hblA</i>	37
4.9	Análise do polimorfismo genético através de PFGE...37	
5	RESULTADOS.....	38
5.1	Coleta e identificação de dípteros muscoides.....	38
5.2	Isolamento de amostras bacterianas.....	42
5.3	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos e identificação bacteriana.....	48
5.4	Detecção de genes de resistência e virulência.....	56
5.5	Análise do polimorfismo genético através de PFGE....	57
6	DISCUSSÃO.....	60
7	CONCLUSÕES.....	72
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação dos antimicrobianos mais comumente utilizados na prática clínica para tratamento de infecções bacterianas segundo Tenover, 2006.....	11
Figura 2 – Armadilha com garrafa PET colocada próxima ao abrigo de resíduos do INI.....	28
Figura 3 – Abrigo de resíduos hospitalares do INI.....	28
Figura 4 – Crescimento bacteriano proveniente da diluição 10^{-3} de macerado da espécie <i>C. megacephala</i> em meio ágar nutriente sem antibiótico.....	29
Figura 5 – Crescimento bacteriano proveniente da diluição 10^{-3} de macerado da espécie <i>C. megacephala</i> em meio ágar nutriente com antibiótico.....	29
Figura 6 – Dípteros muscoides coletados ao longo deste estudo.....	39
Figura 7 – Quantidade de bactérias por espécie identificadas por MALDI-TOF EM.....	48
Figura 8 – Resultado de antibiograma, que demonstrou resistência às cefalosporinas e apresentou resultado intermediário para o carbapenema.....	55
Figura 9 – Testes bioquímicos. Da esquerda para a direita – ornitina (positiva), SIM (H ₂ S negativo, indol positivo, móvel) e citrato negativo.....	56
Figura 10 – Testes bioquímicos. Da esquerda para a direita – ornitina (negativa), SIM (H ₂ S positivo, indol positivo, móvel) e citrato negativo.....	56
Figura 11 – Gel de agarose 1,5% com controles positivos utilizados na reação de PCR para a detecção dos genes de resistência.....	57
Figura 12 – Gel 1 de PFGE dos isolados identificados como <i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>Pseudomonas</i> sp.....	58
Figura 13 – Gel 2 de PFGE dos isolados identificados como <i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>Pseudomonas</i> sp.....	58
Figura 14 – Gel 3 de PFGE dos isolados identificados como <i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>Pseudomonas</i> sp.....	59
Figura 15 – Gel 4 de PFGE dos isolados identificados como <i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>Pseudomonas</i> sp.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados epidemiológicos sobre alguns microrganismos isolados neste estudo.....	4
Tabela 2 – Iniciadores utilizados na detecção de genes de resistência.....	33
Tabela 3 – Datas, locais, modos de coleta e quantidades de dípteros muscoides coletados.....	40
Tabela 4 – Contagem de UFC/mL.....	43
Tabela 5 – Características morfotintoriais dos isolados bacterianos.....	44
Tabela 6 – Identificação e resistência aos antimicrobianos dos isolados bacterianos deste estudo.....	49
Tabela 7 – Identificação bioquímica das amostras de <i>Proteus penneri/vulgari</i>	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	grau Celsius
µL	microlitro
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism/ Polimorfismo de Comprimentos de Amplificação
ATCC	American Type Culture Collection
BGN-NF	Bastonetes Gram-negativos não-fermentadores
BHI	Brain Heart Infusion/ Infusão de cérebro-coração
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRIJ	Polyethylene glycol hexadecyl ether
Ca	cálcio
CA-MRSA	Community associated – Methicilin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> / <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina associado a comunidade
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Petersen
CAZ	ceftazidima
CDC	Centers for Disease Control/ Centro de Controle de Doenças
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
cm	centímetro
CoNS	Coagulase-negative staphylococci/ Estafilococos coagulase negativa
CTX-M	Beta-lactamase Cefotaximase
DAEC	Diffusely adherent <i>Escherichia coli</i> / <i>Escherichia coli</i> de aderência difusa
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid/ Ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleotídeo
EAEC	Enteroggregative <i>Escherichia coli</i> / <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid/ Ácido etilenodiamino tetra-acético

EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> / <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> / <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ESBL	Extended spectrum beta-lactamase/ β -lactamase de espectro estendido
et al	e colaboradores
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> / <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
FEP	cefepime
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
g	grama
GIM	“German imipenemase”
h	hora
H ₂ S	sulfeto de hidrogênio
HA-MRSA	Hospital-acquired methicilin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> / <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina adquirido no hospital
HBL	hemolisina BL
HCl	ácido clorídrico
HIV	Human Immunodeficiency Virus/ Vírus da Imunodeficiência Humana
IMP	“active on imipenem”
INCQS	Instituto Nacional de Controle Qualidade em Saúde
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	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
L	litro
LA-MRSA	Livestock-associated methicilin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> / <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina associado ao gado

LPS	lipopolissacarídeos
M	molar
MALDI-TOF EM	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry/ Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz: tempo de voo
MEM	meropenem
Mg	magnésio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	minuto
mL	mililitro
MLST	Multi-locus sequence type
mM	milimolar
MR-CoNS	Methicilin resistant coagulase-negative staphylococci/ Estafilococos coagulase negativos resistentes à meticilina
MRSA	Methicilin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> / <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND	não determinado
NHE	non-hemolytic enterotoxin/ enterotoxina não-hemolítica
NI	não identificado
NDM	New Delhi metalo-β-lactamase
ng	nanograma
OF	oxidação-fermentação
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-galactoside
OXA	“oxacillin hydrolyzing”
PABA	ácido para-amino-benzoico
pb	pares de base
PBP	penicilina binding protein/ proteínas ligadoras de penicilina
PBS	Phosphate buffered saline/ Tampão salina fosfato
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Reação em cadeia da polimerase
PET	Polietileno Tereftalato

PFGE	Polimorphisms field gel electrophoresis/ Polimorfismo em eletroforese de campo pulsado
pmol	picomol
PYR	pyrolidonyl aminopeptidase
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA/ Polimorfismo de DNA amplificado randomicamente
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism/ Polimorfismos de comprimentos de restirção
RNA	Ribonucleic acid/ Ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto
rpoB	subunidade beta da RNA polimerase
seg	segundo
SDS	Sodium dodecil sulfato/ Dodecil sulfato de sódio
SHV	Beta-lactamase <i>Sulphydryl variable</i>
SIM	“Seoul imipenemase”
SpeI	<i>Sphaerotilus species I</i> (enzima de restrição)
SPM	São Paulo metalo- β -lactamase
ST	“sequence type”
STEC	Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> / <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEM	Beta-lactamase Temoneira
tRNA	RNA transportador
TSA	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
TSS	Toxic shock syndrome/ Síndrome do choque tóxico
U	unidade
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
V	volt
VIM	“Verona integron-encoded metallo- β -lactamase”
VM	Vermelho de metila
VP	Voges-Proskauer

VRE

Vancomycin-resistant enterococci/ *Enterococcus* resistente
à vancomicina

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dípteros muscoides

Dípteros muscoides são considerados importantes vetores de patógenos para humanos e animais devido aos seus hábitos alimentares e reprodutivos e comportamento sinantrópico. Possuem ampla movimentação e capacidade de voar longas distâncias. São atraídos por matéria orgânica em decomposição e se movimentam entre fezes e carcaças além de estarem associados aos seres humanos, presentes em grande quantidade em áreas urbanas com condições insalubres (Bouamama et al. 2010; Barreiro et al. 2013; Liu et al. 2013; Blaak et al. 2014; Chaiwong et al. 2014).

Bactérias patogênicas associadas a espécies de dípteros muscoides são conhecidas. Existem relatos sobre *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) e *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) carreando *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia pseudomallei*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cloacae* e *Proteus mirabilis* (Chaiwong et al. 2014), entre outras. *M. domestica* foi relatada também como vetor de bactéria altamente virulenta, envolvida em surtos gastrointestinais, *E. coli* O157:H7 (Zurek & Gosh, 2014). Bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Myroides*, *Proteus*, *Providencia*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Clostridium*, *Klebsiella* e *Serratia* já foram isoladas a partir de larvas e adultos de sarcófagídeos (Gupta et al. 2014).

1.1.1. *Muscidae*

Esta família possui cerca de 4500 espécies descritas, apresentando hábitos variados (predadores, hematófagos, saprófagos ou necrófagos). Suas larvas ocupam habitats variados e, com isso, algumas (saprófagas e coprófagas) podem contribuir na reciclagem de nutrientes orgânicos, enquanto

outras (carnívoras), ao se alimentarem de larvas das espécies sinantrópicas, atuam na regulação destas populações (Couri & Carvalho, 2005b).

Musca domestica (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) é uma espécie cosmopolita, sendo considerada um problema em áreas urbanas sem o devido manejo sanitário (Muñoz & Rodríguez, 2015). Pode disseminar bactérias, protozoários, vírus e ovos de helmintos, que podem causar disenteria, diarreia, febre tifoide, intoxicação alimentar, cólera, helmintíase, infecções nosocomiais, entéricas e antropozoonóticas (Liu et al. 2013; Hemmatinezhad et al. 2015).

Em outras espécies de dípteros da mesma família, *Muscina stabulans* (Fällen, 1817) e *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758), já houve relato da presença de bactérias carreando o gene *bla*_{CTX-M-15} (Usui et al. 2013).

1.1.2. Calliphoridae

Os dípteros desta família são conhecidos como moscas-varejeiras no Brasil e estão amplamente distribuídos ao redor do mundo, nos mais variados ambientes. No Brasil, a distribuição destes dípteros mudou com a introdução do gênero *Chrysomya* (Robineau-Desvoidy, 1830) (Sousa et al. 2010).

Chrysomya megacephala (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae), juntamente com *M. domestica* apresenta importância médica e forense, além de causar irritações e miíases, sendo que a primeira desempenha um papel mais importante na transmissão de ovos de helmintos (Sukontason et al. 2007).

Chrysomya putoria (Wiedemann, 1818) (Diptera: Calliphoridae) está fortemente associada a latrinas, carreando bactérias causadoras de diarreia, além de outros parasitas como polivírus tipo I e III, vírus Coxsackie e *Giardia lamblia*, além de ter a capacidade de invadir tecidos necrosados produzindo miíases secundárias (Oliveira et al. 2007; Lindsay et al. 2012).

1.1.3. Sarcophagidae

Esta família apresenta cerca de 2.600 espécies descritas, apresentando grande importância na Entomologia Forense, juntamente com Calliphoridae, Muscidae, Fanniidae e Stratiomyidae. Uma característica desta família é o fato de a maioria de suas espécies ser ovovivípara, eliminando larvas de primeiro instar, que iniciam imediatamente sua alimentação na carcaça (Barros et al. 2008).

Os dípteros desta família também são conhecidos como causadores de miíases e vetores mecânicos de patógenos, podendo apresentar hábitos variados, como necrófago, coprófago, predador e parasitoide (Dharne et al. 2008; Yespes-Gaurisas et al. 2013).

1.1.4. Fanniidae

Esta família está presente em todas as regiões zoogeográficas, sendo mais comuns na Região Holártica. Os adultos são encontrados principalmente em áreas de floresta, enquanto suas larvas são saprófagas, habitando as mais variadas formas de matéria orgânica. Esta família também apresenta espécies que habitam ambientes com a presença humana, como *Fannia canicularis* (Linnaeus, 1761) e *Fannia scalaris* (Fabricius, 1794) e outras que habitam o peri-domicílio. Poucas espécies dessa família são registradas como produtores de miíases e vetores mecânicos de patógenos (Couri & Carvalho, 2005a).

1.1.5. Dípteros acaliptrados

Este não é um grupo monofilético, porém compartilham algumas características, como a redução ou ausência da calíptera, a ausência da sutura longitudinal no pedicelo e a incompleta sutura do tórax. Suas 80 famílias estão amplamente distribuídas mundialmente e apresentam hábitos variados, podendo ser minadores, galhadores, aquáticos, predadores e saprófagos (Fernandes, et al. 2012).

1.2 Infecções relacionadas à assistência em saúde e bactérias patogênicas

1.2.1. Infecções relacionadas à assistência em saúde

As infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS) são a principal causa de morte e morbidade em pacientes internados ao redor do mundo e entre as causas delas destacam-se os pacientes imunocomprometidos, os procedimentos invasivos, o ambiente hospitalar e o uso impróprio de antimicrobianos (Zhu et al. 2016).

Bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* são um problema de saúde pública, principalmente em pacientes hospitalizados, que normalmente estão imunocomprometidos, apresentando comorbidades e possuem capacidade limitada para combater a infecção (Huwaitat et al. 2016). Entre os patógenos Gram-positivos de importância estão enterococos resistentes à vancomicina (VRE), estreptococos multi-resistentes e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (Jones, 2001).

A tabela 1 traz uma visão geral de alguns microrganismos pertencentes aos grupos que serão abordados neste tópico e ao longo do estudo (Public Health Agency of Canada, 2001, 2010a,b,c, 2011a,b,c; Dakic et al. 2005; Dortet et al. 2006; Dordet-Frisoni et al. 2007; Dharne et al. 2008; Tibra et al. 2010; Barros et al. 2012 Martins & Barth, 2013; Scales et al. 2014; Çıkman et al. 2016; Feng et al. 2016).

Tabela 1 - Dados epidemiológicos sobre alguns microrganismos isolados neste estudo.

MICROORGANISMO	Classe de risco	DOSE INFECTANTE	HOSPEDEIRO	RESERVATÓRIO
<i>Acinetobacter</i> sp.	2	ND	humanos imunocomprometidos	solo, água, animais, vegetais e humanos saudáveis
<i>Acinetobacter ursingii</i>	2	ND	humanos imunocomprometidos	solo, água e ambientes secos
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2	ND	humanos	ambientes aquáticos
<i>Bacillus anthracis</i>	3	8 a 50 mil células	humanos e animais	solo

<i>Bacillus cereus</i>	2	10 ⁴ -10 ⁹ cel/g de alim.	humanos imunocomprometidos e animais	humanos, animais, fezes, organismos no solo, palha e alimentos
<i>Citrobacter sp.</i>	2	10 ⁷ células	homem, animais aquáticos	solo, água
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	1000 células	plantas, homens e animais	solo, água, trato intestinal, esgoto e leite
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	ND	humanos, animais domésticos e gado	trato gastrointestinal de mamíferos, aves, répteis e insetos
<i>Escherichia coli</i>	2	10 ⁶ células	humanos e animais	humanos e animais
<i>Micrococcus luteus</i>	1	ND	humanos, animais marinhos e mamíferos	humanos e animais
<i>Myroides sp.</i>	2	ND	humanos	ambientes úmidos, trato intestinal de insetos
<i>Proteus penneri</i>	2	ND	humanos	humanos, animais, solo, água, esgoto
<i>Proteus vulgaris</i>	2	ND	humanos	humanos, animais, solo, água, esgoto
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	ND	humanos, animais e plantas	humanos infectados, animais, água contaminada e solo
<i>Pseudomonas sp.</i>	2	ND	humanos, animais e plantas	humanos infectados
<i>Serratia marcescens</i>	2	ND	plantas, humanos e animais	solo, animais e humanos
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	2	ND	humanos	aves e humanos saudáveis
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	ND	humanos	ambiente hospitalar
<i>Staphylococcus sciuri</i>	1	ND	humanos	superfícies de animais e alimentos de origem animal
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2	ND	humanos	pele e mucosas de mamíferos e aves, solos e superfícies
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	ND	humanos com fatores de risco	ambientes aquáticos, solo e plantas

1.2.2. Bastonetes Gram-negativos não-fermentadores

Os Bastonetes Gram-negativos não-fermentadores (BGN-NF) são um grupo diversificado que tem uma grande distribuição na natureza, possuindo mais de 120 espécies consideradas patógenos oportunistas. As principais espécies envolvidas em infecções são *P. aeruginosa*, complexo *A. baumannii-calcoaceticus* e *Stenotrophomonas maltophilia* (Radice et al. 2011).

Pseudomonas aeruginosa e *Acinetobacter baumannii* são consideradas causas importantes de IRAS, principalmente em Unidade de Terapia Intensiva (UTIs) e o desenvolvimento de mecanismos de resistência a antimicrobianos, bem como a falta de opções terapêuticas, leva a altas taxas de mortalidade e morbidade em infecções relacionadas a esses patógenos (Labarca et al. 2016).

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno de importância na saúde pública e veterinária, ocupando diversos nichos no ambiente hospitalar devido a sua versatilidade nutricional, além de possuir vários fatores de virulência, que a tornam altamente patogênica (Lanini et al. 2011; Hemmatinezhad et al. 2015). As infecções por este patógeno têm sido tratadas com carbapenemas, porém tem crescido a incidência de isolados resistentes a estes antimicrobianos, devido a mecanismos como expressão de metalo-beta-lactamases, super-expressão de bombas de efluxo e alterações na expressão de porinas da membrana (Labarca et al. 2016; Araujo et al. 2016).

Em relação ao gênero *Acinetobacter*, na maioria das amostras clínicas é isolado o Complexo *A. baumannii-calcoaceticus*, formado pelas espécies *A. baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis* (Radice et al. 2011; Martins & Barth, 2013). Em países desenvolvidos e em desenvolvimento, 55% dos isolados de *A. baumannii* são resistentes aos carbapenemas e para tratamento, tem se recorrido a antimicrobianos como fosfomicina e polimixina B, o que também tem favorecido o aparecimento de isolados resistentes (Labarca et al. 2016; Menegucci et al. 2016). No Brasil já foi reportada a presença da metalo-beta-lactamase SPM-1 em *A. baumannii* (Jácome et al. 2016). Essa mesma espécie é capaz de lançar vesículas contendo DNA, e nessas vesículas já foram encontrados plasmídeos contendo genes para carbapenemases (Amábile-Cuevas, 2012).

Stenotrophomonas maltophilia é considerado um patógeno oportunista em IRAS e infecções em pacientes imunocomprometidos, sendo intrinsecamente resistente a vários antimicrobianos devido à produção de enzimas que o degrada, mecanismos de bombas de efluxo ou impermeabilidade de sua membrana plasmática (Radice et al. 2011). Presente em recursos hídricos, apresenta vários fatores de virulência, como DNase,

RNase, fibrinolisin, lipases, hialuronidase, protease e elastase (Çıkman et al. 2016).

1.2.3. Enterobacteriaceae

As infecções por patógenos multi-resistentes desta família, produtores de ESBLs (β -lactamase de espectro estendido – em inglês “Extended spectrum beta-lactamase”) e carbapenemases, cujo principal reservatório é o trato gastrointestinal, causam também alta morbidade e mortalidade, sendo um problema de saúde pública de âmbito mundial (Bar-Yoseph et al. 2016). *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Klebsiella* spp. são patógenos produtores de ESBL mais importantes do ponto de vista veterinário, sendo *E. coli* e *K. pneumoniae* frequentemente isolados em humanos também (Dahms et al. 2014). Os relatos de enterobactérias produtoras de carbapenemases aumentaram ao redor do mundo. No Brasil, por exemplo, foi relatada a presença da metalo-beta-lactamase NDM-1 em *Providencia rettgeri* e a co-produção de NDM-1 e KPC-2 em *Enterobacter hormaechei* (Poirel et al. 2012, Carvalho-Assef et al. 2013, Pereira et al. 2015).

Escherichia coli faz parte da microbiota intestinal humana, havendo cepas patogênicas que causam diarreia e infecções fora do trato intestinal. Essas cepas podem ser transmitidas por água e alimentos contaminados ou através do contato com pessoas e/ou animais. Podemos dividir as cepas causadoras de diarreia em seis tipos: *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (Centers for Disease Control and Prevention, 2015).

O gênero *Klebsiella* é um patógeno frequente e importante em pneumonias, septicemias, infecções do trato urinário, de feridas e em UTIs, causando também bacteremia e infecções no fígado. É um importante patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos, apresentando diversos fatores como adesinas, polissacarídeos capsulares e toxinas, que contribuem para a sua patogenicidade. Como patógenos humanos temos as

espécies *K. pneumoniae pneumoniae*, *K. pneumoniae ozaenae*, *K. pneumoniae rhinoscleromatis*, *K. oxytoca*, *K. granulomatis*, *K. variicola* e *K. singaporensis* (Public Health Agency of Canada, 2011d).

Salmonella spp. é uma bactéria entérica envolvida em intoxicações alimentares, causando surtos em vários países. A maioria dos sorotipos desse gênero são patogênicos ao homem, como *Salmonella typhi*, causadora da febre tifoide e *Salmonella paratyphi* A, B e C, agente etiológico da febre entérica (Shinohara et al. 2008).

1.2.4. Enterococcus

O gênero *Enterococcus* está envolvido em infecções do trato urinário, feridas e tecidos moles, sendo associado também a bacteremia que pode levar a endocardite. A espécie isolada mais frequentemente a partir de amostras intestinais humanas é *Enterococcus faecalis*, seguida pela espécie *Enterococcus faecium* (Public Health Agency of Canada, 2010b).

Considerando que *Enterococcus* é intrinsecamente resistente às cefalosporinas, as cepas conhecidas como VRE (*Enterococcus* resistentes a vancimicina), resistente aos glicopeptídeos, podem ser consideradas um patógeno relevante em infecções sistêmicas, que se agravam em pacientes imunocomprometidos. Essa resistência pode ser adquirida através de elementos genéticos móveis, tendo os genes *vanA* e *vanB* um papel importante nesse fato. Isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* apresentando essa resistência já foram obtidos a partir de homens e animais (Hörner et al. 2005; Dahms et al. 2014).

1.2.5. Streptococcus

O gênero *Streptococcus* é altamente diversificado e está relacionado a doenças humanas como cárie dentária, febre puerperal e septicemias. São classificados de acordo com a sua capacidade de hemólise em α -hemolíticos, que produzem hemólise parcial, como a espécie *S. pneumoniae*; β -hemolíticos,

que produzem hemólise total e são subdivididos em grupos (A a V) de acordo com os polissacarídeos em sua parede celular, como o *Streptococcus pyogenes*; e γ -hemolíticos, que não produzem hemólise (Nogueira & Miguel, 2010).

Streptococcus pneumoniae está presente nas mucosas da nasofaringe e trato respiratório superior. Ao migrar para partes estéreis do trato respiratório, causa inflamações. Está envolvido em agravos como pneumonia, otite média e meningite (Public Health Agency of Canada, 2011e).

As infecções por estreptococos do grupo A variam desde enfermidades leves como febre e impetigo até infecções sérias como fascite necrozante e síndrome do choque tóxico (TSS – “Toxic Shock Syndrome” em inglês). No caso do grupo B, as infecções acometem pessoas de todas as idades, como meningite, pneumonia e sepse em recém-nascidos e infecções em ossos, articulações, pele e tecidos moles em indivíduos adultos (Centers for Disease Control and Prevention, 2014, 2016a,b).

1.2.6. Staphylococcus

O gênero *Staphylococcus* apresenta mais de 30 espécies, sendo as espécies *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* frequentemente isoladas na prática clínica. Alguns destes microrganismos fazem a parte da microbiota da pele e mucosas, enquanto outros são patógenos que causam infecções, podendo levar a septicemias (Nogueira & Miguel, 2010).

Devido à sua capacidade de resistir à dessecação e ao frio, *S. aureus* é uma espécie amplamente distribuída, presente em áreas de circulação humana e tendo o ser humano como principal reservatório. Na década de 1970, foram isoladas as primeiras cepas resistentes à meticilina (*S. aureus* resistentes à meticilina – MRSA), que apresentam resistência a todos os β -lactâmicos e também a outros antimicrobianos como quinolonas e macrolídeos. A resistência à meticilina é codificada pelo gene *mecA*. Estas cepas podem ser agrupadas em MRSA adquiridas no ambiente hospitalar (HA-MRSA), MRSA

associada à comunidade (CA-MRSA) e MRSA associado ao gado (LA-MRSA) (Santos et al. 2007, Dahms et al. 2014).

Os estafilococos coagulase-negativa (CoNS) são comensais em humanos e animais, e não eram tidos como bactérias patogênicas até que fossem isolados como agentes etiológicos em IRAS. As espécies *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus lugdunensis* são as principais envolvidas em infecções. Há cepas de CoNS resistentes à meticilina (MR-CoNS), cujo mecanismo de resistência é semelhante ao encontrado em MRSA. Estes patógenos apresentaram um impacto crescente nos últimos 20 anos, inclusive como patógenos animais, provocando mastite em vacas leiteiras e pequenos ruminantes (Teixeira, 2009; Dahms et al. 2014).

1.2.7. Bacillus

Os microrganismos pertencentes a este gênero são aeróbios ou aeróbios facultativos e formadores de esporos, sendo sua maioria saprófita. As espécies de maior relevância clínica ao ser humano são *B. anthracis*, causador do antraz ou carbúnculo hemático e doenças sistêmicas nas formas digestiva e pulmonar, e *B. cereus*, associado à infecções cutâneas, bacteremia, septicemia e, principalmente, a intoxicações alimentares. Estas duas espécies fazem parte do grupo dos grandes *Bacillus*, com largura de 1µm ou mais, que conta também com as espécies *Bacillus mycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus cytotoxus* e *Bacillus thuringiensis* (Nogueira & Miguel, 2010; Rabinovitch & Oliveira, 2015).

1.3 Antimicrobianos

Antimicrobianos são substâncias naturais ou sintéticas que podem interferir no crescimento bacteriano (ação bacteriostática) ou levar a bactéria à morte (ação bactericida). A maioria dos antimicrobianos utilizados na prática

clínica são naturais e seus derivados semi-sintéticos, que compreendem os β -lactâmicos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídeos cíclicos (glicopeptídeos e lipodepsipeptídeos), estreptograminas, lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas, etc. Já os antimicrobianos de origem sintética compreendem as sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (Guimarães et al. 2010).

A combinação destes agentes pode produzir dois tipos de efeito, sinergismo e antagonismo. No sinergismo, os antimicrobianos tornam-se mais eficazes juntos do que individualmente, em contrapartida, no antagonismo, pode haver a inibição do efeito de um dos antimicrobianos envolvidos (Nogueira & Miguel, 2010).

A figura 1 apresenta uma síntese das principais classes de antimicrobianos com seus respectivos mecanismos de ação.

Mecanismo de ação	Mecanismo de ação específico	Classe (Exemplo de antimicrobianos)
Interferência na síntese da parede celular	Ligação as PBPs	Beta-lactâmicos (Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemas e Monobactâmicos)
	Inibição da enzima MurA	Fosfomicinas
	Ligação a D-alanina	Glicopeptídeos (Vancomicina e Teicoplanina)
Inibição da Síntese proteica	Ligam-se a subunidade ribossomal 50S	Cloranfenicol, Macrolídeos (Eritromicina), Lincosamidas (Clindamicina), Oxazolidinonas (Linezolida)
	Ligam-se a subunidade ribossomal 30S	Aminoglicosídeos (Amicacina e Gentamicina), Glicilicilina (Tigeciclina) e Tetracilinas
Interferência na síntese de ácidos nucleicos	Inibe a síntese de DNA	Quinolonas (Ciprofloxacina)
	Inibe a síntese de RNA	Rifampicina
Inibição de vias metabólicas	Inibe a via de síntese do ácido fólico	Sulfonamidas
Rompimento de membrana plasmática	Aumentam a permeabilidade da membrana	Polimixinas

Figura 1 – Classificação dos antimicrobianos mais comumente utilizados na prática clínica para tratamento de infecções bacterianas (Tenover, 2006).

1.3.1. β -lactâmicos

Possuem em seu núcleo estrutural o anel β -lactâmico, que promove a atividade bactericida. Neste grupo estão incluídas as penicilinas, as cefalosporinas, os carbapenemas e os monobactâmicos. Seu mecanismo de atuação está na interferência da síntese do peptídeoglicano (responsável pela

integridade da parede bacteriana). Para que isso ocorra é necessária a penetração através de porinas que estão localizadas na membrana externa de bactérias Gram-negativas e, conseqüentemente, uma ligação às proteínas ligadoras de penicilina (PBP), que cumprem a última parte no processo de síntese da parede bacteriana (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2007a).

As penicilinas, devido ao seu baixo custo e boa eficácia, são os antimicrobianos de primeira escolha no tratamento de infecções por agentes encapsulados sensíveis (pneumonia pneumocócica, abscesso cerebral, meningite bacteriana), na sífilis (neurosífilis congênita, gestacional, associada ao HIV), e de profilaxia primária e secundária na febre reumática e na glomerulonefrite pós-estreptocócica (Rosário & Grumach, 2006).

As cefalosporinas estão diretamente correlacionadas às penicilinas, estrutural e funcionalmente, possuindo análogos estruturais, as cefamicinas. Elas são classificadas em primeira, segunda, terceira, quarta e quinta geração. Juntamente com as penicilinas, atuam inibindo a transpeptidase, o que impede a última molécula de glicina de ligar-se ao quarto resíduo do pentapeptídeo, prejudicando a formação do peptidoglicano, e evitando a formação do glicopeptídeo na parede celular, devido a sua ligação às PBPs. As cefalosporinas são consideradas inibidores seletivos da síntese da parede celular (Nogueira & Miguel, 2010).

Os carbapenemas atualmente são os antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por bactérias multi-resistentes aos antimicrobianos. Estão disponíveis no Brasil: imipenem, meropenem e ertapenem. Imipenem apresenta atividade levemente superior contra Gram-positivos se comparado ao meropenem, cuja atividade é maior em Gram-negativos. Ertapenem não apresenta atividade contra *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2007b; Cantón et al. 2014).

Os monobactâmicos são mais estáveis à hidrólise pelas β -lactamases, quando comparados aos demais β -lactâmicos. O aztreonam, por exemplo, é utilizado no tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas há décadas na prática clínica, pois age por meio da interação com as PBPs, interrompendo

a síntese da parede celular. Outros representantes desta classe são carumonam, tigemonam e pirazminam (Nogueira & Miguel, 2010; Fu et al. 2016).

1.3.2. Tetraciclínas

Devido ao seu amplo espectro de ação, baixa toxicidade, baixo custo, e possibilidade de serem administradas, na maioria dos casos, por via oral, as tetraciclínas são muito úteis na clínica médica, sendo utilizadas como terapia em diversas infecções, não apenas em humanos, como também em animais, onde são também promotores de crescimento. Tigeciclina e minociclina estão entre as poucas opções de tratamento contra MRSA. Seu mecanismo de ação consiste na ligação do antimicrobiano a um sítio na subunidade 30S do ribossomo bacteriano impedindo a ligação do aminoacil-t-RNA no sítio A do ribossomo, o que compromete a adição de aminoácidos e, conseqüentemente, a síntese protéica (Pereira-Maia et al. 2010).

1.3.3. Aminoglicosídeos

São eficazes contra bastonetes Gram-negativos e apresentam sinergismo positivo quando combinados a outros antimicrobianos no tratamento de infecções por Gram-positivos. São utilizados como profilaxia e terapia de infecções pós-operatórias em cirurgia cardíaca. Como principal efeito colateral está a nefrotoxicidade, ocorrendo em até 20% dos pacientes. Seu mecanismo de ação é a ligação ao ribossomo bacteriano, mais especificamente na subunidade 30S, onde provoca a leitura incorreta do RNA mensageiro e conseqüentemente diminui a síntese proteica. Isso leva a alteração no funcionamento da membrana plasmática, perda de constituintes essenciais e conseqüente morte celular (Oliveira et al. 2006).

1.3.4. Macrolídeos e lincosamidas

Apresentam em sua composição um anel macrocíclico de lactona, ao qual ligam-se um ou mais açúcares. Como exemplos desta classe de antimicrobianos temos azitromicina, claritromicina, eritromicina, espiramicina, miocamicina, roxitromicina, etc. Atuam inibindo a síntese protéica dependente de RNA, por meio da ligação a receptores presentes na porção 50S do ribossomo, particularmente na molécula 23S do RNA, impedindo as reações de transpeptidação e translocação. Em relação ao seu espectro de ação, existem diferenças entre os representantes desta classe. A eritromicina atua sobre bactérias Gram-positivas e também em microrganismos dos gêneros *Treponema*, *Mycoplasma* e *Chlamydia*, sendo inativa contra enterobactérias e patógenos do gênero *Pseudomonas*. Já a claritromicina destaca-se pela sua atividade contra estreptococos e estafilococos resistentes à oxacilina. A azitromicina diferencia-se das demais pela sua atividade contra Gram-negativos, como *Haemophilus influenzae*, porém as enterobactérias apresentam resistência intrínseca a este antimicrobiano (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2007c).

As lincosamidas apresentam o mesmo mecanismo de ação que os macrolídeos, sendo representadas pela lincomicina e clindamicina. A clindamicina se mostra eficaz em infecções por cocos Gram-positivos não enterocócicos e bactérias anaeróbias, como *Bacteroides fragilis* (Nogueira & Miguel, 2010).

1.3.5. Glicopeptídeos e lipodepsipeptídeos

Os glicopeptídeos são antimicrobianos que atuam interferindo a síntese da parede celular antagonizando competitivamente a polimerização das cadeias de peptideoglicano. São amplamente utilizados nas infecções por bactérias Gram-positivas, tendo como principais representantes a vancomicina e a teicoplanina (Nogueira & Miguel, 2010).

Representado pela daptomicina, utilizada no tratamento de infecções por Gram-positivos, os lipodepsipeptídeos atuam na desorganização das funções da membrana celular bacteriana (Guimarães et al. 2010).

1.3.6. *Streptograminas*

São representados pela quinupristina e dalfopristina, que são derivados semi-sintéticos de uma substância chamada pristinamicina. Essas duas substâncias atuam de maneira sinérgica na inibição da síntese proteica, sendo a quinupristina responsável por inibir a elongação da cadeia peptídica, enquanto a dalfopristina atua interferindo a transferência da cadeia peptídica de um RNA transportador (tRNA) para outro (Guimarães et al. 2010).

1.3.7. *Cloranfenicol*

Possui um espectro de ação relativamente amplo, predominantemente bacteriostático, englobando Gram-positivos, Gram-negativos, riquetsias, clamídias e micoplasmas. Microrganismos do gênero *Salmonella* e das espécies *H. influenzae* e *Neisseria meningitidis* apresentam sensibilidade a este antibiótico (Fiol & Avallone, 2005). Seu mecanismo de ação consiste em inibir a fixação do RNA mensageiro aos ribossomos e impedir a união dos aminoácidos, interferindo assim na síntese proteica. Devido a sua alta toxicidade, só é utilizado em infecções graves e quando não há mais opções de tratamento (Nogueira & Miguel, 2010).

1.3.8. *Rifamicinas*

São antimicrobianos que atuam como inibidores da RNA polimerase, logo, interferem na transcrição. Seu principal representante é a rifampicina, que faz parte do conjunto de fármacos utilizados no tratamento da tuberculose. Possui ação bactericida e um amplo espectro de atividade. Além de *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias atípicas, como *Mycobacterium*

kansasii e *Mycobacterium marinum*, este antimicrobiano é ativo contra *S. aureus*, CONS, *Rhodococcus equi*, *N. meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *H. influenzae* (Sánchez-Saldaña et al. 2004; Rothstein, 2016).

1.3.9. Polimixinas

É uma classe de antimicrobianos que se mostra ativa contra várias bactérias Gram-negativas. Representam esta classe as polimixinas A, B, C, D e E, sendo esta última chamada de colistina, porém apenas as polimixinas B e E são utilizadas clinicamente, pois as demais apresentam alta toxicidade. Entre os efeitos colaterais, os que mais se destacam são a nefrotoxicidade (principalmente insuficiência renal aguda) e neurotoxicidade. Seu mecanismo de ação leva à ruptura da membrana celular bacteriana e, conseqüentemente, sua morte, ao se ligar a componentes do envelope celular como fosfolípidos e lipopolissacarídeos (LPS), deslocando competitivamente os íons cálcio (Ca) e magnésio (Mg), o que desestabiliza a membrana (Mendes & Burdman, 2009).

1.3.10. Inibidores de β -lactamases

Representados pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, estes fármacos apresentam um anel beta-lactâmico, porém não possuem atividade antimicrobiana. Eles atuam inibindo a clivagem enzimática, impedindo a ação das enzimas β -lactamases e, conseqüentemente, inativando-as (Nogueira & Miguel, 2010).

1.3.11. Nitrofuranos

São antimicrobianos de amplo espectro, tendo como principais representantes furazolidona, furaltadona, nitrofurantoína e nitrofurazona. Estas substâncias, devido ao seu potencial em causar alterações cromossômicas e neoplásicas, foram proibidas na criação de animais na Europa (Praxedes et al. 2013).

Como um exemplo do mecanismo de ação dessa classe, a nitrofurantoína, ao ser metabolizada pela bactéria, inibe enzimas como a acetil conenzima A, o que ocasiona lesão no DNA bacteriano (Nogueira & Miguel, 2010).

1.3.12. Sulfonamidas

São utilizadas no tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Por serem análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido p-aminobenzóico (PABA), as sulfonamidas impedem que esta substância seja utilizada pelas bactérias na síntese do ácido fólico. Esta classe de antimicrobianos apresenta como representantes sulfanilamida, sulfisoxazol, sulfacetamida, sulfadiazina e sulfametoxazol. Este último fármaco é normalmente administrado junto ao trimetoprim, pois juntos, eles possuem um efeito sinérgico. Esta combinação é conhecida como cotrimoxazol, onde o sulfametoxazol inibe um passo intermediário da reação de síntese do ácido tetra-hidrofólico (folínico) e o trimetoprim atua impedindo a formação do metabólito ativo no final do processo, o que impede a síntese de ácidos nucleicos (Alaburda et al. 2007; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2007d).

1.3.13. Quinolonas e fluoroquinolonas

São uma classe de antimicrobianos sintéticos composta por fármacos utilizados de maneira eficaz no tratamento de infecções do trato urinário e em infecções em que o microrganismo é resistente a outros antimicrobianos. Seu mecanismo de ação é a inibição da replicação do DNA através da ligação, em Gram-positivos, à enzima topoisomerase IV e, em Gram-negativos, à enzima topoisomerase II, também chamada de DNA girase. Seus principais representantes são o ácido nalidíxico e a ciprofloxacina (Guimarães et al, 2010; Souza et al. 2010).

1.3.14. Oxazolidinonas

O mecanismo de ação destes fármacos consiste na inibição da síntese de proteínas, através da fixação à unidade 50S do ribossomo e consequente impedimento da formação do complexo 70S de iniciação. São ativos contra infecções por microrganismos Gram-positivos, tendo como principal representante o linezolid, que é ativo contra MRSA (Pigrau & Almirante, 2009).

1.4 Resistência aos antimicrobianos

A resistência bacteriana a antimicrobianos é um dos mais complexos problemas de saúde pública atualmente e pode ser resultado de seu uso abusivo, não apenas entre clínicos e farmacêuticos, mas também por parte da população, que se auto-medica com esses medicamentos para doenças que na maioria das vezes são auto limitantes (Amábile-Cuevas, 2013).

1.4.1. β -lactamases

O mecanismo mais comum de resistência aos β -lactâmicos é a produção de enzimas β -lactamases, que hidrolizam esses antimicrobianos, principalmente em bastonetes Gram-negativos (Dallene et al., 2010). Essas enzimas são classificadas em quatro classes moleculares, A, B, C e D, que se diferenciam em relação ao seu sítio ativo. As enzimas de classe A, C e D possuem serina em seu sítio ativo e as pertencentes a classe B são metaloenzimas que utilizam pelo menos um íon de zinco (Bush & Jacoby, 2010).

β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) são enzimas de classe A que são efetivas contra β -lactâmicos como ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima e oximino-monabactâmicos. Carbapenemas e cefamicina são efetivos contra as amostras produtoras de ESBL (Ghafourian et al., 2014).

O aumento da resistência às cefalosporinas levou ao uso de carbapenemas e, com isso, houve a emergência e disseminação de amostras resistentes a estes antimicrobianos. A produção de carbapenemases é considerada o principal mecanismo de resistência a estes antimicrobianos em bastonetes Gram-negativos. Isolados de enterobactérias e não-fermentadores (como *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp.) produtores de carbapenemases são resistentes a diversas outras classes de antimicrobianos, limitando as opções terapêuticas (Woodford et al., 2014; Montezzi et al., 2015).

As serino carbapenemases pertencem à classe A e os organismos que as produzem apresentam sensibilidade reduzida a imipenem. As metalo- β -lactamases são enzimas de classe B que, além de hidrolizar carbapenemas, não são susceptíveis aos inibidores comerciais de β -lactamases. As OXA (“oxacillin hydrolyzing”) β -lactamases são enzimas de classe D e apresentam em seu espectro de ação resistência a oxacilina e cloxacilina (Queenan & Bush, 2007).

1.4.2. Multi-resistência

Os fenótipos de multi-resistência a antimicrobianos são vistos porque os genes que codificam para carbapenemases são frequentemente carregados por plasmídeos, juntamente com genes que codificam determinantes de resistência a outros antimicrobianos. Esses plasmídeos, ao adquirirem ou perderem genes, aumentam a diversidade genética da bactéria, além de poderem ser transferidos entre as populações bacterianas. A transferência horizontal de genes é um outro meio importante de aquisição de determinantes de resistência. Os principais mecanismos de transferência horizontal de genes são transdução, transformação e conjugação (Carattoli et al. 2005; Amábile-Cuevas, 2012; Montezzi et al., 2015).

Os integrons, que funcionam como plataformas para carrear, rearranjar ou melhorar a expressão de elementos chamados “genes cassetes”, onde se encontram os genes de resistência aos antimicrobianos e/ou virulência, podem ser encontrados em elementos genéticos móveis. Este também é um fator que

colabora com o aumento da disseminação da resistência aos antimicrobianos. Além disso, os integrons desempenharam um papel importante em surtos de *Shigella* na década de 50 (Amábile-Cuevas, 2012).

A presença de bactérias multi-resistentes a antimicrobianos no ambiente é um fenômeno relatado no Brasil e no mundo. Há relatos de isolados produtores de KPC a partir de água em Portugal e no Brasil. O gene *bla_{NDM}* foi descrito em isolados bacterianos provenientes da água na Índia. Bactérias produtoras de ESBLs foram isoladas a partir de moscas em fazendas de criação de aves e aeroportos. É sabido que o trato digestório de moscas é um ambiente propício para a transferência horizontal de genes e consequente disseminação de genes de resistência e virulência entre bactérias (Walsh et al., 2011, Poirel et al., 2012; Liu et al., 2013; Blaak et al., 2014; Montezzi et al., 2015).

1.5 Métodos de identificação bacteriana

1.5.1 Bioquímica convencional

No diagnóstico clínico, as colônias bacterianas isoladas a partir do crescimento em meios de enriquecimento e meios seletivos são submetidas a vários testes bioquímicos que auxiliam em sua classificação (Nogueira & Miguel, 2010).

No diagnóstico de cocos Gram-positivos, a diferenciação entre *Staphylococcus* e *Streptococcus* é feita por meio do teste da catalase. Dentro do gênero *Staphylococcus* temos como métodos importantes na identificação os testes da coagulase, DNase, crescimento em ágar manitol, novabiocina, trealose e ureia, estes três últimos utilizados na diferenciação de *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus*, que são as principais espécies clínicas de CONS. No gênero *Streptococcus* temos os testes da bacitracina, sulfametoxazol-trimetoprim, fator CAMP (*Christie, Atkins e Munch-Petersen*), PYR (pyrrolidonyl-aminopeptidase), hidrólise do hipurato, optoquina e bile solubilidade. Para a diferenciação com *Enterococcus* são utilizados os testes

do crescimento em NaCl 6,5% e da bile esculina (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004).

Para identificação de microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, dispomos dos seguintes testes bioquímicos: prova da oxidase (as enterobactérias são negativas nesse teste), produção de indol, motilidade, produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), utilização do citrato, produção de urease, desaminação da fenilalanina, degradação do malonato, descarboxilação de aminoácidos (lisina, arginina e ornitina) e fermentação de açúcares (glicose, lactose, sacarose e manitol) (Prado et al. 2002; Nogueira & Miguel, 2010).

A identificação dos bastonetes Gram-negativos não-fermentadores é complexa, sendo necessários vários testes como oxidase, motilidade, oxidação-fermentação de glicose, descarboxilação de aminoácidos (lisina e arginina), redução de nitrato a nitrito, crescimento em 4°C e 42°C, utilização do citrato, discos de polimixina (*Complexo Burkholderia cepacia* é intrinsecamente resistente) e imipenem (*S. maltophilia* é intrinsecamente resistente), atividade da urease, produção de indol, hidrólise da esculina, hidrólise da gelatina, hidrólise do Tween 80 (hidrólise da lipase), ágar DNase e ONPG (prova da β -galactosidase). Além disso, as características morfológicas, macroscópicas e microscópicas são importantes auxiliares no processo (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008).

1.5.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA

O gene 16S rRNA é utilizado em taxonomia e filogenia bacteriana por diversos motivos, tais como sua presença em quase todas as bactérias, existindo em operons ou famílias multigênicas; sua função inalterada ao longo da evolução; e o seu tamanho (1500 pb), que é suficiente para o uso de ferramentas informáticas. Este gene possui regiões variáveis suficientes que permitem o seu uso na identificação de bactérias, propriedade também vista no gene *rpoB* (Janda & Abbott, 2007; Schröttner et al. 2016).

O sequenciamento do gene 16S rRNA é uma ferramenta muito útil na taxonomia de bactérias que não são facilmente identificadas pelos métodos convencionais, com taxas de identificação de >90% em nível de gênero e 65-83% em nível de espécie. Além disso, é um método que reduz o tempo necessário para a identificação de bactérias de crescimento lento, como as micobactérias, que podem levar de 6 a 8 semanas para crescer em meios de cultura convencionais, e que possibilita a identificação de microrganismos não-cultiváveis (Woo et al. 2008).

1.5.3 MALDI-TOF EM

A técnica de MALDI-TOF EM (Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz: tempo de voo – “Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry” em inglês) permite identificação microbiana, caracterização e tipagem. A partir de uma única colônia bacteriana é possível obter um perfil proteico para aquele microrganismo. É uma ferramenta que requer um alto custo inicial, mas que reduz o tempo necessário na identificação bacteriana, conseqüentemente, reduzindo o custo de análise por amostra (Santos et al. 2016).

Esta técnica foi proposta há mais de 30 anos, visto que os métodos convencionais de identificação, que incluem a coloração de Gram, características morfológicas e bioquímicas, requerem horas ou dias, principalmente em microrganismos fastidiosos. Esta ferramenta já se mostrou muito útil na identificação de patógenos envolvidos em fibrose cística (Seng et al. 2009).

Consiste num sistema no qual uma colônia isolada de um microrganismo é colocada sobre uma placa de matriz polimérica, a qual receberá uma radiação por laser, vaporizando a amostra e ionizando várias moléculas. Estas moléculas são aspiradas num tubo de vácuo e levadas a um detector: o tempo de chegada ao detector (tempo de voo - “time of flight” em inglês) varia de acordo com a molécula. Essas variações são registradas graficamente como picos, que são específicos para cada espécie bacteriana. Estes resultados são

interpretados com o auxílio de uma base de dados computadorizada. Diagnósticos microbiológicos complexos, como de estafilococos coagulase negativos ou dos sorovares *Salmonella enterica* são facilitados por este método. Os bancos de dados tendem a ficar mais completos quanto mais esta técnica for utilizada. Uma desvantagem é que estes bancos de dados não são públicos, porém apresentam uma melhor acurácia nas suas atualizações (Pasternak, 2012).

Esta técnica já foi utilizada na identificação de bactérias ambientais nas mais variadas amostras, como esponjas-do-mar, água, solo, lama, raízes e rizosfera, porém ainda é necessário um refinamento no método que lhe permita identificar melhor bactérias isoladas em ambientes extremos (Santos et al. 2016).

1.6 Métodos de tipagem

1.6.1 PFGE

A técnica de polimorfismo em eletroforese de campo pulsado (PFGE) foi desenvolvida por Schwartz e Cantor em 1983 para solucionar o problema que envolvia a separação de fragmentos maiores de DNA, que não era possível pela eletroforese convencional em gel de agarose, que separa bem fragmentos entre 0,5 e 20-30 kb (Magalhães et al. 2005).

Nesta técnica, o pulso elétrico tem seu sentido constantemente alterado, de maneira que os fragmentos de DNA são constantemente reorientados no gel, mantendo a separação dos mesmos de acordo com o seu tamanho. Além disso, o ângulo obtuso (120°C) de reorientação dos fragmentos também é um fator que otimiza a sua separação (Herschleb et al. 2007).

As moléculas de DNA que serão separadas são tratadas com enzimas de restrição, que irão dividir o DNA em pequenos fragmentos, que serão separados de acordo com seu tamanho no gel de agarose (Centers for Disease Control and Prevention, 2016c).

Esta técnica é considerada padrão-ouro em estudos epidemiológicos, sendo muito útil no estudo de pequenos e grandes surtos hospitalares, incluindo a comparação de populações bacterianas em diferentes países (Magalhães et al. 2005).

Entre as vantagens desta técnica está o fato dela já estar padronizada para várias espécies bacterianas e ter um potencial discriminatório melhor do que técnicas como a ribotipagem e o MLST (multi-locus sequence typing). Porém ainda há algumas espécies bacterianas que não podem ser discriminadas por este método (Centers for Disease Control And Prevention, 2016c).

1.6.2 Outros métodos

A análise de “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) consiste na diferenciação de sequências homólogas de DNA, que são clivadas por enzimas de restrição e separadas em fragmentos de acordo com seu tamanho por meio de uma eletroforese. O RFLP é um marcador molecular que é específico para cada combinação entre clone e enzima de restrição. Esta análise é muito utilizada em mapeamentos genéticos e análises de variação (National Center for Biotechnology Information, 2014).

A técnica de hibridização por Southern blot é uma técnica empregada na interpretação das bandas geradas pelas enzimas de restrição, na qual o gel é submetido a uma desnaturação alcalina, neutralização e transferência para uma membrana de náilon. Essas membranas são hibridizadas juntamente com sondas específicas e, em seguida, incubadas com anticorpos quimioluminescentes e então radiografadas (Macieira et al. 2009).

A ribotipagem consiste em digerir fragmentos de DNA cromossomal com enzimas específicas, separá-los por eletroforese e, em seguida identificar apenas os fragmentos que codificam o RNA ribossomal com o auxílio de uma sonda marcada de DNA. Os genes ribossômicos são conservados entre os filós, logo, uma sonda universal permite a caracterização de vários organismos (Bueno, 2007).

A análise de perfil plasmidial é uma técnica utilizada em estudos epidemiológicos por ser rápida, não muito cara e facilmente executável. Foi a primeira técnica utilizando DNA empregada em rastreamento epidemiológico. Nesta técnica o DNA é extraído por lise alcalina e tratado com enzimas específicas. A corrida eletroforética separa os fragmentos plasmidiais de acordo com o seu tamanho (Lázaro et al. 2004, Feizabadi et al. 2008).

A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é uma variante da técnica de PCR, baseada na amplificação de locos variados no genoma, a partir de um único iniciador de sequência arbitrária, logo, sua sequência alvo é desconhecida. Esta técnica foi desenvolvida para a detecção de mudanças de bases nitrogenadas ao longo do genoma, podendo ser aplicada no mapeamento genômico e no “fingerprinting”, quando fragmentos de DNA são gerados a partir de uma única amostra, e a partir destes fragmentos são obtidas informações genotípicas (Binneck et al. 2002; Araujo et al. 2003; Chial, 2008).

Para realização de “fingerprinting” também é utilizada a técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), que é mais laboriosa do que o RAPD, mas apresenta resultados mais confiáveis. Com esta técnica, pequenos fragmentos podem ser utilizados para a obtenção de “fingerprinting”, que são específicos em cada espécie (Garcia et al. 2004; Chial, 2008).

A análise de “Multilocus sequence typing” (MLST) consiste no sequenciamento de sete genes constitutivos específicos de uma determinada espécie. Estas sequências são comparadas com os alelos previamente identificados destes locos e recebem números para cada um dos sete genes. Estes números são combinados para definir um perfil, que é chamado “sequence type” (ST), que descreve aquela amostra. Esta técnica visa caracterizar, sem nenhum tipo de ambiguidade, espécies bacterianas ou de outros microrganismos (Aanensen & Spratt, 2005).

2 JUSTIFICATIVA

A presença de bactérias portadoras de genes que conferem resistência a carbapenemas é um fenômeno relatado constantemente na literatura científica, sugerindo que os problemas de resistência observados nos hospitais muitas vezes são originários de bactérias ambientais. A presença de dípteros muscoides dos mais variados gêneros e espécies é algo comum em estabelecimentos como hospitais, restaurantes e escolas em áreas carentes e com pouco saneamento básico na cidade e região metropolitana do Rio de Janeiro. A capacidade destes insetos de se desenvolver em variados tipos de criadouros possibilita a sua rápida multiplicação e, conseqüentemente, a transmissão de patógenos.

Em países em desenvolvimento como o Brasil, onde ainda existe carência no que diz respeito ao saneamento básico, a amostragem a partir de ambiente, principalmente em insetos transmissores de patógenos, pode ser quase tão importante quanto a amostragem clínica.

Este trabalho se propôs a estudar a presença de bactérias produtoras de ESBLs e carbapenemases, que são motivo de preocupação para a saúde pública, em dípteros muscoides, a fim de ser verificado o papel destes insetos, não apenas na disseminação, mas também como reservatórios de bactérias resistentes.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Realizar a prospecção e caracterização molecular de amostras resistentes a antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (cefalosporinas e carbapenemas) isoladas a partir de dípteros muscoides.

3.2. Objetivos específicos

- Coletar e identificar dípteros muscoides;

- Isolar e identificar bactérias possivelmente produtoras de cefalosporinases e/ou carbapenemases presentes em dípteros muscoides;
- Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das amostras bacterianas isoladas;
- Investigar a presença dos seguintes genes de resistência: *bla*_{SPM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-143}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{GIM} e *bla*_{SIM} e, nos isolados pertencentes ao grupo *Bacillus cereus*, a presença do gene de virulência *hblA*;
- Analisar o polimorfismo genético dos isolados pertencentes a espécie *Pseudomonas fluorescens*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta e identificação de dípteros muscoides

As coletas de dípteros muscoides foram realizadas em diferentes locais da cidade do Rio de Janeiro e por diferentes metodologias: a) numa caçamba de lixo na comunidade do Amorim, próximo ao Campus Manguinhos com auxílio de rede entomológica e atração por carne bovina putrefata; b) no campo de Santana em frente ao Hospital Souza Aguiar; c) na Quinta da Boa Vista, em frente ao Hospital Quinta D'or, em ambos os hospitais foi utilizada rede entomológica; d) no Campus Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz, na Armadilha Shannon montada próximo ao Pavilhão Arthur Neiva; e) ainda no Campus Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz, próximo ao abrigo de resíduos hospitalares do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), com armadilha de garrafa PET (Figuras 2 e 3); f) no setor de Saneantes do Departamento de Microbiologia do INCQS com um copo; g) foi feita uma coleta de indivíduos da espécie *Chrysomya megacephala* da geração F7 em uma gaiola de criação no laboratório como controle negativo. Além disso, apesar de não constar no objetivo do trabalho processamos cinco pupas da espécie *Lucilia eximia* que foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho

Ducke, em Manaus, pela equipe do Laboratório de Entomologia Médica e Forense, no dia 03 de outubro de 2014.

As moscas coletadas foram identificadas com o uso de chaves dicotômicas para identificação de dípteros (Mello, 2003; Carvalho & Mello-Patiu, 2008).



Figura 2 – Armadilha com garrafa PET colocada próxima ao abrigo de resíduos do INI. Acervo pessoal



Figura 3 – Abrigo de resíduos hospitalares do INI. Acervo pessoal

4.2. Isolamento de bactérias e estocagem

As moscas coletadas foram levadas ao insetário do laboratório para a separação das diferentes famílias, gêneros ou espécies. As próximas etapas foram realizadas em cabine de segurança biológica. As moscas foram maceradas em microtubos estéreis do tipo *Eppendorf* 1,5mL contendo PBS 0,85% com o auxílio de pistilos estéreis e descartáveis. Os macerados foram diluídos até 10^{-4} , plaqueados em meio ágar Nutriente (Merck) contendo ceftriaxona, inicialmente a 0,5mg/L. Com o andamento do projeto, a concentração foi elevada a 0,75mg/L e, finalmente, a 1mg/L e incubados em temperatura ambiente por 48 horas. As diferentes colônias foram purificadas em meio com antibiótico e estocadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion - Merck) com 20% de glicerol (Sigma) a -20°C . As figuras 4 e 5 mostram culturas feitas em meio com e sem antibiótico a partir da mesma diluição de um macerado da espécie *C. megacephala*.

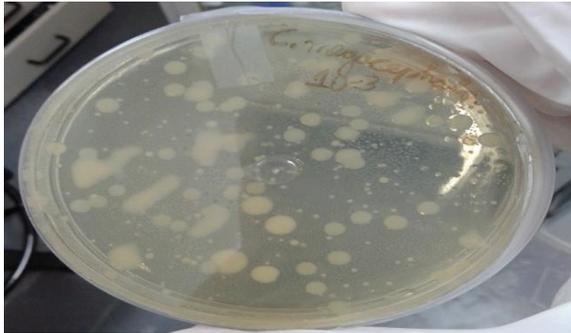


Figura 4 – Crescimento bacteriano proveniente da diluição 10^{-3} de macerado da espécie *Chrysomya megacephala* em meio ágar nutriente sem antibiótico. Acervo pessoal.

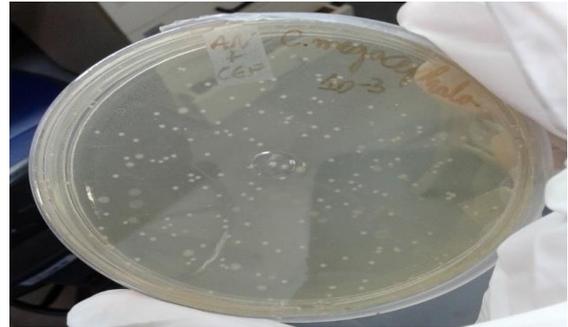


Figura 5 – Crescimento bacteriano proveniente da diluição 10^{-3} de macerado da espécie *Chrysomya megacephala* em meio ágar nutriente com antibiótico. Acervo pessoal.

4.3. Coloração de Gram

Para análise das características morfotintoriais foi realizada a coloração de Gram segundo Nogueira e Miguel (2010) com algumas modificações. Foi feito um esfregaço do microrganismo em salina sobre uma lâmina. 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-acetona 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).

4.4. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)

O TSA foi feito utilizando-se os seguintes antimicrobianos: cefepime (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), imipenem (10 μ g) e meropenem (10 μ g) Sensifar. Foi feito pelo método da disco difusão em Ágar Mueller-Hinton (Acumedia).

A partir de cultura recente em ágar nutriente (Merck) foram selecionadas de uma a duas colônias para obtenção de uma suspensão padronizada, em

solução de salina fisiológica, com turbidez equivalente à do padrão 0,5 na escala de MacFarland. Esta suspensão foi semeada em toda a superfície do meio Ágar Mueller-Hinton para obtenção de crescimento semi-confluyente. Após no máximo 15 minutos, foram aplicados os discos de antimicrobianos, mantendo-se um espaço de, no mínimo, 2,5 cm entre eles.

Após aplicação dos discos, as placas foram incubadas em estufa a 35°C, em aerobiose por 18-24h e após esse período, foram avaliados os diâmetros dos halos de inibição para cada antimicrobiano de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014 (CLSI 2014)*. Como controle do teste foi utilizada a amostra *E. coli* ATCC 25922.

Foram utilizados, empiricamente, os pontos de corte para *Enterobacteriaceae*.

As amostras que apresentaram perfis intermediários ou de resistência a pelo menos um dos antimicrobianos foram submetidas à identificação molecular por sequenciamento do gene 16S rRNA e/ou MALDI-TOF EM (bioMérieux).

Para a realização da identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA, foi necessária a extração de DNA pelo método do Tiocianato de Guanidina (Caetano-Anolles & Gresshoff, 1997).

4.5. Extração de DNA

A extração de DNA foi feita pelo método do Tiocianato de Guanidina.

Células bacterianas a partir de cultura recente em meio ágar nutriente (Merck), foram suspensas em 3mL de caldo BHI (Merck) e submetidas a agitação “overnight” a 37°C. Do caldo, 1,5 mL foram transferidos para um microtubo tipo *Eppendorf*, e em seguida, centrifugados por 10 minutos (10000 rpm). O sobrenadante foi descartado, e em seguida, os 1,5 mL restantes do caldo foram adicionados ao microtubo, procedendo novamente a etapa de centrifugação (10 minutos a 10000 rpm). O sobrenadante foi novamente

centrifugado. Ao sedimento formado no fundo do tubo, foi adicionado 1 mL de salina 1M, seguida de homogeneização em vórtex. Essa última etapa foi repetida duas vezes, sendo intercalada por 10 minutos de centrifugação (10000 rpm). O sedimento foi suspenso em 100 µL de tampão TE (100mM Tris / 10mM EDTA), e a ele foram adicionados 500µL da solução de Guanidina (5M tiocianato de guanidina, 0,1M de EDTA, sarcosil 0,5%), homogeneizado por inversão e incubado por 5 minutos a -20°C. Depois, foram adicionados à mistura 250 µL de acetato de amônia (estocado a -20°C), homogeneizada por inversão e incubada por 5 minutos à -20°C. Em seguida foram adicionados 500µL de solução de clorofórmio-álcool isoamílico, agitados em vórtex até a completa homogeneização, com a obtenção de uma solução de cor leitosa. Essa solução foi centrifugada por 10 minutos (10000 rpm), obtendo uma solução de três fases. Aproximadamente 750µL da fase superior foram retirados e transferidos para um microtubo tipo Eppendorf contendo 380µL de Isopropanol. A mistura foi levada ao freezer (-20°C) "overnight", e no dia seguinte, foi centrifugada por 10 minutos (10000 rpm). O sobrenadante foi desprezado e o DNA foi então mantido no fundo como um pequeno pellet. Foram adicionados 150µL de álcool 70% e foi feita a centrifugação por 10 minutos (10000 rpm). Esta etapa foi repetida duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi colocado em temperatura ambiente para que todo o álcool evaporasse. Após isso, o sedimento foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE, por 3h em banho-maria à 37°C. O DNA foi posteriormente mantido em freezer a -20°C.

O DNA extraído foi quantificado com o auxílio de NanoDrop Lite Spectrophotometer Thermo Scientifics e diluído para a concentração de 5ng/µL para a utilização nos testes moleculares de identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA e detecção de genes de resistência por PCR.

4.6. Identificação bacteriana

4.6.1. Sequenciamento do gene 16S rRNA

A PCR para o gene 16S rRNA foi feita utilizando *primers* universais (F:515: GCCAGCAGCCGCGGTAA e R:806: GGACTACCAGGGTATCTAAT), descritos por Relman (1993) que geram um produto de 240pb.

As condições para reação foram: um ciclo a 95°C por 12 min; 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 min; anelamento a 55°C por 1min; extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 1 min.

Os amplicons foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 0,4X sob a voltagem de 80V por 40 min. Os produtos da reação de PCR foram purificados com o *Kit* de purificação de produtos do PCR (GFX). O sequenciamento foi realizado na plataforma PDTIS do IOC e as sequências foram analisadas em BLAST e comparadas no Genbank.

4.6.2. MALDI-TOF EM

A técnica de MALDI-TOF EM foi executada no Laboratório de Controle Microbiológico do Departamento de Controle de Qualidade, situado em Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, sob supervisão da tecnologista Luciane Martins Medeiros, utilizando o sistema Vitek MS (bioMeriëux, Marcy l'Etoile, France).

Uma colônia retirada de uma cultura recente em ágar nutriente foi colocada em uma lâmina de aço com poços. Estes poços foram cobertos com matriz saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e deixados secar em temperatura ambiente. A lâmina de aço foi inserida no aparelho e o espectro de massas gerado foi analisado e comparado com um banco de dados fornecido pelo fabricante.

A técnica de MALDI-TOF EM foi empregada também em cepas não resistentes para poder dimensionar a diversidade bacteriana presente nas moscas coletadas.

4.6.3. Bioquímica convencional

Algumas amostras que, na identificação por MALDI-TOF EM foram identificadas como *Proteus vulgaris/penneri* foram submetidas à bioquímica convencional para diferenciação das espécies. Foram realizados os testes da mobilidade, produção de H₂S (sulfeto de hidrogênio) e produção de indol, utilizando-se o meio SIM (sulfeto, indol, mobilidade), utilização do citrato, descarboxilação da ornitina e oxidação-fermentação da glicose.

4.7. Detecção de genes de resistência

A pesquisa de genes de resistência foi realizada segundo Dallene et al. (2010) para reações IMP, VIM e multiplex TEM/SHV; Poirel et al. (2011) para reações NDM, GIM e SIM e multiplex OXA-48/KPC e Higgins et al. (2010) para reação de OXA-143. Para as reações OXA-23 e SPM foram utilizados primers desenhados pelo Dr. Otavio Padula de Miranda.

Os primers utilizados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Iniciadores utilizados na detecção de genes de resistência

Gene	Iniciadores	Tamanho do Produto	Referência
<i>bla_{IMP}</i>	IMP-F: TTGACACTCCATTTACDG IMP-R: GATYGAGAATTAAGCCACYCT	139 pb	Dallene <i>et al.</i> 2010
<i>bla_{NDM}</i>	NDM-F: GGTGGGCGATCTGGTTTTTC NDM-R: CGGAATGGCTCATCACGATC	621 pb	Poirel <i>et al.</i> 2010
<i>bla_{SPM}</i>	SPM-F: CGGATCATGTGCGACTTGCCCTAC SPM-R: CGACGACATTATCGGGCGAGTG	513 pb	Dr. Otávio Padula
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-F: GATGGTGTGGTTCGCATA VIM-R: CGAATGCGCAGCACCAG	390 pb	Dallene <i>et al.</i> 2010
<i>bla_{OXA-23}</i>	OXA-23-F: TGACACCAGCGTAGGGCTT OXA-23-R: GCTCATCCAGAAGCGTCCGG	402 pb	Dr. Otávio Padula
<i>bla_{OXA-48}</i>	OXA-48-F: GCGTGGTTAAGGATGAACAC OXA-48-R: CATCAAGTTCAACCCAACCG	438 pb	Poirel <i>et al.</i> 2010
<i>bla_{OXA-143}</i>	OXA-143-F: TGGCACTTTCAGCAGTTCCT OXA-143-R: TAATCTTGAGGGGGCCAACC	149 pb	Higgins <i>et al.</i> 2010
<i>bla_{GIM}</i>	GIM-F: TCGACACACCTTGGTCTGAA GIM-R: AACTTCCAACCTTGCCATGC	477 pb	Poirel <i>et al.</i> 2010
<i>bla_{SIM}</i>	SIM-F: TACAAGGGATTGCGCATCG SIM-R: TAATGGCCTGTTCCCATGTG	570 pb	Poirel <i>et al.</i> 2010

<i>bla_{KPC}</i>	KPC-F: CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG KPC-R: CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	798 pb	Poirel <i>et al.</i> 2010
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-F: CATTTCCTGTCGCCCTTATTC TEM-R: CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	800 pb	Dallene <i>et al.</i> 2010
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-F: AGCCGCTTGAGCAAATTAAC SHV-R: ATCCCGCAGATAAATCACCAC	713 pb	Dallene <i>et al.</i> 2010

Foram feitas modificações nos protocolos durante a execução do projeto a fim de otimizar o resultado final.

Todas as reações foram preparadas com um volume final de 50 µL e utilizando-se 5µL de DNA cromossômico.

Para a detecção do gene *bla_{GIM}* foi realizada a reação de PCR simples, utilizando-se 3µL dos iniciadores de *bla_{GIM}* (10pmol/µL); 5µL de tampão *Taq buffer* (10X - Thermo Scientific), 4µL de cloreto de magnésio (MgCl₂ – 25mM – Thermo Scientific), 7,5µL de dNTP (2mM – Thermo Scientific), 0,2µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL – Thermo Scientific) e 22,3µL de água RNase free. As mesmas condições foram aplicadas para a detecção do gene *bla_{SIM}*.

No caso do gene *bla_{NDM}*, a reação de PCR convencional foi preparada com o uso de 2µL dos iniciadores de *bla_{NDM}* (10pmol/µL); 5µL de tampão *Taq buffer* (10X - Thermo Scientific), 4µL de cloreto de magnésio (MgCl₂ – 25mM – Thermo Scientific), 5µL de dNTP (2mM – Thermo Scientific), 3µL de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma), 0,2µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL – Thermo Scientific) e 23,8µL de água RNase free.

A detecção do gene *bla_{OXA-48}* foi realizada através de reação de PCR convencional, preparada com o uso de 1µL dos iniciadores de *bla_{OXA-48}* (10pmol/µL); 5µL de tampão *Taq buffer* (10X - Thermo Scientific), 4µL de cloreto de magnésio (MgCl₂ – 25mM – Thermo Scientific), 7,5µL de dNTP (2mM – Thermo Scientific), 3µL de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma), 0,2µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL – Thermo Scientific) e 23,3µL de água RNase free. As mesmas condições foram utilizadas para a detecção do gene *bla_{KPC}*.

Para todos estes genes, os ciclos de amplificação seguiram as seguintes condições: primeiro ciclo a 94°C por 10 min; 36 ciclos a 94°C por 30 seg. para desnaturação; 51°C a 40 seg. para anelamento e 72°C por 50 seg. para extensão; seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 min.

Em relação ao gene *bla_{VIM}*, a reação de PCR simples foi preparada com 2,5µL dos iniciadores de *bla_{VIM}* (10pmol/µL); 5µL de tampão *Taq buffer* (10X - Thermo Scientific), 4µL de cloreto de magnésio (MgCl₂ – 25mM – Thermo Scientific), 7,5µL de dNTP (2mM – Thermo Scientific), 4µL de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma), 0,2µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL – Thermo Scientific) e 19,3µL de água RNase free.

As condições da reação de PCR simples para o gene *bla_{IMP}* foram semelhantes, utilizando-se porém 3µL dos iniciadores de *bla_{IMP}* (10pmol/µL); 5µL de dNTP (2mM – Thermo Scientific), 3µL de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) e 21,8µL de água RNase free.

Os genes *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* foram detectados através de PCR multiplex, onde a reação foi preparada com a utilização de 2µL dos iniciadores de *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* (10pmol/µL); 5µL de tampão *Taq buffer* (10X - Thermo Scientific), 4µL de cloreto de magnésio (MgCl₂ – 25mM – Thermo Scientific), 5µL de dNTP (2mM – Thermo Scientific), 0,2µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL – Thermo Scientific) e 22,8µL de água RNase free.

Para estes genes, as seguintes condições de amplificação foram seguidas: primeiro ciclo a 94°C por 10 min; 30 ciclos a 94°C por 40 seg. para desnaturação; 54°C a 40 seg. para anelamento e 72°C por 1 min. para extensão; seguidos de uma extensão final a 72°C por 7 min.

Para a detecção do gene *bla_{OXA-23}* foi realizada reação de PCR simples, utilizando-se 2µL dos iniciadores de *bla_{OXA-23}* (10pmol/µL); 5µL de tampão *Taq buffer* (10X - Thermo Scientific), 4µL de cloreto de magnésio (MgCl₂ – 25mM – Thermo Scientific), 7,5µL de dNTP (2mM – Thermo Scientific), 3µL de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma), 0,2µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL –

Thermo Scientific) e 21,3µL de água MilliQ. As mesmas condições foram aplicadas no preparo da reação para a detecção do gene *bla_{SPM}*.

Os ciclos de amplificação para o gene *bla_{OXA-23}* seguiram as seguintes condições: primeiro ciclo a 95°C por 3 min; 5 ciclos a 95°C por 1 min. para desnaturação; 54°C a 1 min. para anelamento e 72°C por 1 min. para extensão; 30 ciclos a 95°C por 30 seg. para desnaturação; 55°C por 30 seg. para anelamento e 72°C por 30 seg. para extensão; seguidos de uma extensão final a 72°C por 3 min.

Já no caso do gene *bla_{SPM}*, a amplificação seguiu as seguintes condições: primeiro ciclo a 94°C por 2 min; 30 ciclos a 94°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 1 min. para anelamento e 72°C por 1 min. para extensão; seguidos de uma extensão final a 72°C por 1 min.

Finalmente, a detecção do gene *bla_{OXA-143}* foi realizada através de PCR simples, na qual foram utilizados 2µL dos iniciadores de *bla_{OXA-143}* (10pmol/µL); 5µL de tampão *Taq buffer* (10X - Thermo Scientific), 4µL de cloreto de magnésio (MgCl₂ – 25mM – Thermo Scientific), 7,5µL de dNTP (2mM – Thermo Scientific), 0,2µL de *Taq DNA* polimerase (5U/µL – Thermo Scientific) e 24,3µL de água RNase free.

Os ciclos de amplificação seguiram as seguintes condições: primeiro ciclo a 94°C por 5 min; 30 ciclos a 94°C por 25 seg. para desnaturação; 51°C a 40 seg. para anelamento e 72°C por 50 seg. para extensão; seguidos de uma extensão final a 72°C por 6 min.

Os amplicons foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, a uma voltagem de 80V, e o tempo de corrida variou de acordo com o tamanho do produto: 20 minutos (*bla_{IMP}* e *bla_{OXA-143}*), 30 minutos (*bla_{GIM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{OXA-23}* e *bla_{SPM}*), 35 minutos (*bla_{NDM}*) e 40 minutos (*bla_{KPC}*). Apenas os amplicons da reação multiplex para os genes *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, a uma voltagem de 80V

por 50 minutos, visto que os tamanhos dos produtos são muito próximos, para obter uma melhor visualização destes amplicons.

4.8. Detecção do gene de virulência *hblA* em isolados de *Bacillus*

A pesquisa do gene de virulência *hblA* nos isolados do grupo *Bacillus cereus* foi realizada segundo Zahner et al. (2005) com adaptações. Os primers utilizados foram *hblA1* – GCTAATGTAGTTTTCACCTGTAGCAAC e *hblA2* – AATCATGCCACTGCGTGGACATATAA, para amplificar um produto de 883pb.

A reação foi preparada com um volume de 50µL, sendo 5µL de DNA cromossomal, 0,8µL dos iniciadores de *hblA* (10pmol/µL); 5µL de tampão *Taq buffer* (10X - Thermo Scientific), 4µL de cloreto de magnésio (MgCl₂ – 25mM – Thermo Scientific), 2,5µL de dNTP (2mM – Thermo Scientific), 0,1µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL – Thermo Scientific) e 30,8µL de água RNase free.

A amplificação seguiu as seguintes condições: primeiro ciclo a 94°C por 5 min; 30 ciclos a 94°C por 30 segundos para desnaturação, 65°C por 1 min. para anelamento e 72°C por 1 min. e 30 segundos para extensão; seguidos de uma extensão final a 72°C por 10 min.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%, com uma voltagem de 80 volts por 50 minutos para a visualização dos amplicons.

4.9. Análise do polimorfismo genético através de PFGE

A análise do polimorfismo genético de *P. fluorescens* e *Pseudomonas* sp. foi realizada através de eletroforese em gel de campo pulsado.

Para a extração de DNA total, os isolados foram semeados em tubos com ágar nutriente e incubados a 37°C por 24 horas. Após a incubação, foi preparada uma suspensão bacteriana, adicionando 1mL de BSC (EDTA 0,5M pH 8,0, TRIS-HCl 1M pH 8) até alcançar o padrão de turvação 3 da escala de MacFarland. Em seguida, 200µL da suspensão foram transferidos para um microtubo tipo *Eppendorf* contendo 5µL de proteinase K (50mg/µL - Sigma).

Foram adicionados à suspensão de células 200µL de agarose 1% (0,1g de agarose *low melting* [Seaken gold], 0,5mL de SDS 1%, 9,4mL de TE [TRIS-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 0,1 MM pH 8.0]). A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Após a solidificação dos blocos de agarose contendo DNA bacteriano (plugs), os mesmos foram transferidos para tubos Falcon (15mL) contendo 2 mL de solução de lise (NaCl 1M, TRIS-HCl 6mM pH 7.6, EDTA 100mM pH 8.0, BRIJ-58 0,5%, desoxicolato 0,2%, sarcosina 0,5%, lisozima 1mg/mL) e 5µL de proteinase K (50 mg/µL) e incubados a 50°C por 2 horas. Após a incubação, os blocos foram lavados 3 vezes com 10mL de água milliQ a 50°C por 15 minutos e uma vez com 7mL de Tampão TE a 50°C por 15 minutos. Posteriormente os blocos foram armazenados em geladeira em 2ml de tampão TE.

Para a realização da digestão enzimática, um pedaço correspondente a um terço de um bloco foi transferido para um microtubo tipo *Eppendorf* contendo solução tampão da enzima *SpeI* (90µL de água esterilizada e 10µL de solução tampão da enzima - Roche) e incubadas a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, os blocos foram tratados com a enzima de restrição *XbaI* (20U) (Roche) por 3 horas a 36°C.

Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 1,1% (Seaken gold), preparado em TBE 0,4X (TRIS 44,5mM, ácido bórico 44,5mM, EDTA 1mM pH 8.3), através de eletroforese de campo pulsado, utilizando o sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, Richmond, EUA). Foram utilizadas as seguintes condições para a eletroforese: tempo de pulso crescente de 0,5 a 35 segundos, por 15 horas a 6V/cm, na temperatura de 13°C. Foram utilizados padrões de peso molecular Lambda DNA *Leader Pulse* (50-1000Kb - Sigma) nas corridas.

Após as corridas eletroforéticas, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5g/L), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados, utilizando-se ferramenta de fotodocumentação L-Pix EX- Locus biotecnologia.

5 RESULTADOS

5.1. Coleta e identificação de dípteros muscoides

O trabalho baseou-se em 18 coletas, a partir das quais foram obtidas 292 moscas. Foram coletados indivíduos das espécies *C. megacephala*, *C. putoria*, *Chrysomya albiceps*, *Hemilucilia* sp., *Lucilia* sp. (Diptera: Calliphoridae), *M. domestica*, *Synthesiomyia nudiseta*, *Ophyra chalcogaster*, *Atherigona orientalis* (Diptera: Muscidae), *Fannia* sp. (Diptera: Fanniidae), além de exemplares das famílias Sarcophagidae e Ulidiidae (= Otitidae), outros dípteros “Acaliptrados” e das cinco pupas da espécie *L. eximia* (Diptera: Calliphoridae) provenientes de Manaus. As datas e locais de coleta, bem como os dípteros coletados estão representados na figura 7 e tabela 3.

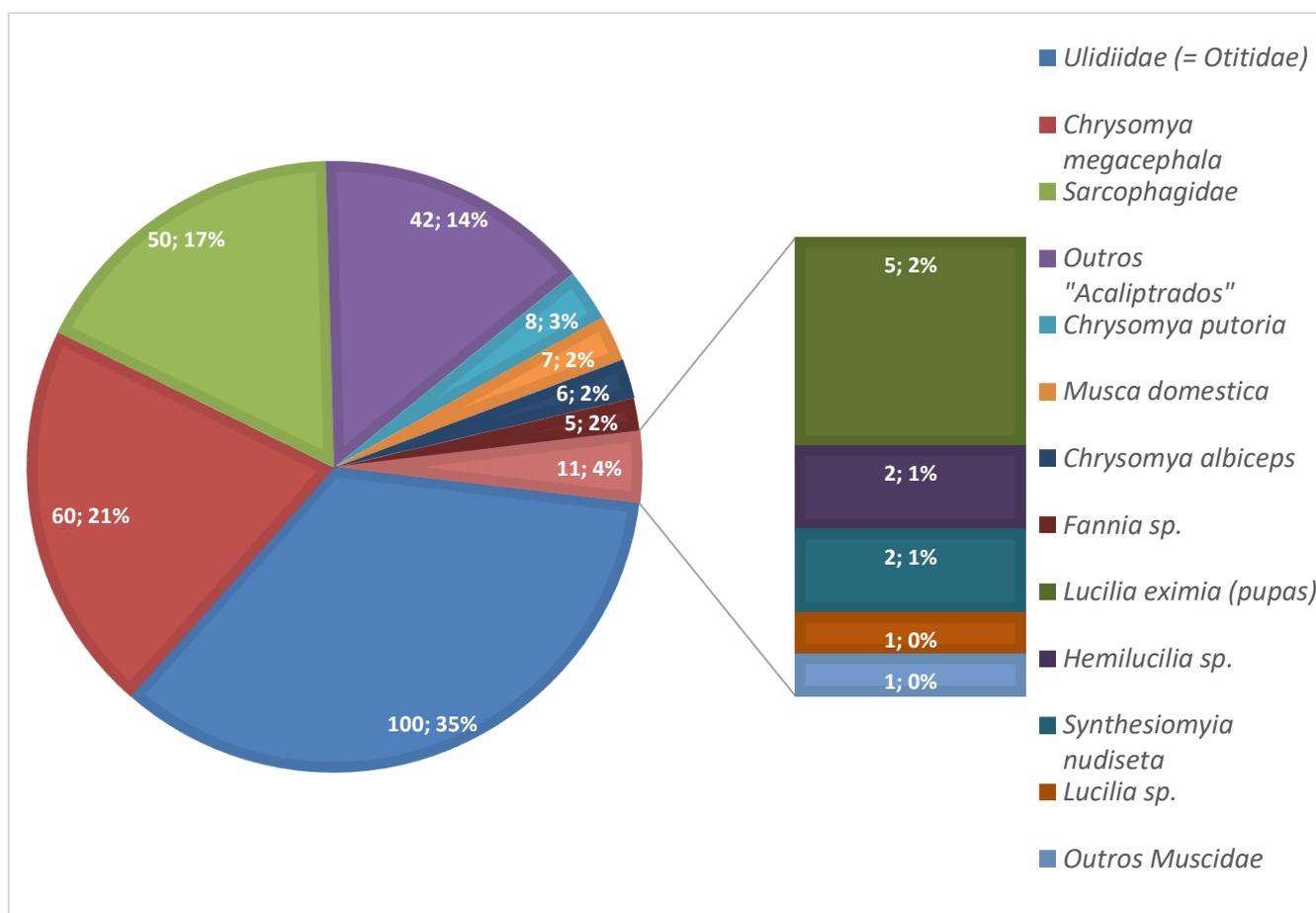


Figura 6 – Dípteros muscoides coletados ao longo deste estudo.

Tabela 3 – Datas, locais, modos de coleta e quantidades de dípteros muscoides coletados.

Data	Local	Modo de coleta	Dípteros coletados	Quantidade
24 de julho de 2014	Caçamba de lixo na comunidade do Amorim	Atração das moscas com carne putrefata	<i>Chrysomya megacephala</i>	6
12 de agosto de 2014	Caçamba de lixo na comunidade do Amorim	Atração das moscas com carne putrefata	<i>Chrysomya megacephala</i>	1
20 de agosto de 2014	Caçamba de lixo na comunidade do Amorim	Atração das moscas com carne putrefata	<i>Chrysomya megacephala</i>	3
23 de setembro de 2014	Carne de peixe "desperdiçada" por comerciante na comunidade do Amorim	Rede entomológica	<i>Chrysomya megacephala</i>	6
23 de setembro de 2014	Carne de peixe "desperdiçada" por comerciante na comunidade do Amorim	Rede entomológica	<i>Chrysomya putoria</i>	1
03 de outubro de 2014	Reserva Adolpho Ducke - Manaus	Larvas coletadas em carcaça de porco	<i>Lucilia eximia</i> (pupas)	5
29 de outubro de 2014	Caçamba de lixo na comunidade do Amorim	Atração das moscas com carne putrefata	<i>Chrysomya megacephala</i>	10
19 de novembro de 2014	Caçamba de lixo na comunidade do Amorim	Atração das moscas com carne putrefata	<i>Chrysomya megacephala</i>	2
23 de dezembro de 2014	Gaiola de criação no laboratório – geração F7	Captura sem armadilha	<i>Chrysomya megacephala</i>	10
23 de janeiro de 2015	Pavilhão Arthur Neiva	Armadilha Shannon	<i>Chrysomya megacephala</i>	6
29 de janeiro de 2015	Caçamba de lixo na comunidade do Amorim	Rede entomológica	<i>Chrysomya megacephala</i>	3
29 de janeiro de 2015	Caçamba de lixo na comunidade do Amorim	Rede entomológica	<i>Chrysomya putoria</i>	2
29 de janeiro de 2015	Caçamba de lixo na comunidade do Amorim	Rede entomológica	<i>Musca domestica</i>	7
28 de abril de 2015	Quinta da Boa Vista – em frente ao Quinta D'or	Atração das moscas com carne putrefata	<i>Fannia</i> sp.	5

28 de abril de 2015	Quinta da Boa Vista – em frente ao Quinta D'or	Atração das moscas com carne putrefata	Sarcophagidae	1
20 de maio de 2015	INI	Armadilha – garrafa PET	<i>Chrysomya megacephala</i>	1
20 de maio de 2015	INI	Armadilha – garrafa PET	Sarcophagidae	2
20 de maio de 2015	INI	Armadilha – garrafa PET	Sarcophagidae	2
02 de junho de 2015	INCQS – Setor de Sanenates	Captura sem armadilha	<i>Ophyra calcogaster</i>	1
02 de junho de 2015	INCQS – Setor de Sanenates	Captura sem armadilha	<i>Atherigona orientalis</i>	1
02 de junho de 2015	INCQS – Setor de Sanenates	Captura sem armadilha	<i>Musca domestica</i>	1
11 de junho de 2015	INI	Armadilha – garrafa PET	<i>Chrysomya megacephala</i>	4
11 de junho de 2015	INI	Armadilha – garrafa PET	Sarcophagidae	5
11 de junho de 2015	INI	Armadilha – garrafa PET	Ulidiidae (=Otitidae)	3
01 de julho de 2015	Pavilhão Arthur Neiva	Armadilha Shannon	<i>Chrysomya albiceps</i>	1
01 de julho de 2015	Pavilhão Arthur Neiva	Armadilha Shannon	Sarcophagidae	13
01 de julho de 2015	Pavilhão Arthur Neiva	Armadilha Shannon	Ulidiidae (=Otitidae)	13
07 de julho de 2015	INCQS – Setor de Saneantes	Captura sem armadilha	Sarcophagidae	1
07 de julho de 2015	INCQS – Setor de Saneantes	Captura sem armadilha	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	1
07 de julho de 2015	Campo de Santana – Próximo ao Hospital Souza Aguiar	Atração das moscas com carne putrefata	Sarcophagidae	1

07 de julho de 2015	Campo de Santana – Próximo ao Hospital Souza Aguiar	Atração das moscas com carne putrefata	Muscidae	1
07 de julho de 2015	Campo de Santana – Próximo ao Hospital Souza Aguiar	Rede entomológica	“Acaliptrados”	42
15 de julho de 2015	Pavilhão Arthur Neiva	Armadilha Shannon	Ulidiidae (=Otitidae)	84
15 de julho de 2015	Pavilhão Arthur Neiva	Armadilha Shannon	Sarcophagidae	24
15 de julho de 2015	Pavilhão Arthur Neiva	Armadilha Shannon	<i>Chrysomya megacephala</i>	8
15 de julho de 2015	Pavilhão Arthur Neiva	Armadilha Shannon	<i>Chrysomya albiceps</i>	5
15 de julho de 2015	Pavilhão Arthur Neiva	Armadilha Shannon	<i>Chrysomya putoria</i>	5
15 de julho de 2015	Pavilhão Arthur Neiva	Armadilha Shannon	<i>Hemilucilia</i> sp.	2
06 de dezembro de 2015	INCQS – Setor de Saneantes	Captura sem armadilha	<i>Lucilia</i> sp.	1
06 de dezembro de 2015	INCQS – Setor de Saneantes	Captura sem armadilha	Sarcophagidae	1
06 de dezembro de 2015	INCQS – Setor de Saneantes	Captura sem armadilha	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	1

5.2. Isolamento de cepas bacterianas

A partir dos dípteros coletados foram isoladas 172 cepas bacterianas em Ágar Nutriente com ceftriaxona. No começo deste projeto, a concentração de antibiótico utilizada foi de 0,5mg/L, e com o andamento do estudo, visando otimizar a seleção de isolados resistentes, essa concentração foi aumentada para 0,75mg/L e 1mg/L. Nos últimos isolamentos foi realizada a contagem de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) nas últimas diluições, representadas na Tabela 4. Os isolados foram submetidos a uma análise morfológica, por

meio da observação de suas colônias e coloração de Gram, e então foram estocados em caldo BHI com glicerol 20% e armazenados em “freezer”. As análises morfotintoriais estão representadas na tabela 5.

Tabela 4 – Contagem de UFC/mL

Díptero coletado	Diluição	UFC/mL	Data da coleta
<i>Chrysomya megacephala</i>	10 ⁻⁴ (s/ATB)	3,6x10 ⁵	20/05/2015
	10 ⁻⁴ (c/ATB)	2,8x10 ⁵	
	10 ⁻³ (s/ATB)	2,8x10 ⁵	
	10 ⁻³ (c/ATB)	3,3x10 ^{5*}	
<i>Chrysomya megacephala</i>	10 ⁻⁴ (s/ATB)	9,2x10 ⁶	11/06/2015
	10 ⁻⁴ (c/ATB)	1,2x10 ⁷	
Sarcofagídeos	10 ⁻⁴ (s/ATB)	1,2x10 ⁷	
	10 ⁻⁴ (c/ATB)	1x10 ⁷	
Ulídídeos	10 ⁻⁴ (s/ATB)	1,2x10 ⁷	
	10 ⁻⁴ (c/ATB)	1,1x10 ⁷	
<i>Chrysomya albiceps</i>	10 ⁻⁴ (s/ATB)	1,5x10 ⁷	01/07/2015
	10 ⁻⁴ (c/ATB)	1,4x10 ⁷	
Sarcofagídeos	10 ⁻⁴ (s/ATB)	1,3x10 ⁷	
	10 ⁻⁴ (c/ATB)	1,5x10 ⁷	
Ulídídeos	10 ⁻⁴ (s/ATB)	1,4x10 ⁷	
	10 ⁻⁴ (c/ATB)	1,3x10 ⁷	
<i>Chrysomya albiceps</i>	10 ⁻⁴ (s/ATB)	1,3x10 ⁷	15/07/2015
	10 ⁻⁴ (c/ATB)	1,2x10 ⁷	
	10 ⁻³ (s/ATB)	1,4x10 ⁶	
	10 ⁻³ (c/ATB)	1,3x10 ⁶	
<i>Chrysomya megacephala</i>	10 ⁻⁴ (s/ATB)	1,4x10 ⁷	
	10 ⁻⁴ (c/ATB)	1,2x10 ⁷	
	10 ⁻³ (s/ATB)	9,3x10 ⁵	
	10 ⁻³ (c/ATB)	7x10 ⁵	
<i>Chrysomya putoria</i>	10 ⁻⁴ (s/ATB)	1,6x10 ⁷	
	10 ⁻⁴ (c/ATB)	1,5x10 ⁷	
	10 ⁻³ (s/ATB)	1,9x10 ⁶	
	10 ⁻³ (c/ATB)	1,8x10 ⁶	
<i>Hemilucilia</i> sp.	10 ⁻⁴ (s/ATB)	2x10 ⁷	
	10 ⁻⁴ (c/ATB)	1,2x10 ⁷	
	10 ⁻³ (s/ATB)	1,9x10 ⁶	
	10 ⁻³ (c/ATB)	1,4x10 ⁶	
Sarcofagídeos	10 ⁻⁴ (s/ATB)	2,1x10 ⁷	
	10 ⁻⁴ (c/ATB)	1,5x10 ⁷	
	10 ⁻³ (s/ATB)	1,7x10 ⁶	
	10 ⁻³ (c/ATB)	1,2x10 ⁶	
Ulídídeos	10 ⁻⁴ (s/ATB)	1,6x10 ⁷	
	10 ⁻⁴ (c/ATB)	1,5x10 ⁷	
	10 ⁻³ (s/ATB)	1,7x10 ⁶	
	10 ⁻³ (c/ATB)	1,5x10 ⁶	

* colônias mais separadas

Tabela 5 – Características morfotintoriais dos isolados bacterianos

isolado	morfologia colonial em ágar nutriente	Gram	morfologia celular
1	pequena, redonda, mucoide e amarelada	neg	bastonetes
2	grande, redonda, mucoide e com centro claro	neg	bastonetes
3	pequena, arredondada e rugosa	neg	bastonetes
4	pequena, redonda, mucoide e branca	neg	cocos
5	pequena, redonda, seca e com centro côncavo	neg	bastonetes
6	arredondada e branca	neg	cocobacilos
8	redonda e amarelada	neg	cocos
11	redonda e vermelha	neg	cocos
13	grande, arredondada e branca	neg	cocos
14	pequena, arredondada e transparente	neg	bastonetes
16	arredondada, branca, com halo transparente	neg	cocos
17	amarelada	neg	cocos
18	possível produtora de swarming	pos	cocobacilos
19	produtora de swarming com pigmento verde	neg	bastonetes
20	pequena, arredondada e transparente	neg	bastonetes
21	minúsculas e transparentes	neg	cocos
22	redonda, transparente, não mucoide	neg	cocos
23	amarelada	neg	bastonetes
24	redonda e transparente	neg	bastonetes
25	minúscula e transparente	neg	cocos
26	grande, opaca e arredondada	neg	bastonetes
27	mucoide, redonda e transparente	neg	bastonetes
28	grande e branca	neg	bastonetes
29	amarelada	pos	cocos em cachos
30	redonda e branca	neg	bastonetes
32	redonda e bege	pos	cocos em cachos
33	grande e rugosa	pos	bastonetes esporulados
34	redonda e branca	neg	cocos
35	grande e mucoide	neg	cocos
36	redonda, grande e transparente	neg	cocobacilos
37	redonda, mucoide e opaca	neg	cocos
38	pequena e transparente	pos	cocos em cachos
39	redonda, branca, mucoide e pequena	neg	bastonetes
40	transparente e irregular	neg	bastonetes
41	redonda e amarelada	neg	bastonetes
42	redonda, transparente e espaiada	neg	bastonetes
43	redonda e alaranjada	neg	bastonetes
44	amarelada e irregular	pos	bastonetes
45	redonda e mais escura	neg	bastonetes
46	grande, mucoide, redonda e branco	neg	cocobacilos
47	grande, mucoide, redonda, branca, centro escuro	neg	cocos

48	grande, redonda, amarelada, transparente e mucoide	neg	cocos
49	pequena, redonda, branca e mucoide	neg	cocos
50	pequena, redonda, mucoide e transparente	pos	cocos
51	grande, redonda, branca e mucoide	neg	cocobacilos
52	grande, redonda, transparente, mucoide com centro claro	neg	cocos
53	pequena, redonda, transparente, mucoide com centro vermelho	neg	cocos
54	grande, redonda, transparente e espraiada	neg	cocos
55	pequena, redonda e branca	neg	bastonetes
56	redonda e amarela	pos	cocos em cachos
57	grande, redonda, branca, mucoide com centro vermelho	neg	cocos
58	grande, mucoide, redonda e amarelada	neg	bastonetes
59	pequena, redonda e transparente	neg	cocobacilos
60	grande, irregular, transparente e espraiada	neg	cocobacilos
61	pequena, branca e mucoide	pos	bastonetes
62	pequena, transparente e mucoide	neg	cocobacilos
63	pequena, transparente e rugosa	pos	bastonetes
64	minúscula e transparente	neg	cocobacilos
65	grande, branca e mucoide	neg	cocobacilos
66	pequena, branca e mucoide	neg	bastonetes
67	pequena, transparente e mucoide	neg	bastonetes
68	minúscula e transparente	neg	cocobacilos
69	transparente, não mucoide e com centro claro	neg	bastonetes
70	grande, branca e mucoide	neg	bastonetes
71	pequena, branca e mucoide	pos	cocos
72	pequena, transparente e mucoide	pos	cocos
73	média, branca e mucoide	neg	cocobacilos
74	pequena e amarelada	pos	cocos agrupados
75	grande, branca e mucoide	neg	cocos
76	grande, branca e espraiada	neg	bastonetes
77	média, branca e mucoide	neg	cocobacilos
78	grande, transparente e mucoide	neg	cocos
79	redonda, média e amarela	neg	cocos
80	branca e rugosa	pos	bastonetes esporulados
81	pequena e redonda	neg	cocobacilos
82	pequena e transparente	pos	cocos
83	clara, redonda, tamanho médio	neg	cocos
84	transparente e redonda	neg	cocos
85	branca e pequena	neg	cocos
86	branca, redonda, mucoide e grande	neg	cocos
87	clara e redonda	neg	cocos
88	amarela e irregular	pos	cocos em cachos

89	transparente e redonda	neg	cocos
90	branca, redonda e mucoide	neg	cocos
91	amarela, pequena e redonda	pos	cocos em cachos
92	transparente e redonda	neg	cocos
93	rugosa	neg	bastonetes
94	branca, redonda e mucoide	neg	cocos
95	rugosa e irregular	neg	cocos
96	pequena e redonda	neg	cocos
97	clara e redonda	neg	bastonetes
98	redonda e branca	pos	cocos
99	redonda e transparente	neg	cocos
100	irregular e amarelada	pos	cocos
101	rugosa, transparente e irregular	pos	cocos agrupados
102	redonda e branca	neg	cocos
103	redonda e transparente	neg	cocos
104	irregular e amarelada	neg	cocobacilos
105	irregular, rugosa e transparente	neg	cocos
106	grande, branca e mucoide	neg	cocobacilos
107	redonda e avermelhada	neg	cocobacilos
108	redonda e branca	neg	cocobacilos
109	redonda e transparente	neg	cocos
110	irregular e amarelada	neg	cocos
111	branca, mucoide e irregular	neg	cocos
112	grande, rugosa e irregular	neg	cocos
113	redonda com centro vermelho	neg	cocobacilos
114	branca, mucoide, redonda, centro claro	neg	cocobacilos
115	transparente, mucoide, redonda, centro claro	neg	cocos
116	pequena, mucoide, redonda, centro amarelado	pos	cocos em cachos
117	branca, mucoide, redonda, centro claro	neg	cocobacilos
118	transparente, mucoide, redonda, centro claro	neg	bastonetes
119	pequena, mucoide, redonda, centro amarelado	neg	bastonetes
120	branca, mucoide, redonda, centro claro	neg	bastonetes
121	transparente, mucoide, redonda, centro claro	neg	cocos
122	branca, mucoide, redonda, centro claro	neg	bastonetes
123	transparente, mucoide, redonda, centro claro	neg	cocobacilos
124	pequena, redonda e transparente	neg	bastonetes
125	branca, mucoide, redonda, centro claro	neg	cocos
126	transparente, mucoide, redonda, centro claro	neg	bastonetes
127	pequena, mucoide, redonda, centro amarelado	neg	bastonetes
128	branca, redonda e mucoide	neg	cocos
129	transparente e redonda	neg	cocos
130	grande, redonda e amarelada	pos	cocos em cachos
131	rugosa e irregular	neg	bastonetes
132	pequena, branca e não mucoide	pos	cocos em cachos

133	branca, redonda e mucoide	neg	cocos
134	transparente e redonda	neg	cocos
135	amarelada e irregular	neg	bastonetes
136	branca, redonda e mucoide	neg	cocos
137	transparente e redonda	neg	cocobacilos
138	transparente, redonda com centro claro	neg	cocobacilos
139	redonda e amarelada	neg	cocos
140	branca, redonda e mucoide	neg	cocobacilos
141	transparente e redonda	neg	bastonetes
142	transparente, rugosa e irregular	neg	bastonetes
143	branca, redonda, brilhosa e espraiada	neg	cocobacilos
144	opaca, rugosa e irregular	neg	bastonetes
145	branca, redonda e mucoide	neg	cocos
146	transparente e redonda	neg	cocos
147	redonda, mucoide e amarelada	neg	bastonetes
148	branca, redonda, brilhosa e espraiada	neg	cocos
149	branca, redonda e mucoide	neg	bastonetes
150	transparente e redonda	neg	cocos
151	branca e irregular	neg	cocos
152	branca e arredondada	neg	cocobacilos
153	leitosa com halo transparente	pos	cocobacilos
154	amarelada e irregular	neg	bastonetes
155	branca e arredondada	pos	cocos
156	transparente com centro branco	pos	cocos
157	amarelada e arredondada	neg	bastonetes
158	branca e arredondada	pos	cocos agrupados
159	amarelada, pequena e arredondada	neg	cocos
160	leitosa, pequena e arredondada	pos	cocos em cachos
161	amarelada, grande e arredondada	neg	cocobacilos
JC39	grande, branca e espraiada	neg	bastonetes
JC40	pequena e redonda	neg	bastonetes
JC41	branca e pequena	neg	bastonetes
JC42	transparente e redonda	neg	bastonetes
JC44	transparente e redonda	neg	bastonetes
JC45	rugosa	neg	bastonetes
JC46	rugosa e irregular	neg	bastonetes
JC47	redonda e transparente	neg	bastonetes
JC48	redonda e transparente	neg	bastonetes
JC49	redonda e transparente	neg	bastonetes
JC50	transparente, mucoide, redonda, centro claro	neg	bastonetes

Neg – negativo / Pos – positivo

5.3. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos e identificação bacteriana

Durante o processo de recuperação dos isolados a partir do estoque para a realização do TSA, seis deles foram perdidos. Logo, 166 isolados foram submetidos ao teste. A partir deste momento, foi feita a identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA e MALDI-TOF EM. A prioridade foi dada às amostras resistentes ou intermediárias ou que apresentaram sensibilidade dose-dependente ao cefepime. A figura 8 apresenta os resultados da identificação por MALDI-TOF EM, enquanto a Tabela 6 apresenta todos os resultados do TSA e identificação.

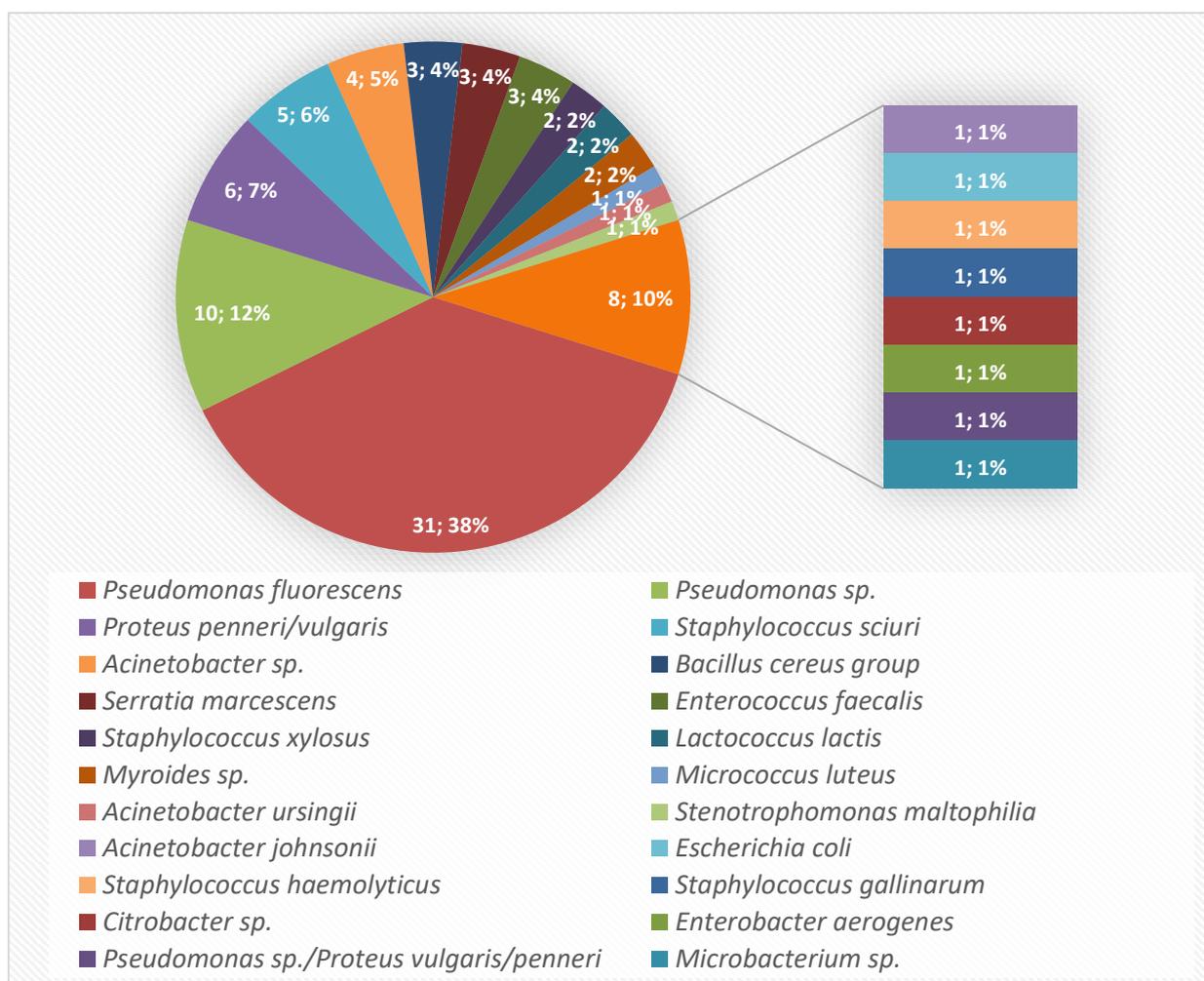


Figura 7 – Quantidade de bactérias por espécie identificadas por MALDI-TOF EM.

Tabela 6 – Identificação e resistência aos antimicrobianos dos isolados bacterianos deste estudo

isolado	Identificação 16S	Identificação MALDI-TOF EM	FEP	CAZ	IPM	MEM	isolada a partir de	Local de coleta
1	<i>Myroides</i> sp.	<i>Proteus penneri/vulgaris</i>	28	17	22	30	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
2	ND	ND	>40	>40	>40	>40	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
3	ND	ND	>40	>40	>40	>40	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
4	ND	ND	36	28	28	36	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
5	ND	ND	32	28	32	38	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
6	ND	ND	28	30	40	40	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
8	ND	ND	30	26	27	27	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
11	ND	ND	30	27	29	34	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
13	ND	ND	30	26	24	30	<i>Chrysomya putoria</i>	Amorim
14	ND	ND	30	26	24	30	<i>Chrysomya putoria</i>	Amorim
16	ND	ND	30	24	28	32	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
17	ND	ND	29	26	25	28	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
18	ND	ND	>40	>40	>40	>40	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
19	ND	ND	30	28	25	28	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
20	ND	ND	29	27	28	30	<i>Chrysomya putoria</i>	Amorim
21	<i>Proteus</i> sp.	<i>Proteus penneri/vulgaris</i>	30	29	22	28	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
22	ND	ND	34	33	25	30	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
23	<i>Myroides</i> sp.	<i>Myroides</i> sp.	21	9	21	24	<i>Lucilia eximia</i> (pupa)	Manaus
24	<i>Myroides</i> sp.	<i>Myroides</i> sp.	21	0	20	25	<i>Lucilia eximia</i> (pupa)	Manaus
25	ND	ND	24	24	32	38	<i>Lucilia eximia</i> (pupa)	Manaus
26	ND	ND	32	27	ND	34	<i>Lucilia eximia</i> (pupa)	Manaus
27	<i>Proteus</i> sp.	<i>Proteus penneri/vulgaris</i>	31	28	22	32	<i>Lucilia eximia</i> (pupa)	Manaus
28	<i>Proteus</i> sp.	<i>Proteus penneri/vulgaris</i>	32	30	22	28	<i>Lucilia eximia</i> (pupa)	Manaus
29	ND	<i>Staphylococcus xylosus</i>	30	15	ND	36	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
30	ND	ND	21	26	30	20	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim

32	ND	<i>Staphylococcus xylosum</i>	30	22	20	16	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
33	<i>Bacillus cereus</i> group	<i>Bacillus cereus</i> group	0	0	23	15	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
34	ND	ND	30	25	40	38	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
35	ND	ND	30	26	25	32	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
36	ND	ND	30	30	32	40	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
37	ND	ND	36	30	32	32	<i>Chrysomya megacephala</i>	LEMEF
38	ND	<i>Micrococcus luteus</i>	28	16	ND	36	<i>Chrysomya megacephala</i>	LEMEF
39	ND	ND	24	28	36	28	<i>Chrysomya megacephala</i>	Pavilhão Arthur Neiva
40	ND	ND	34	30	30	38	<i>Chrysomya megacephala</i>	Pavilhão Arthur Neiva
41	ND	ND	26	26	39	26	<i>Chrysomya megacephala</i>	Pavilhão Arthur Neiva
42	ND	ND	28	30	30	30	<i>Chrysomya megacephala</i>	Pavilhão Arthur Neiva
43	ND	ND	32	28	30	26	<i>Chrysomya megacephala</i>	Pavilhão Arthur Neiva
44	<i>Rummeliibacillus</i> sp./ <i>Kurthia gibsonii</i> / <i>Bacillus</i> sp.	<i>Proteus penneri</i> / <i>vulgaris</i>	16	10	32	22	<i>Chrysomya megacephala</i>	Pavilhão Arthur Neiva
45	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus cereus</i> group	34	44	ND	40	<i>Chrysomya megacephala</i>	Pavilhão Arthur Neiva
46	ND	ND	31	28	26	30	<i>Chrysomya putoria</i>	Amorim
47	ND	ND	22	26	25	28	<i>Chrysomya putoria</i>	Amorim
48	ND	ND	29	22	25	26	<i>Chrysomya putoria</i>	Amorim
49	ND	ND	32	26	30	34	<i>Chrysomya putoria</i>	Amorim
50	ND	<i>Lactococcus lactis</i>	32	22	ND	34	<i>Chrysomya putoria</i>	Amorim
51	ND	ND	30	26	30	34	<i>Musca domestica</i>	Amorim
52	ND	ND	27	24	36	30	<i>Musca domestica</i>	Amorim
53	ND	ND	34	34	30	34	<i>Musca domestica</i>	Amorim
54	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp.	28	20	34	26	<i>Musca domestica</i>	Amorim
55	ND	<i>Acinetobacter ursingii</i>	22	20	36	30	<i>Musca domestica</i>	Amorim
56	<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	26	20	40	30	<i>Musca domestica</i>	Amorim
57	ND	<i>Acinetobacter</i> sp.	18	18	32	26	<i>Musca domestica</i>	Amorim

58	ND	NI	24	24	32	32	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
59	ND	NI	30	20	ND	30	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
60	ND	ND	32	32	28	30	<i>Chrysomya megacephala</i>	Amorim
61	ND	ND	>40	>40	>40	>40	<i>Fannia</i> sp.	Quinta da Boa Vista
62	ND	ND	32	34	34	38	<i>Fannia</i> sp.	Quinta da Boa Vista
63	ND	ND	>40	>40	>40	>40	<i>Fannia</i> sp.	Quinta da Boa Vista
64	ND	ND	34	30	36	36	<i>Fannia</i> sp.	Quinta da Boa Vista
65	ND	ND	36	34	36	40	Sarcophagidae	Quinta da Boa Vista
66	ND	ND	36	32	36	38	Sarcophagidae	Quinta da Boa Vista
67	ND	ND	34	32	36	40	Sarcophagidae	Quinta da Boa Vista
68	ND	ND	30	28	40	40	Sarcophagidae	Quinta da Boa Vista
69	ND	ND	>40	>40	>40	>40	Sarcophagidae	Quinta da Boa Vista
70	ND	ND	39	30	31	33	<i>Chrysomya megacephala</i>	INI
71	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	29	25	<i>Chrysomya megacephala</i>	INI
72	ND	<i>Lactococcus lactis</i>	12	0	35	20	<i>Chrysomya megacephala</i>	INI
73	ND	ND	>40	>40	>40	>40	<i>Chrysomya megacephala</i>	INI
74	ND	<i>Enterococcus faecalis</i>	24	25	20	19	<i>Chrysomya megacephala</i>	INI
75	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	28	29	18	20	Sarcophagidae	INI
76	ND	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	32	22	ND	22	Sarcophagidae	INI
77	ND	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	23	ND	0	Sarcophagidae	INI
78	ND	ND	34	27	29	34	Sarcophagidae	INI
79	ND	ND	26	21	40	30	Sarcophagidae	INI
80	ND	<i>Bacillus cereus</i> group	0	0	ND	20	Sarcophagidae	INI
81	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	23	26	18	17	Sarcophagidae	INI
82	ND	<i>Enterococcus faecalis</i>	10	0	30	16	Sarcophagidae	INI
83	ND	<i>Pseudomonas</i> sp.	24	18	ND	24	<i>Chrysomya megacephala</i>	INI
84	ND	<i>Pseudomonas</i> sp.	20	24	20	18	<i>Chrysomya megacephala</i>	INI

85	ND	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	21	23	17	17	<i>Chrysomya megacephala</i>	INI
86	ND	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	25	22	38	30	<i>Chrysomya megacephala</i>	INI
87	ND	<i>Pseudomonas</i> sp.	30	22	ND	34	Sarcophagidae	INI
88	ND	NI	15	18	32	23	Sarcophagidae	INI
89	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	20	25	15	20	Ulidiidae	INI
90	ND	<i>Serratia marcescens</i>	31	30	28	30	Ulidiidae (=Otitidae)	INI
91	ND	<i>Staphylococcus sciuri</i>	25	17	40	27	Ulidiidae (=Otitidae)	INI
92	ND	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	17	20	16	17	Sarcophagidae	INI
93	ND	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30	24	ND	22	<i>Chrysomya megacephala</i>	INI
94	ND	<i>Escherichia coli</i>	32	29	29	30	Sarcophagidae	INI
95	ND	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	24	22	15	20	Sarcophagidae	INI
96	ND	<i>Pseudomonas</i> sp.	24	18	ND	26	Sarcophagidae	INI
97	ND	<i>Pseudomonas</i> sp.	20	24	ND	24	Ulidiidae (=Otitidae)	INI
98	ND	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	25	16	14	16	<i>Chrysomya albiceps</i>	Pavilhão Arthur Neiva
99	ND	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	28	28	ND	20	<i>Chrysomya albiceps</i>	Pavilhão Arthur Neiva
100	ND	<i>Staphylococcus sciuri</i>	27	20	38	30	<i>Chrysomya albiceps</i>	Pavilhão Arthur Neiva
101	ND	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	21	15	ND	32	<i>Chrysomya albiceps</i>	Pavilhão Arthur Neiva
102	ND	<i>Citrobacter</i> sp.	37	29	29	32	Sarcophagidae	Pavilhão Arthur Neiva
103	ND	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	20	20	16	18	Sarcophagidae	Pavilhão Arthur Neiva
104	ND	<i>Pseudomonas</i> sp.	20	20	ND	30	Sarcophagidae	Pavilhão Arthur Neiva
105	ND	<i>Acinetobacter</i> sp.	20	18	35	28	Sarcophagidae	Pavilhão Arthur Neiva
106	ND	<i>Enterobacter aerogenes</i>	32	29	28	30	Sarcophagidae	Pavilhão Arthur Neiva
107	ND	<i>Serratia marcescens</i>	37	32	29	33	Sarcophagidae	Pavilhão Arthur Neiva
108	ND	<i>Pseudomonas</i> sp.	26	24	ND	30	Ulidiidae (=Otitidae)	Pavilhão Arthur Neiva
109	ND	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	26	30	ND	22	Ulidiidae (=Otitidae)	Pavilhão Arthur Neiva
110	ND	NI	28	25	40	28	Ulidiidae (=Otitidae)	Pavilhão Arthur Neiva
111	ND	<i>Pseudomonas</i> sp.	26	22	37	27	Ulidiidae (=Otitidae)	Pavilhão Arthur Neiva
112	ND	NI	28	25	34	29	Ulidiidae (=Otitidae)	Pavilhão Arthur Neiva

113	ND	<i>Serratia marcescens</i>	37	35	30	35	Ulidiidae (=Otitidae)	Pavilhão Arthur Neiva
114	ND	NI	28	24	ND	28	Sarcophagidae	INCQS
115	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	26	30	ND	25	Sarcophagidae	INCQS
116	ND	<i>Staphylococcus sciuri</i>	32	21	40	31	Sarcophagidae	INCQS
117	ND	<i>Pseudomonas</i> sp.	34	28	ND	40	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	INCQS
118	ND	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	26	24	19	20	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	INCQS
119	ND	ND	30	34	ND	34	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	INCQS
120	ND	NI	20	18	ND	28	“Acaliptrados”	Campo de Santana
121	ND	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	28	24	18	22	“Acaliptrados”	Campo de Santana
122	ND	NI	26	18	ND	26	Sarcophagidae	Campo de Santana
123	ND	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	28	28	15	21	Sarcophagidae	Campo de Santana
124	ND	NI	18	18	ND	18	Sarcophagidae	Campo de Santana
125	ND	NI	22	20	ND	25	Muscidae	Campo de Santana
126	ND	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30	26	16	17	Muscidae	Campo de Santana
127	ND	ND	30	36	ND	32	Muscidae	Campo de Santana
128	ND	ND	26	26	ND	34	<i>Chrysomya albiceps</i>	Pavilhão Arthur Neiva
129	ND	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	28	20	22	21	<i>Chrysomya albiceps</i>	Pavilhão Arthur Neiva
130	ND	<i>Staphylococcus sciuri</i>	25	17	37	31	<i>Chrysomya albiceps</i>	Pavilhão Arthur Neiva
131	ND	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30	26	20	22	<i>Chrysomya albiceps</i>	Pavilhão Arthur Neiva
132	ND	NI	24	19	35	28	<i>Chrysomya albiceps</i>	Pavilhão Arthur Neiva
133	ND	ND	26	24	ND	34	<i>Chrysomya megacephala</i>	Pavilhão Arthur Neiva
134	ND	ND	30	30	ND	34	<i>Chrysomya megacephala</i>	Pavilhão Arthur Neiva
135	ND	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	22	24	ND	30	<i>Chrysomya megacephala</i>	Pavilhão Arthur Neiva
136	ND	ND	30	32	ND	40	<i>Chrysomya putoria</i>	Pavilhão Arthur Neiva
137	ND	ND	30	30	ND	34	<i>Chrysomya putoria</i>	Pavilhão Arthur Neiva
138	ND	ND	37	35	ND	27	<i>Chrysomya putoria</i>	Pavilhão Arthur Neiva
139	ND	<i>Proteus vulgaris/penneri</i>	36	36	ND	34	<i>Chrysomya putoria</i>	Pav. Arthur Neiva

140	ND	<i>Pseudomonas</i> sp./ <i>Proteus</i> <i>vulgaris/penneri</i>	33	30	20	30	<i>Hemilucilia</i> sp.	Pavilhão Arthur Neiva
141	ND	NI	38	32	34	32	<i>Hemilucilia</i> sp.	Pavilhão Arthur Neiva
142	ND	NI	34	30	28	32	<i>Hemilucilia</i> sp.	Pavilhão Arthur Neiva
143	ND	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	33	32	ND	33	<i>Hemilucilia</i> sp.	Pavilhão Arthur Neiva
144	ND	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	20	24	ND	19	<i>Hemilucilia</i> sp.	Pavilhão Arthur Neiva
145	ND	NI	34	28	32	38	Sarcophagidae	Pavilhão Arthur Neiva
146	ND	NI	30	28	32	30	Sarcophagidae	Pavilhão Arthur Neiva
147	ND	NI	32	30	32	34	Sarcophagidae	Pavilhão Arthur Neiva
148	ND	<i>Acinetobacter</i> sp.	23	20	32	30	Sarcophagidae	Pavilhão Arthur Neiva
149	ND	NI	36	30	32	32	Ulidiidae (=Otitidae)	Pavilhão Arthur Neiva
150	ND	NI	34	30	32	34	Ulidiidae (=Otitidae)	Pavilhão Arthur Neiva
151	ND	NI	34	30	34	34	Ulidiidae (=Otitidae)	Pavilhão Arthur Neiva
152	ND	ND	34	26	30	34	<i>Lucillia</i> sp.	INCQS
153	ND	<i>Microbacterium</i> sp.	14	0	26	26	<i>Lucillia</i> sp.	INCQS
154	ND	ND	32	30	32	32	<i>Lucillia</i> sp.	INCQS
155	ND	ND	26	32	36	30	Sarcophagidae	INCQS
156	ND	ND	44	24	52	50	Sarcophagidae	INCQS
157	ND	ND	33	28	32	36	Sarcophagidae	INCQS
158	ND	NI	32	12	50	40	<i>Synthesiomyia</i> <i>nudiseta</i>	INCQS
159	ND	NI	15	0	30	22	<i>Synthesiomyia</i> <i>nudiseta</i>	INCQS
160	ND	NI	28	12	44	38	<i>Synthesiomyia</i> <i>nudiseta</i>	INCQS
161	ND	ND	34	26	30	36	<i>Synthesiomyia</i> <i>nudiseta</i>	INCQS
JC39	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	23	20	20	20	<i>Ophyra</i> <i>chalcogaster</i>	INCQS
JC40	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	23	25	19	20	<i>Ophyra</i> <i>chalcogaster</i>	INCQS
JC41	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	24	26	16	20	<i>Ophyra</i> <i>chalcogaster</i>	INCQS
JC42	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	26	25	19	16	<i>Ophyra</i> <i>chalcogaster</i>	INCQS
JC44	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	25	25	20	21	<i>Atherigona</i> <i>orientalis</i>	INCQS

JC45	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	16	23	20	21	<i>Atherigona orientalis</i>	INCQS
JC46	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	23	19	20	18	<i>Atherigona orientalis</i>	INCQS
JC47	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30	16	17	21	<i>Musca domestica</i>	INCQS
JC48	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	25	23	22	24	<i>Musca domestica</i>	INCQS
JC49	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	23	25	18	18	<i>Musca domestica</i>	INCQS
JC50	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	25	28	18	18	<i>Musca domestica</i>	INCQS

n° intermediário ou resistente/ n° sensibilidade dose-dependente/ ND – não determinado/ NI – não identificado/ **negrito** – identificação concluída a partir de provas bioquímicas

A figura 9 representa um dos resultados do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, onde as cefalosporinas (FEP e CAZ), apresentaram resistência e o carbapenema (IMP) apresentou perfil intermediário.



Figura 8 – Resultado de antibiograma, que demonstrou resistência às cefalosporinas e apresentou resultado intermediário para o carbapenema. Acervo pessoal.

As amostras que apresentaram resultado no MALDI-TOF EM como *Proteus penneri/vulgaris* foram submetidas a testes bioquímicos convencionais para confirmar a identificação. Estes resultados estão representados na tabela 7 e nas figuras 10 e 11.

Tabela 7 – Identificação bioquímica das amostras de *Proteus penneri/vulgaris*

Cepa	H ₂ S	Indol	Motilidade	Ornitina	Citrato	OF glicose	Resultado
1	neg	pos	pos	pos	neg	Assacarolítico	NI
21	neg	pos	pos	pos	neg	Fermentativo	NI
27	neg	neg	neg	neg	neg	Fermentativo	<i>Proteus penneri</i>

28	pos	pos	pos	neg	neg	ND	<i>Proteus vulgaris</i>
44	neg	pos	neg	ND	neg	ND	NI
139	pos	pos	pos	neg	neg	ND	<i>Proteus vulgaris</i>

H₂S – sulfeto de hidrogênio/ OF – oxidação-fermentação/ ND – não determinado/ NI – não identificado



Figura 9 – Testes bioquímicos. Da esquerda para a direita – ornitina (positiva), SIM (H₂S negativo, indol positivo, móvel) e citrato negativo. Acervo pessoal.



Figura 10 – Testes bioquímicos. Da esquerda para a direita – ornitina (negativa), SIM (H₂S positivo, indol positivo, móvel) e citrato negativo. Acervo pessoal.

5.4. Detecção de genes de resistência e virulência

O processo de extração não funcionou em 22 dos 80 isolados com perfil intermediário ou resistente no TSA, logo a pesquisa por genes de resistência foi realizada em 52 isolados, e apresentou resultados negativos. Já a pesquisa pelo gene de virulência *hblA*, feita nos isolados 033 e 080, ambos identificados como do grupo *B. cereus*, apresentou resultado positivo nos dois isolados. Na figura 12 estão representados os controles positivos utilizados na detecção dos genes de resistência.

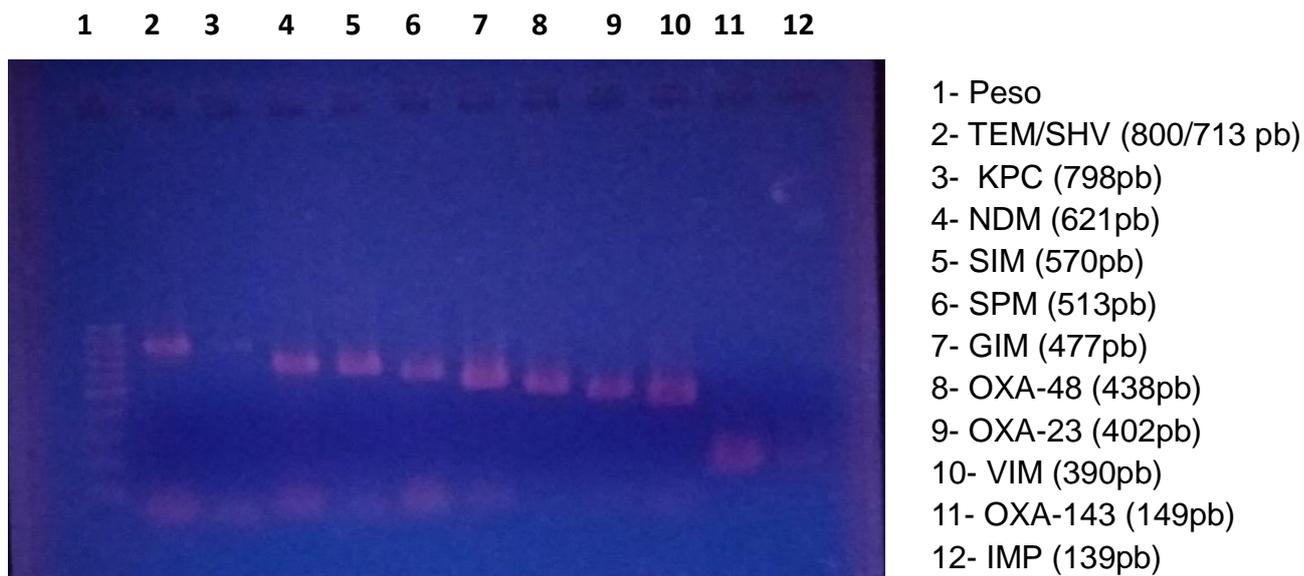


Figura 11 – Gel de agarose 1,5% com controles positivos utilizados na reação de PCR para a detecção dos genes de resistência. Acervo pessoal.

5.5. Análise do polimorfismo genético por PFGE

Foram encontrados quatro genótipos entre os 38 isolados de *P. fluorescens* e *Pseudomonas* sp. estudados (A, B, C e D). Estes isolados foram oriundos de diferentes pontos do Campus Fiocruz e também do Campo de Santana. O perfil A foi encontrado em 26 (70,2%) dos isolados, já os perfis B, C e D foram encontrados, respectivamente em 1 (2,7%), 1 (2,7%) e 8 (21,6%) isolados. Além disso, tivemos 1 isolado (2,7%) no qual não foi possível a determinação do genótipo. Estes resultados são demonstrados nas figuras 12, 13, 14 e 15.

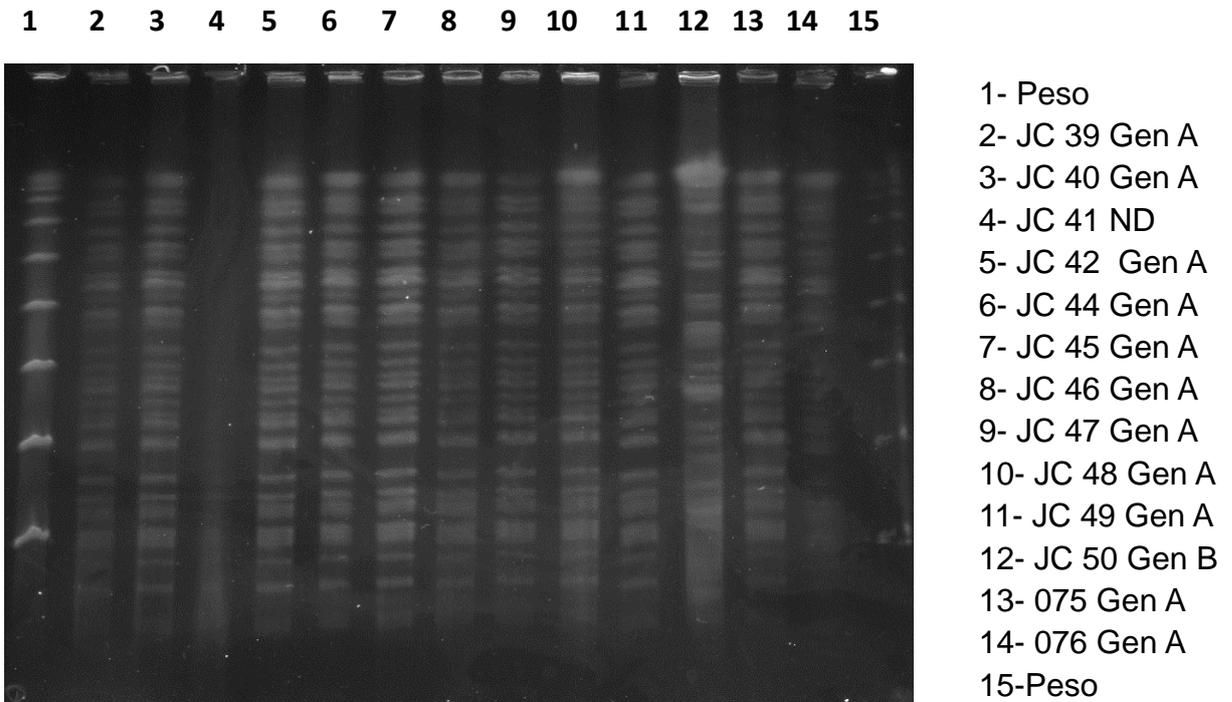


Figura 12 – Gel 1 de PFGE dos isolados identificados como *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas* sp.

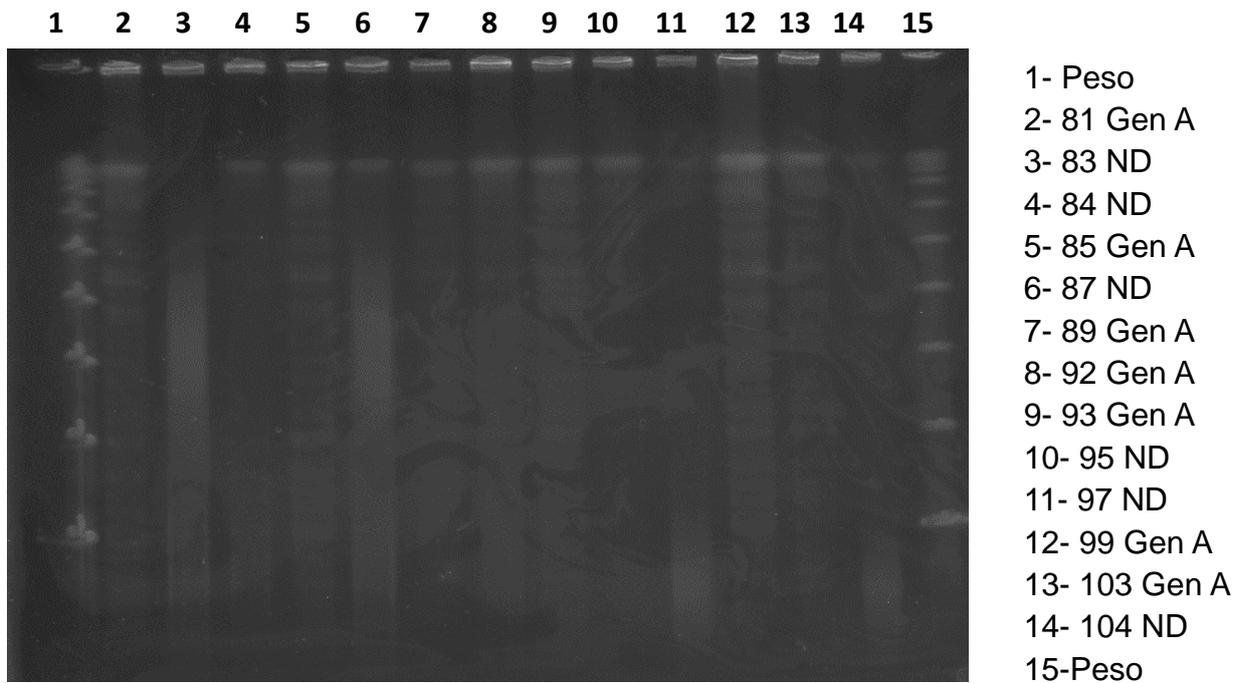


Figura 13 – Gel 2 de PFGE dos isolados identificados como *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas* sp.

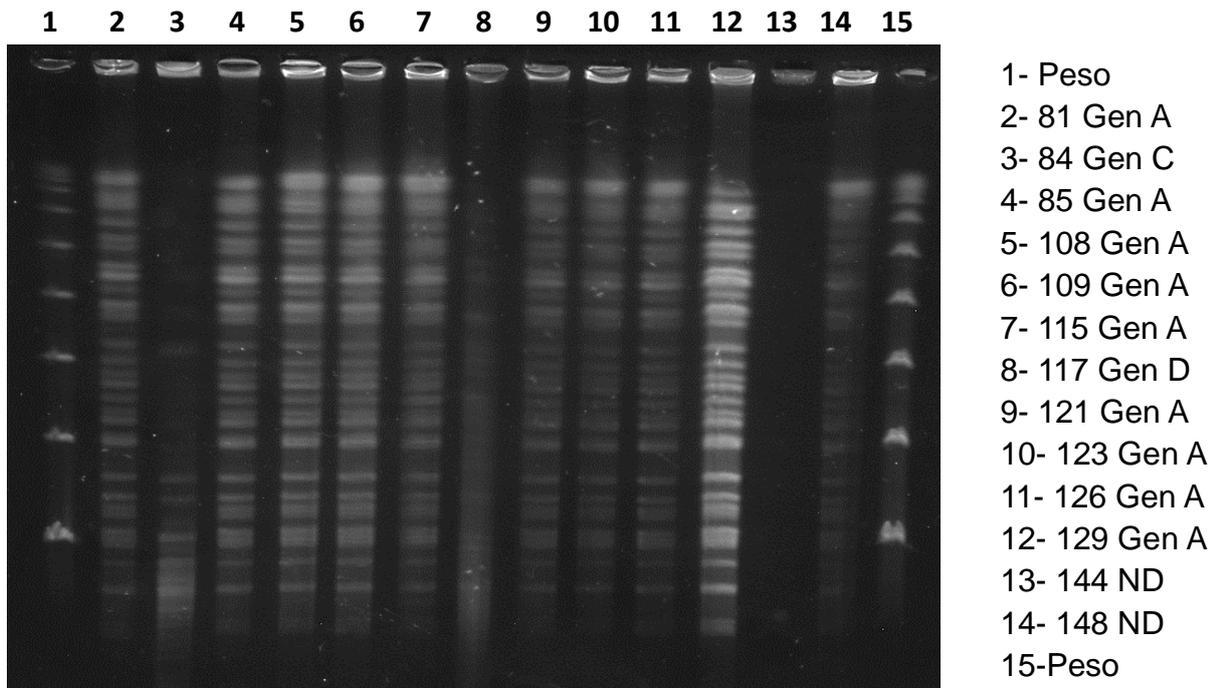


Figura 14 – Gel 3 de PFGE dos isolados identificados como *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas* sp.

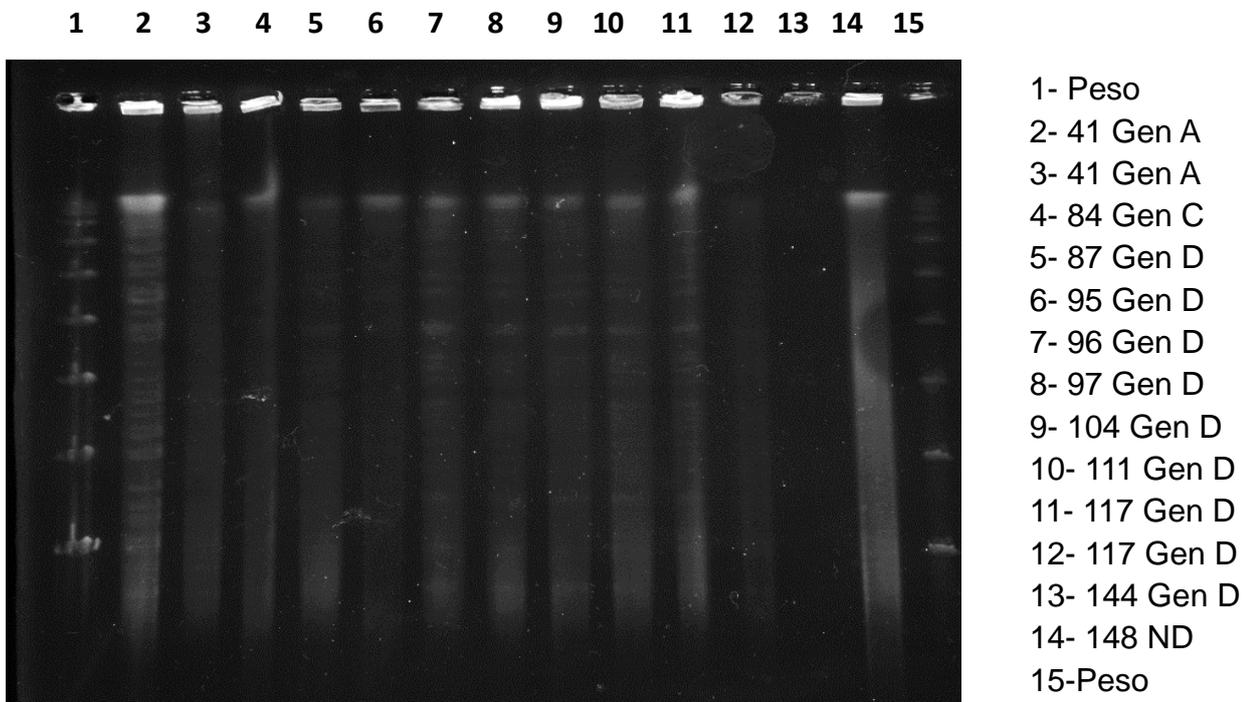


Figura 15 – Gel 4 de PFGE dos isolados identificados como *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas* sp.

6 DISCUSSÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos se deve a diversos fatores, tais como o seu consumo elevado e a sua utilização como fatores de crescimento em criação animal. Além disso, o deficiente controle de infecção, a mobilidade humana, o comércio de animais e alimentos e a associação a plasmídeos epidêmicos ou clones de sucesso favorecem o aparecimento e a disseminação da resistência a estas drogas. As bactérias multirresistentes deixaram de ser um problema restrito ao ambiente hospitalar, sendo encontradas em variados ambientes extra-hospitalares.

Os dípteros muscoides apresentam alto grau de sinantropia, além de atuarem como agentes irritantes e espoliadores, produtores de miíases, hospedeiros intermediários de diversos parasitas e vetores mecânicos de agentes patogênicos, como bactérias, protozoários, helmintos (ovos e larvas), fungos e vírus, o que lhes confere alta importância sanitária, epidemiológica e epizootica (Graczyk et al. 2001; Oliveira et al. 2002). Este conjunto de fatores ressalta a importância da pesquisa de resistência aos antimicrobianos em bactérias presentes nestes dípteros, pois a sua disseminação pode agravar ainda mais a problemática da disseminação dessa resistência na comunidade.

A presença de dípteros das espécies *C. megacephala*, *C. putoria* e *M. domestica* na caçamba de lixo na comunidade do Amorim próximo ao Campus Manguinhos corrobora com relatos da presença destas mesmas espécies nesse tipo de ambiente em outras localidades no Brasil (Oliveira et al. 2002), no Marrocos (Bouamama et al. 2010), na China (Liu et al. 2013) e na Tailândia (Chaiwong et al. 2014).

As espécies *C. megacephala* e *C. putoria* foram encontradas também em carne de peixe não aproveitada por um comerciante local da comunidade do Amorim. A espécie *C. megacephala* também já foi coletada em locais como restaurantes e cafeterias (Liu et al. 2013; Chaiwong et al. 2014), sugerindo a

atração dessa espécie por alimentos preparados. A espécie *C. putoria* é atraída por carne fresca e peixe (Lindsay et al. 2012).

A captura de dípteros das famílias Fanniidae e Sarcophagidae em área verde próximo a um hospital utilizando carne bovina putrefata como isca atrativa mostrou-se eficiente uma vez que dípteros dessas mesmas famílias foram coletados em floresta utilizando carne suína em processo de decomposição (Vasconcelos et al. 2013). Dípteros da família Sarcophagidae também foram coletados em mercados de carne (Dharne et al. 2008).

Dípteros da espécie *C. megacephala* (Calliphoridae) e espécies da família Sarcophagidae foram coletados próximos a um hospital em armadilhas que continham carne de peixe putrefata como isca. Este tipo de atrativo já foi utilizado em outros estudos (Oliveira et al. 2002; Yepes-Gaurisas et al. 2013).

Dípteros da família Ulidiidae (= Otitidae) foram coletados em armadilhas contendo carne de peixe em putrefação e também em armadilha Shannon utilizando-se animais mortos como isca. Isso se justifica pois há importantes gêneros desta família que possuem hábitos saprófagos (Goyal et al. 2012).

O uso de armadilhas com iscas animais é eficiente na captura de dípteros da família Calliphoridae (Sousa et al. 2010), corroborando com nossos achados de dípteros das espécies *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria* e *Hemilucilia* sp. na armadilha Shannon.

Alguns membros da família Chloropidae, que é uma das componentes do grupo dos “acaliptrados”, se desenvolvem em excrementos (Fernandes et al. 2012). Logo, é possível encontrar “acaliptrados” sobrevoando fezes diarreicas, como aconteceu no Campo de Santana.

Algumas espécies de dípteros foram coletadas em ambiente laboratorial que, assim como um hospital, é potencialmente contaminado devido à quantidade de microrganismos, alguns patogênicos, que são pesquisados nestes estabelecimentos. O fato de haver dípteros circulando nestes ambientes

é motivo de atenção, pois toda a contaminação ali presente pode ser levada ao meio extra-hospitalar ou extra-laboratorial. Além disso, estes contaminantes possivelmente patogênicos e resistentes a antimicrobianos podem entrar em contato com a microbiota presente no inseto, efetuando transferência horizontal de genes de resistência e/ou virulência.

A fim de identificar a microbiota bacteriana presente em dípteros muscoides resistentes a antimicrobianos de importância clínica a partir de 18 coletas, utilizamos ferramentas modernas de identificação que seriam rápidas e de baixo custo, uma vez que as provas bioquímicas e fisiológicas tradicionais para a identificação de uma alta gama de bactérias ambientais de diferentes gêneros e espécies seria inviável num projeto como este. Os resultados apresentados na tabela 5 mostram a eficiência do MALDI-TOF EM que foi capaz de identificar 47,7% das amostras. Infelizmente não foi possível neste trabalho sequenciar o gene 16S rRNA de todos os isolados, mas mesmo assim a tabela 5 apresenta a alta congruência entre as duas ferramentas moleculares de identificação bacteriana. Somente em 2 casos houve discrepância nos resultados. No isolado 1 foram identificados dois bastonetes Gram-negativos pertencentes a gêneros diferentes. No isolado 44, o sequenciamento do gene 16S rRNA identificou *Rummeliibacillus sp./ Kurthia gibsonii/ Bacillus sp.* enquanto que o MALDI-TOF EM indicou *Proteus penneri/vulgaris*. Este resultado onde uma ferramenta indica uma bactéria Gram-positiva e a outra Gram-negativa, sugere que houve contaminação da amostra na etapa de processamento da mesma.

A técnica de MALDI-TOF EM, apesar de suas grandes vantagens, como qualquer outra ferramenta, apresenta limitações: é aplicável apenas para microrganismos cultiváveis e apresenta discordâncias em suas bases de dados. Estas limitações podem se dar devido a fatores como a composição da parede celular bacteriana ou influências do tratamento da amostra antes da execução da técnica de MALDI-TOF EM (Santos et al. 2016). Estas limitações são refletidas em nosso estudo nos isolados que foram identificados como *Proteus penneri/vulgaris* e em outros que não foram identificados (Tabela 5).

Desta forma a tabela 6 e as figuras 8 e 9 apresentam os resultados da identificação bioquímica dos isolados do gênero *Proteus* a fim de discriminá-los ao nível de espécie. Foi observada também uma incongruência no isolado 140, que foi submetido à técnica de MALDI-TOF EM duas vezes, apresentando identificações distintas, requerendo novas análises.

Nosso estudo buscou aliar as ferramentas moleculares a uma das ferramentas mais básicas da bacteriologia, que é a coloração de Gram. Em apenas dois isolados (44 e 45) foi observada discrepância entre os resultados de identificação com a coloração de Gram. Todos estes fatores apresentados demonstram a eficiência da técnica de MALDI-TOF EM, pois entre 83 isolados identificados por meio desta metodologia, em apenas 4 pudemos observar algum tipo de incongruência.

No começo de nosso estudo utilizamos o antibiótico ceftriaxona, uma cefalosporina de terceira geração, na concentração de 0,5 mg/L. Em um estudo feito na China (Liu et al. 2013) foi demonstrado que 48 amostras bacterianas isoladas em meio suplementado com cefalotina, uma cefalosporina de primeira geração, a 20mg/L apresentaram resistência a pelo menos oito antimicrobianos. No presente estudo, estávamos selecionando poucos isolados realmente resistentes até aquele momento, apesar de estar utilizando um antibiótico de maior espectro. Logo, decidimos aumentar a concentração de nosso antibiótico para 0,75 mg/L e, posteriormente, 1 mg/L. Os resultados seguintes mostraram que foi uma boa escolha, pois conseguimos isolar mais bactérias que apresentaram perfis intermediários ou resistentes. Novamente, ao comparar o nosso estudo com o estudo chinês, pudemos observar resistência a ceftazidima e cefepime, cefalosporinas de terceira e quarta geração, respectivamente, assim como observado por aqueles autores. Em contrapartida, encontramos resistência a imipenem e meropenem, que são antimicrobianos carbapenêmicos de maior espectro que as cefalosporinas, dado que não foi encontrado no estudo chinês.

Um fato interessante que notamos foi que a quantidade de UFC/mL se elevou conforme aumentamos a concentração de ceftriaxona mas diminuiu a variabilidade. Sabemos que o antibiótico já exerce uma pressão seletiva e as bactérias sensíveis a ele ficam em desvantagem na competição. Se há menos bactérias para competir pelos nutrientes naquele meio de cultura, podemos sugerir que isso facilita o crescimento das bactérias que suportam a presença daquele antibiótico.

Podemos sugerir também que as bactérias possam estar utilizando o antibiótico como fonte de carbono, o que caracteriza o fenômeno chamado de subsistência, ou simplesmente a pressão do antibiótico pode estar induzindo a bactéria a suportar a sua presença (Amábile-Cuevas, 2012). As bactérias que suportam a presença do antibiótico, certamente, sairão em vantagem competitiva.

Bactérias do gênero *Proteus* são patógenos oportunistas que podem causar infecções do trato urinário e outras infecções hospitalares, como infecções do trato respiratório e infecções de ferida (Kwil et al. 2013). Este gênero já foi visto em dípteros das espécies *C. megacephala* e *M. domestica* na Tailândia (Chaiwong et al. 2014) e foi verificado também que a espécie *P. mirabilis* é capaz de resistir no trato digestório de *M. domestica* por até três dias (Wei et al. 2014).

Já o gênero *Myroides* é reportado como patógeno oportunista que, apesar de raro, já causou infecções fatais em tecidos e surtos hospitalares e apresenta resistência a vários antimicrobianos. Foi identificado também como causa de infecções em feridas cirúrgicas e do trato urinário, septicemia, pneumonia, fasciculite, meningite e ventriculite (Dharne et al. 2008; Burghartz et al. 2015). As bactérias desse gênero foram abundantes em pupas das espécies *Lucilia sericata* e *Lucilia cuprina* (Singh et al. 2015). Esses achados se assemelham aos encontrados em nosso estudo nas pupas de *L. eximia*.

Bacillus sp. foi uma das bactérias mais prevalentes isolada a partir de *C. megacephala* e *M. domestica* na Tailândia (Chaiwong et al. 2014). Devido a

sua capacidade de formar esporos resistentes ao calor, ser ubiqüitária, formar biofilmes e produzir toxinas responsáveis pela intoxicação alimentar, *B. cereus* tornou-se um problema na indústria de alimentos. *B. cereus* enteropatogênico causa diarreia devido a produção de enterotoxinas no intestino humano (Jeßberger et al. 2015). Embora *a priori* não fosse um dos objetivos deste trabalho a pesquisa de genes de virulência, dada a importância da enterotoxina envolvida na síndrome diarreica, toxina HBLA, no grupo *B. cereus*, pesquisamos a presença do gene *hblA* que estava presente em todos os isolados do grupo *B. cereus*. As outras toxinas que podem estar envolvidas nesta síndrome são a enterotoxina não-hemolítica (NHE), a citotoxina K e as enterotoxinas T e FM (Ali & Hussain, 2015) que serão posteriormente pesquisadas quanto à sua presença.

Micrococcus luteus é um microrganismo que ocasionalmente está associada a infecções como endocardite, artrite e meningite. No ambiente, quando exposto a condições desfavoráveis, pode assumir um estado de dormência. Este microrganismo já foi isolado a partir de exemplares de *M. domestica* coletados em uma fábrica de anchovas (Mukamolova et al. 2002; Nazni et al. 2005; Miltiadou & Elisaf, 2011).

Lactococcus lactis foi originalmente isolado de leite e superfície de plantas e já há relatos de infecções por essa bactéria em pacientes imunocomprometidos (Karaaslan et al. 2014). A espécie *Lactococcus garvieae* já foi isolada a partir de *M. domestica* (Wei et al. 2013).

Entre as espécies do gênero *Acinetobacter*, a mais comumente isolada em amostras clínicas é *A. baumannii*, havendo poucos casos de bacteremia relacionados à espécie *Acinetobacter ursingii*. Recentemente foi isolada uma cepa dessa espécie produtora da metalo- β -lactamase IMP-1, que hidroliza imipenem, penicilina, cefalosporinas de espectro estendido, mas não aztreonam (Queenan & Bush, 2007; Endo et al. 2012). A espécie *Acinetobacter johnsonii* é encontrada em ambientes aquáticos, mas pode colonizar o ser humano causando infecções e já foi relatada a presença da metalo- β -

lactamase NDM-1 neste microrganismo (Feng et al. 2016). A presença de *Acinetobacter* sp. na superfície externa de *M. domestica* já foi relatada (Nazni et al. 2005).

Entre as espécies de CoNS, *Staphylococcus sciuri* possui importância clínica devido estar associada com infecções como endocardite, infecções do trato urinário e infecções de feridas. *S. xylosus* é uma bactéria comensal na pele e mucosas de mamíferos e aves, mas pode atuar como patógeno oportunista em humanos e animais. É capaz de formar biofilmes, persistindo no solo e em superfícies e adaptando-se a diferentes ambientes. *Staphylococcus gallinarum* é uma espécie originalmente isolada da pele de galinhas, por isso o seu nome. Apesar de ser um patógeno raro, já foi relatada em um caso de endoftalmite. A espécie *S. haemolyticus* é, entre os CoNS, a segunda mais isolada em hemoculturas e a que apresenta os mais altos níveis de resistência a antimicrobianos. Há relatos da espécie *S. aureus* e outras espécies de estafilococos coagulase-negativa isoladas a partir de *M. domestica* e *C. megacephala* (Dordet-Frisoni et al. 2007; Tibra et al. 2009; Bouanama et al. 2010; Butler et al. 2010; Barros et al. 2012; Coimbra et al. 2011; Gupta et al. 2012; Chaiwong et al. 2014).

Enterococcus faecalis é a espécie mais distribuída do gênero *Enterococcus*, sendo encontrada no trato intestinal de animais e no meio ambiente. Esta bactéria apresenta sensibilidade reduzida aos antimicrobianos β -lactâmicos. Este microrganismo já foi isolado a partir de *C. megacephala* e *M. domestica* capturadas em áreas urbanas próximo a mercados de carne (Sukontason et al. 2007; Guzman-Prieto et al. 2016). Em nosso trabalho, este isolamento foi feito a partir das mesmas espécies de moscas coletadas com isca de peixe próximo ao abrigo de resíduos de um hospital.

Pseudomonas fluorescens é uma bactéria que apresenta menor virulência, quando comparada a *P. aeruginosa*, o microrganismo mais isolado dentro do gênero *Pseudomonas*, porém está associada a casos de bacteremia relacionada principalmente a transfusão de sangue contaminado. Além disso,

apresenta grande versatilidade metabólica, o que lhe confere a capacidade de habitar em vários hospedeiros. Com os avanços das técnicas de comparação genômica, percebe-se que na verdade *P. fluorescens* é um complexo de espécies (Scales et al. 2014). A partir disso, nosso achado desta bactéria em califorídeos, sarcófagídeos, muscídeos e “acaliptrados” coletados no Campus Manguinhos da Fiocruz e no Campo de Santana é corroborado. Além disso, o fato de cepas identificadas como *Pseudomonas* sp. terem apresentado perfil semelhante na técnica de PFGE levanta a dúvida sobre a possibilidade destas espécies fazerem parte do complexo *P. fluorescens*. Ainda, este achado abre caminhos para a investigação dos dípteros muscoides como reservatórios destas bactérias, por um lado e sobre a presença de dois clones majoritários, genótipo A e D, circulando em diferentes ambientes, sendo disseminados pelos dípteros muscoides. Vale ressaltar que, no Campo de Santana, os “acaliptrados” a partir dos quais esta bactéria foi isolada foram coletados sobrevoando fezes diarreicas. Considerando a possibilidade da pessoa que defecou estar infectada por uma EPEC, por exemplo, que é reconhecida por sua alta capacidade de compartilhar informações genéticas por meio de transferência horizontal de genes, *P. fluorescens* dos nossos estudos pode ter recebido genes de resistência e/ou virulência. E a partir do momento em que ela é transportada pela mosca, pode estar transferindo estes genes para a microbiota presente no inseto.

Stenotrophomonas maltophilia é um patógeno oportunista resistente a várias classes de antimicrobianos, como beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, devido a mecanismos como bombas de efluxo. Logo, as opções terapêuticas para este microrganismo ficam restritas a levofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim. Esta bactéria já foi isolada a partir de *M. domestica* coletada em parque público (Gupta et al. 2012; Çikman et al. 2016). Em nosso trabalho, isolamos a partir de sarcófagídeos coletados nas proximidades do INI.

As espécies do gênero *Microbacterium* são encontradas tanto em ambientes terrestres quanto aquáticos, principalmente nos sedimentos dos lagos. Porém a espécie *Microbacterium paraoxydans* foi relatada em um caso

de bacteremia em uma criança de cinco anos com leucemia. Aliás, essa espécie foi descrita a partir deste caso. Outras espécies deste gênero (*Microbacterium liquafaciens*, *Microbacterium esteraromaticum*, *Microbacterium lacticum* e *Microbacterium barkeri*) foram isoladas a partir do trato intestinal de *M. domestica* (Zurek et al. 2000; Laffineur et al. 2003; Chen et al. 2016).

Ao fazer uma correlação entre as bactérias isoladas e as moscas pudemos observar que a maior diversidade foi observada a partir de *C. megacephala* e dos sarcófagídeos. E entre essa diversidade estão as bactérias que são frequentemente isoladas em amostras clínicas e que estão envolvidas em IRAS. Estes dípteros são bem associados aos ambientes humanos, onde estes patógenos também estão presentes. É bom ressaltar também que a espécie *C. megacephala* foi introduzida no Brasil e se adaptou muito bem ao nosso ambiente, espalhando-se pelo nosso território (Dear, 1985). Logo, torna-se plenamente possível o contato desta espécie com os microrganismos presentes em nossos ambientes.

Os relatos de infecções por bactérias multi-resistentes, tanto de espécies Gram-negativas quanto Gram-positivas são cada vez mais frequentes. Como compositores deste cenário de resistência bacteriana aos antimicrobianos temos os hospitais e as fazendas de criação animal. A partir destes componentes a resistência é disseminada para os mais diversos ambientes interligados, tais como: solo, esgotos sanitários, residências, restaurantes, comunidade em geral. Os dípteros muscoides são os componentes que frequentam todos esses ambientes e por isso requerem a nossa atenção como potenciais disseminadores dessa resistência. Essa disseminação através dos dípteros muscoides já vem sendo estudada no mundo, mas ainda há poucos relatos no Brasil.

De acordo com Kappel et al. (2013), insetos pertencentes à ordem Diptera possuem alta capacidade de movimentação e acesso praticamente ilimitado a fezes humanas, lixo, feridas abertas e instrumentos médicos contaminados, logo eles podem representar uma ligação entre áreas infectadas

e não infectadas, seja no ambiente hospitalar ou no ambiente externo. Os mesmos autores observaram moscas sinantrópicas voando em todos os quartos selecionados da enfermaria pediátrica e também na UTI neonatal.

Em bactérias Gram negativas, o fator mais importante de resistência aos β -lactâmicos, que estão entre os principais antimicrobianos utilizados na prática clínica, que podemos observar é a produção de enzimas β -lactamases (Ambler 1980). Essas enzimas podem ter seus genes com localização cromossomal ou plasmidial. As enzimas codificadas por genes cromossomais são encontradas em menor número, e algumas espécies as produzem tanto de maneira constitutiva quanto de modo induzível (Pfaller & Segreti 2006). Em contrapartida, mais de 150 enzimas são mediadas por plasmídeos. O aumento da frequência de isolamento de amostras produtoras de ESBL levou ao elevado uso dos carbapenemas como alternativa para tratamento, o que gerou o aparecimento de bactérias resistentes a essas drogas, tendo o mecanismo enzimático como principal determinante de resistência. Dentre as carbapenemases mais comuns no Brasil na atualidade temos: KPC, IMP, VIM, NDM, GES, SPM e OXA. Estas carbapenemases têm sido descritas associadas a elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons (Pereira et al. 2013, Carvalho Assef et al. 2014, Chagas et al. 2014, Pilloneto et al. 2014).

A presença de bactérias resistentes dos gêneros *Klebsiella* e *Pseudomonas*, patógenos hospitalares de importância, em dípteros muscoides coletados a partir de lixo proveniente de matadouros, restaurantes e descarte doméstico já foi relatada (Ahmed et al. 2013). Resistência a macrolídeos, tetraciclina, quinolonas, aminoglicosídeos e β -lactâmicos foi detectada em microrganismos pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Escherichia* e *Aeromonas* isolados a partir de califorídeos, muscídeos e sarcófagídeos nos arredores do aeroporto internacional Chengdu Shuangliu, na China (Liu et al, 2013) sendo algumas delas carreadoras do gene *bla*_{TEM}. Este

foi o mesmo estudo que nos incentivou a elevar a concentração de nosso antibiótico.

Rahuma et al. (2005), ao compararem moscas de ambiente hospitalar com outras de ambiente urbano e matadouros na cidade de Misurata, Líbia, perceberam a presença de bactérias multirresistentes em moscas oriundas todos os ambientes, apesar de as moscas encontradas no ambiente hospitalar carregarem mais bactérias resistentes do que as de outras áreas. Pela alta mobilidade apresentada por moscas é possível teorizar sua participação na transmissão de bactérias multirresistentes do hospital para o ambiente e vice-versa.

Outros estudos avaliaram e verificaram que bactérias como *E. coli* e *E. faecalis* podem proliferar no trato digestório de moscas domésticas e são transmitidas durante a alimentação dos insetos (Kobayashi et al. 1999; Doud e Zurek 2012). Petridis et al. (2006) observaram a transferência de genes de resistência ao cloranfenicol entre cepas de *E. coli* no trato digestório de mosca doméstica, uma hora após alimentação. Estudo semelhante realizado por Fukuda et al. (2016) detectou a transferência de genes de resistência a cefalosporinas. Esses resultados são importantes para a saúde pública, pois demonstram a capacidade de bactérias compartilharem genes de resistência no sistema digestório de insetos.

Embora tenhamos encontrado bactérias com fenótipo resistente ou intermediário a um, dois, três ou aos quatro antimicrobianos testados nenhuma delas apresentou, por PCR, algum dos genes de resistência pesquisado. Mas esse fato não diminui a importância deste estudo, pois entre os microrganismos isolados durante este trabalho encontramos patógenos frequentes em IRAS (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*), infecções urinárias (*Proteus*), intoxicações alimentares e diarreias (grupo *B. cereus* e *E. coli*), além de patógenos oportunistas ou raramente isolados em casos clínicos (*Myroides*, *Micrococcus*, *Lactococcus* e *Microbacterium*).

Na tabela 1 podemos observar como os microrganismos isolados neste estudo estão amplamente distribuídos pelos mais variados ambientes, como solo, água, animais, esgoto, alimentos ou compondo a nossa microbiota. Vale ressaltar que quase todos estes microrganismos isolados pertencem à classe de risco 2, logo representam um risco moderado individualmente e limitado no âmbito da comunidade. Mas, apesar do risco moderado, estes microrganismos podem causar infecções graves em pacientes imunocomprometidos, que podem levá-los a óbito.

Deve-se lembrar ainda que o ambiente pode conter reservatórios de genes e protogenes que possivelmente podem conferir resistência. Estes reservatórios são chamados de resistomas. Os genes e protogenes ali contidos, em condições ambientais normais, não conferem resistência. Mas caso haja pressão seletiva de antimicrobianos, podem haver mutações nestes genes, favorecendo a sua expressão e atividade. Estes genes de resistência podem ser constituintes de bactérias produtoras de antimicrobianos, visto que as mesmas poderiam se auto-destruir devido à produção de antimicrobianos (Walsh & Duffy, 2013; Perry et al. 2014). E como se não bastasse a presença destes genes naturalmente no ambiente, os hospitais também funcionam como disseminadores de bactérias multi-resistentes através de seu esgoto (Hocquet et al. 2016).

A ausência dos genes de resistência pesquisados em nossos isolados pode ser atribuída a diversos fatores. Estes microrganismos podem possuir genes que codificam para bombas de efluxo, alteração do sítio de ação do antimicrobiano ou para alterações da expressão das porinas presentes em sua membrana, o que afeta diretamente a permeabilidade do antimicrobiano. Uma outra hipótese é que, devido às pressões existentes dentro da mosca, como os seus mecanismos de resposta imunológica, estes microrganismos podem ter perdido os plasmídeos que continham estes genes, ou então simplesmente pode ter ocorrido uma transferência para outras bactérias presentes na microbiota da mosca. E como temos o conhecimento de que a grande maioria

dos microrganismos ainda não são cultiváveis, as possíveis bactérias que receberam estes genes não puderam ser isoladas.

Embora não tenhamos encontrado nenhum gene de resistência pesquisado nas amostras isoladas a partir de dípteros muscoides, a relevância deste estudo se deve à evidenciação da presença de potenciais patógenos nestes insetos que estão adaptados aos mais diversos ambientes, o que os torna capazes de disseminar estes microrganismos nos mais diferentes ambientes. A complementação do entendimento da epidemiologia bacteriana contribui com os estudos de impacto e planejamento das ações ambientais, que dão subsídios às políticas públicas de controle de insetos destinadas à melhoria da qualidade do ambiente e vida da população.

7 CONCLUSÕES

- Os dípteros “acaliptrados” foram os mais numerosos nas coletas, porém a espécie melhor distribuída nos variados locais de coleta foi *C. megacephala*.
- O crescimento em meio adicionado de cefalosporina na concentração 1mg/mL é eficiente no isolamento seletivo de bactérias resistentes a cefalosporinas e/ou carbapenemas provenientes de amostras ambientais.
- Dípteros da espécie *C. megacephala* e da família Sarcophagidae podem estar atuando na disseminação de patógenos hospitalares no Rio de Janeiro.
- Bactérias pertencentes ao grupo *B. cereus* contendo genes que codificam para enterotoxinas podem ser encontradas na natureza sendo transportadas por dípteros muscoides.
- Bactérias do complexo *P. fluorescens* com genótipos semelhantes podem estar sendo disseminadas pelo Rio de Janeiro por dípteros muscoides.

- Devido a ausência de genes que codificam para β -lactamases, devem ser pesquisados genes que codifiquem para outros mecanismos de resistência aos antimicrobianos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Research*. 2005; 33(Web Server issue): W728-W733. doi:10.1093/nar/gki415.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Estafilococos, estreptococos, enterococos e outros cocos Gram-positivos in *Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica*. 2004.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. β -lactâmicos. 2007a. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/lactamicos.htm. Data do acesso: 26 de julho de 2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Carbapenemas. 2007b. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/carbapenens.htm. Data do acesso: 26 de julho de 2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Macrolídeos. 2007c. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/macrolideos.htm. Data do acesso: 27 de julho de 2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Sulfonamidas. 2007d. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/sulfonamidas.htm. Data do acesso: 27 de julho de 2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gram-negativos não-fermentadores. 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo3/introducao.htm. Data do acesso: 09 de agosto de 2016.

Ahmed A S, Ahmed KM, Salih SS. Isolation and identification of bacterial isolates from House flies in Sulayamaniya City. Eng & Tech Journal 2013; 31 (1): 24-33.

Alaburda J, Ruvieri V, Shundo L, Almeida AP, Tiglea P, Sabino M. Sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência com derivação pré-coluna e detecção por fluorescência. Pesqui Agropecu Bras. 2007; 42(11): 1587-1592.

Ali NA, Hussain AS. Detection of Enterotoxin (*hblA*, *hblC* and *hblD*) Genes of *Bacillus cereus* Isolates from Different Food Samples Using Traditional and Molecular Methods. Iraqi Journal of Biotechnology. 2015; 14(2): 8-20.

Amábile-Cuevas CF. Antibiotic resistance: from Darwin to Lederberg to Keynes. Microb Drug Resist. 2012; 19(2):73-87.

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Biological Sciences 1980; 289:321-331.

Araujo ES, Santos AM, Areias REBM, Souza SR, Fernandes MS. Uso de RAPD para análise de diversidade genética em arroz. Agronomia. 2003; 37(1): 33-37.

Araujo BF, Ferreira ML, Campos PA, Royer S, Batistão DWF, Dantas RCC et al. Clinical and Molecular Epidemiology of Multidrug Resistant *P. aeruginosa*

Carrying *aac(6)-Ib-cr*, *qnrS1* and *bla_{SPM}* Genes in Brazil. 2016. PLoS ONE 11(5): e0155914. doi:10.1371/journal.pone.0155914

Bar-Yoseph H, Hussein K, Braun E, Paul M. Natural history and decolonization strategies for ESBL/carbapenem-resistant Enterobacteriaceae carriage: systematic review and meta-analysis. 2016 Jun 17. J Antimicrob Chemother. pii: dkw221. [Epub ahead of print]

Barreiro C, Albano H, Silva J, Teixeira P. Role of flies as vectors of foodborne pathogens in rural areas. 2013. ISRN Microbiol. doi: 10.1155/2013/718780. eCollection 2013.

Barros EM, Ceotto H, Bastos MCF, dos Santos KRN, Giambiagi-de Marval M. *Staphylococcus haemolyticus* as an Important Hospital Pathogen and Carrier of Methicillin Resistance Genes. Journal of Clinical Microbiology. 2012; 50(1):166-168.

Barros RM, Mello-Patiu CA, Pujol-Luz JR. Sarcophagidae (Insecta, Diptera) associados à decomposição de carcaças de *Sus scrofa* Linnaeus (Suidae) em área de Cerrado do Distrito Federal, Brasil. Rev Bras entomol. 2008; 52(4): 606-609.

Binneck E, Nedel JL, Dellagostin OA . Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil?. Rev Bras Sementes. 2002; 24(1):183-196.

Blaak H, Hamidjaja RA, van Hoek AH, de Heer L, de Roda Husman AM, Schets FM. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms. 2014. Appl Environ Microbiol. 80(1):239-46.

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. J Infect Dev Ctries. 2010; 4(4):194-201.

Bueno VFF. Ribotipagem e virulência de *Listeria monocytogenes* de origens alimentar e humana. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária, 2007.

Burghartz M, Bunk B, Spröer C, Voget S, Daniel R, Overmann J, Jahn M. Complete Genome Sequence of the Urethral Catheter Isolate *Myroides* sp. Genome Announc. 2015; 3(2).

Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(3):969-76.

Butler JF, Garcia-Maruniak A, Meek F, Maruniak JE. Wild florida house flies (*Musca domestica*) as carriers of pathogenic bacteria. Florida Entomologist. 2010; 93(2):218-223.

Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. DNA markers: protocols, applications and overviews. New York, NY: J. Wiley and Sons. p.151-171, 1997.

Cantón R, Canut A, Morosini MI, Oliver A. Breakpoints for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Is the problem solved? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014; 32(4):33-40.

Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods. 2005; 63(3): 219-28.

Carvalho CJB, Mello-Patiu CA. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. Rev Bras Entomol. 2008; 52(3): 390-406.

Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TP, Timm LN et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68(12):2956-7.

Carvalho-Assef APD, Pereira PS, Albano RM et al. 2014. First Report of NDM-1-Producing *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 58:2475-2476.

Centers for Disease Control and Prevention. *E. coli (Escherichia coli)*. 2015. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>. Data de acesso: 25 de julho de 2016.

Centers for Disease Control and Prevention. Group A Streptococcal (GAS) disease. 2016a. Disponível em: <http://www.cdc.gov/groupastrep/about/index.html>. Data de acesso: 26 de julho de 2016.

Centers for Disease Control and Prevention. Group B Streptococcal (GAS) Infection. 2016b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/groupbstrep/about/index.html>. Data de acesso: 26 de julho de 2016.

Centers for Disease Control and Prevention, Pulsed-field gel Electrophoresis, 2016c. Disponível em: <http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>. Data do acesso: 15 de agosto de 2016.

Chagas TP, Carvalho KR, Santos ICO et al. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diag Microbiol and Infec Dis*. 2014; 79: 468-472.

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. 2014; 31(2):336-46.

Chen X, Li Q, Li G. et al. *Microbacterium gilvum* sp. nov., isolated from civet faeces. Antonie van Leeuwenhoek. 2016; 109: 1177.

Chial H. DNA fingerprinting using amplified fragment length polymorphisms (AFLP): No genome sequence required. Nature Education. 2008; 1(1):176

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2014. 10th Ed. M02-A10 v. 29. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

Coimbra DG, Almeida AG, Jùnior JB, da Silva LA, Pimentel BJ, Gitai DL et al. Wound infection by multiresistant *Staphylococcus sciuri* identified by molecular methods. New Microbiol. 2011; 34(4):425-7.

Couri MS, Carvalho CJB. Catálogo das espécies de Fanniidae do estado do Rio de Janeiro (Brasil). Biota Neotrop. 2005a; 5(2): 223-231.

Couri MS, Carvalho CJB. Diptera muscidae do estado do Rio de Janeiro (Brasil). Biota Neotrop. 2005b; 5(2):205-222.

Çıkman A, Parlak M, Bayram Y, Güdücüoğlu H, Berktaş M. Antibiotics resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from various clinical specimens. Afri Health Sci. 2016; 16(1): 149-152.

Dahms C, Hübner N-O, Wilke F, Kramer A. Mini-review: Epidemiology and zoonotic potential of multiresistant bacteria and *Clostridium difficile* in livestock and food. GMS Hyg Infect Control. 2014; 9(3): Doc21. doi:10.3205/dgkh000241.

Dakić I, Morrison D, Vuković D, et al. Isolation and Molecular Characterization of *Staphylococcus sciuri* in the Hospital Environment. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(6):2782-2785.

Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(3):490-5.

Dear JP. A revision of the new World Chrysomyini (Diptera: Calliphoridae). *Rev Bras Zoo*. 1985; 3(3):106-169.

Dharne MS, Gupta AK, Rangrez AY, Ghate HV, Patole MS, Shouche YS. Antibacterial activities of multi drug resistant *Myroides odoratimimus* bacteria isolated from adult flesh flies (Diptera: sarcophagidae) are independent of metallo beta-lactamase gene. *Braz J Microbiol*. 2008; 39(2):397-404.

Dordet-Frisoni E, Dorchies G, Araujo C, Talon R, Leroy S. Genomic Diversity in *Staphylococcus xylosus*. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73(22): 7199-7209.

Dortet L, Legrand P, Soussy C-J, Cattoir V. Bacterial Identification, Clinical Significance, and Antimicrobial Susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, Two Frequently Misidentified Opportunistic Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44(12):4471-4478.

Doud CW, Zurek L. *Enterococcus faecalis* OG1RF:pMV158 survives and proliferates in the house fly digestive tract. *J Med Entomol*. 2012;49(1):150-5.

Endo S, Sasano M, Yano H, Inomata S, Ishibashi N, Aoyagi T et al. IMP-1-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter ursingii* from Japan. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(10):2533-4.

Feizabaldi MM, Farahani AS, Rahmati M, Asadi S. Phenotypic characterization and plasmid analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains from Iranian patients. R Ci méd biol. 2008; 7(3):273-279.

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. 2016; 71(1):71-5.

Fernandes JM, Sousa VR, Couri MS. Diversidade de famílias de dípteros acaliptratos no Horto Botânico, Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro, Brasil. II Simpósio de Pesquisa em Mata Atlântica. 2012; 45-46.

Fiol FS, Avallone AM. Uso de cloranfenicol na gestação. Revista Eletrônica de Farmácia. 2005; 2(1):31-37.

Fu H, Hu X, Li C et al. Design, synthesis and biological evaluation of monobactams as antibacterial agents against gram-negative bacteria. Eur J Med Chem. 2016; 110:151-163.

Fukuda A, Usui M, Okubo T, Tamura Y. Horizontal Transfer of Plasmid-Mediated Cephalosporin Resistance Genes in the Intestine of Houseflies (*Musca domestica*). Microb Drug Resist. 2016, 22(4): 336-341.

Garcia AAF, Benchimol LL, Barbosa AMM, Geraldi IO, Souza Jr. CL, Souza AP. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. Genet Mol Biol. 2004; 27(4): 579-588.

Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. Curr Issues Mol Biol. 2014; 17:11-22.

Goyal G, Nuessly GS, Seal DR, Steck GJ, Capinera JL, Meagher RL. Examination of the pest status of corn-infesting Ulidiidae (Diptera). *Environ Entomol.* 2012; 41(5):1131-8.

Graczyk TK, Knight R, Gilman RH, Cranfield MR. The role of non-biting flies in the epidemiology of human infectious diseases. *Microbes Infect.* 2001; 3:231-235.

Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. . Antimicrobianos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím Nova*, 2010; 33(3):667-679.

Gupta AK, Nayduch D, Verma P, Shah B, Ghate HV, Patole MS et al. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.). *FEMS Microbiol Ecol.* 2012; 79(3):581-93.

Gupta AK, Rastogi G, Nayduch D, Sawant SS, Bhonde RR, Shouche YS. Molecular phylogenetic profiling of gut-associated bacteria in larvae and adults of flesh flies. *Med Vet Entomol.* 2014; 28(4):345-54.

Guzman-Prieto AM, van Schaik W, Rogers MRC, Coque TM, Baquero F, Corander J, Willems RJL. Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones? *Front Microbiol.* 2016; 7:788.

Hemmatinezhad B, Ommi D, Hafshejani TT, Khamesipour F. Molecular detection and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from houseflies (*Musca domestica*) in Iran. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2015; 21:18.

Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc.* 2007; 2(3):677-84.

Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35(3):305.

Hocquet D, Muller A, Bertrand X. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *J Hosp Infect*. 2016; 93(4):395-402.

Hörner R, Liscano MGH, Maraschin MM, Salla A, Meneghetti B, Dal Forno NLF et al. Susceptibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. *J Bras Patol Med Lab*. 2005; 41(6): 391-395.

Huwaitat R, McCloskey AP, Gilmore BF, Lavery G. Potential strategies for the eradication of multi-drug resistant Gram-negative bacterial infections. *Future Microbiol*. 2016; 10.2217/fmb-2016-0035.

Jácome PRLA, Alves LR, Jácome-Júnior AT et al. Detection of *bla*_{SPM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. *J Med Microbiol*. 2016; 65: 658-665.

Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(9):2761-2764.

Jeßberger N, Krey VM, Rademacher C, Böhm ME, Mohr AK, Ehling-Schulz M et al. From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Front Microbiol*. 2015; 6:560.

Jones RN. Resistance patterns among nosocomial pathogens. *Chest*. 2001;119 (2 Suppl):397S-404S.

Kappel HB, Oliveira AG, Silva PR, Pelli A. Non-biting flying insects as carriers of pathogenic bacteria in a Brazilian hospital. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013; 46(2):234-236.

Karaaslan A, Soysal A, Sarmış A, Kadayifci EK, Cerit K, Atıcı S et al. *Lactococcus lactis* catheter-related bloodstream infection in an infant: case report. *Jpn J Infect Dis*. 2014. [Epub ahead of print]

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*. 1999; 61(4):625-9.

Kwil I, Kaźmierczak D, Różalski A. Swarming growth and resistance of *Proteus penneri* and *Proteus vulgaris* strains to normal human serum. *Adv Clin Exp Med*. 2013;.22(2):165-75.

Labarca JA, Salles MJC, Seas C & Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol*. 2016; 42(2):276-92.

Laffineur K, Avesani V, Cornu G et al. Bacteremia Due to a Novel *Microbacterium* Species in a Patient with Leukemia and Description of *Microbacterium paraoxydans* sp. nov. *Journal Clin Microbiol*. 2003; 41(5):2242-2246.

Lanini S, D'Arezzo S, Puro V, Martini L, Imperi F et al. Molecular Epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* Hospital Outbreak Driven by a

Contaminated Disinfectant-Soap Dispenser. PLoS ONE. 2011; 6(2): e17064. doi:10.1371/journal.pone.0017064.

Lázaro NS, Tibana A, Reis EMF, Rodrigues DP, Quintaes BR, Hofer E. Padrão de sensibilidade aos antimicrobianos e perfil plasmidial em *Salmonella* Muenster isolados de suínos e de outros ambientes de abatedouros. Pesq Vet Bras. 2004; 24(2):65-70.

Lindsay SW, Lindsay TC, Duprez J, Hall MJ, Kwambana BA, Jawara M et al. *Chrysomya putoria*, a putative vector of diarrheal diseases. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(11):e1895.

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. 2013; 44(6):988-96.

Macieira DB, Menezes RCAA, Damico CB, Almosny NRP, Messick JB. Uso da técnica de Southern Blot/Hibridização associada à reação em cadeia da polimerase para aumentar a sensibilidade no diagnóstico das infecções por hemoplasmas em gatos domésticos: Use of Southern Blot/Hybridization technique associated to polymerase chain reaction to improve the sensitivity in the diagnosis of hemoplasma infections in domestic cats. Rev Bras Parasitol Vet. 2009; 18(Suppl1):1-6.

Magalhães VD, Ferreira JC, Barelli C, Darini ALC. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia - uma revisão técnica. Rev Inst Adolfo Lutz. 2005; 64(2):155-161.

Martins AF, Barth AL. *Acinetobacter* multirresistente – um desafio para a saúde pública. Sci Med. 2013; 23(1):56-62.

Mello RP. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. Entomologia Veterinária. 2003; 10(2): 255-68.

Mendes CAC, Burdmann EA. Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. Rev Assoc Med Bras. 2009; 55(6): 752-759.

Menegucci TC, Albiero J, Migliorini LB et al. Strategies for the treatment of polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. Int J Antimicrob Agents. 2016; 47(5):380-5.

Miltiados G, Elisaf M. Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature. Journal of Medical Case Reports. 2011; 5: 251.

Montezzi LF, Campana EH, Corrêa LL, Justo LH, Paschoal RP, da Silva IL et al. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. Int J Antimicrob Agents. 2015; 45(2):174-7.

Muñoz D J, Rodríguez R. Agentes Bacterianos y Parasitarios en Adultos de la Mosca Común *Musca domestica* Recolectadas en el Peñón, Estado Sucre, Venezuela. Revista Científica. 2015; 25:159-166.

Mukamolova GV, Turapov OA, Kazarian K, Telkov M, Kaprelyants AS, Kell DB et al. The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. Molecular Microbiol. 2002; 46:611–621.

National Center for Biotechnology Information. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>. Data do acesso: 15 de agosto de 2016.

Nazni WA, Seleena B, Lee HL, Jeffery J, T Rogayah TA, Sofian MA. Bacteria fauna from the house fly, *Musca domestica* (L.). Trop Biomed. 2005; 22(2):225-31.

Nogueira JMR, Miguel LFS. Bacteriologia in Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de Saúde. 2010. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Oliveira JFP, Cipullo JP, Burdmann EA. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. Braz J Cardiovasc Surg. 2006; 21(4): 444-452.

Oliveira MS, Mello RP, Queiroz MMC. Morfologia e duração dos ínstares larvais de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em laboratório. Rev Bras entomol. 2007; 51(2): 239-245.

Oliveira VC, de Mello RP, d'Almeida JM. Dípteros muscóides como vetores mecânicos de ovos de helmintos em jardim zoológico, Brasil. Rev Saúde Pública. 2002; 36(5):614-20.

Pasternak J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. Einstein (São Paulo). 2012; 10(1):118-119.

Pereira PS, Seki LM, Araujo CFM, et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). J Antimicrob Chemother. 2013; 68:312-316.

Pereira PS, Borghi MA, Albano RM, Lopes JCO, Silveira MC, Marques EA et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. Microb Drug Resistance. 2015; 21(2): 234-236.

Pereira-Maia EC, Silva PP, Almeida WB, Santos HF, Marcial BL, Ruggiero R et al. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. *Quím Nova*. 2010; 33(3):700-706.

Perry JA, Westmam EL, Wright GD. The antibiotic resistome: what's new? *Current Opinion in Microbiol*. 2014; 21:45–50

Petridis M, Bagdasarian M, Waldor MK, Walker E. Horizontal transfer of Shiga toxin and antibiotic resistance genes among *Escherichia coli* strains in house fly (Diptera: Muscidae) gut. *J Med Entomol*. 2006; 43(2):288-95.

Pfaller MA, Segreti J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis*. 2006; 45:153-163.

Pigrau C, Almirante B. Oxazolidinonas, glucopéptidos y lipopéptidos cíclicos. *Enferm Infecc MicrobiolClin*. 2009; 27(4):236–246.

Pilloneto M, Arend L, Vespero et al. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58:7592-7594.

Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 70(1):119-23.

Poirel L, Barbosa-Vasconcelos A, Simões RR, Da Costa PM, Liu W, Nordmann P. Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(3):1662-3.

Prado MA, Pimenta FC, Hayashid M, Souza PR, Pereira MS, Gir E. Enterobactérias isoladas de baratas (*Periplaneta americana*) capturadas em

um hospital brasileiro. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 11(2), 2002

Praxedes CIS, Bastos PAMB, Zúniga NOC, Franco RM, Mano SB. Sensibilidade de Enterobacteriaceae da microbiota intestinal de frangos de corte submetidos à dieta com nitrofuranos. Revista de Ciências Agrárias. 2013; 36(1):41-47.

Public Health Agency of Canada. *Bacillus anthracis*. 2001. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/msds12e-eng.php>. Data de acesso: 07 de agosto de 2016.

Public Health Agency of Canada. *Enterobacter* spp. 2010a. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/enterobacter-eng.php>. Data de acesso: 07 de agosto de 2016.

Public Health Agency of Canada. *Enterococcus faecalis*. 2010b. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/enterococcus-eng.php>. Data de acesso: 25 de julho de 2016.

Public Health Agency of Canada. *Micrococcus*. 2010c. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/micrococcus-eng.php>. Data de acesso: 07 de agosto de 2016.

Public Health Agency of Canada. *Bacillus cereus*. 2011a. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/bacillus-cereus-eng.php>. Data de acesso: 07 de agosto de 2016.

Public Health Agency of Canada. *Citrobacter* spp. 2011b. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/citrobacter-eng.php>. Data de acesso: 07 de agosto de 2016.

Public Health Agency of Canada. *Escherchia coli*. 2011c. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/escherichia-coli-pa-eng.php>.

Data de acesso: 07 de agosto de 2016.

Public Health Agency of Canada. *Klebsiella* spp. 2011d. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/klebsiella-eng.php>. Data de

acesso: 25 de julho de 2016.

Public Health Agency of Canada. *Streptococcus pneumoniae*. 2011e. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/streptococcus-pneumoniae-eng.php>. Data de acesso: 26 de julho de 2016

Data de acesso: 26 de julho de 2016

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007; 20(3):440-58.

Rabinovitch L, Oliveira EJ. Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos. 2015; Montenegro Comunicação, Rio de Janeiro, Brasil.

Radice M, Marín M, Giovanakis M, Vay C, Almuzara M, Limansky A et al. Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clínica: recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología. Rev argent microbiol. 2011; 43(2):136-153.

Rahuma N, Ghenghesh KS, Ben Aissa R, 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. Ann Trop Med Parasitol. 2005; 99(8):795-802.

Relman DA. Universal bacterial 16S rDNA amplification and sequencing *in* Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Washington: American Society for Microbiology; 1993.

Rosário NA, Grumach AS. Alergia a beta-lactâmicos na clínica pediátrica: uma abordagem prática. J Pediatr. 2006; 82(5Suppl): S181-S188.

Rothstein DM. Rifamycins, Alone and in Combination. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016; 6(7). pii: a027011. doi:10.1101/cshperspect.a027011.

Sánchez-Saldaña L, Sáenz-Anduaga E, Pancorbo-Mendoza J, Lanchipa-Yokota P, Zegarra-Del-Carpio R. Antimicrobianos sistémicos en dermatología. Segunda parte: Tetraciclinas, lincosaminas, fluoroquinolonas, sulfonamidas, rifamicinas, cloranfenicoles, ácido fusídico, metronidazol y nuevos antimicrobianos. Dermatol peru. 2004; 14(3).

Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. J Bras Patol Med Lab. 2007; 43(6):413-423.

Santos IC, Hildenbrand ZL, Schug KA. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. Analyst. 2016; 141(10):2827-37.

Scales BS, Dickson RP, LiPuma JJ, Huffnagle GB. Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. Clin Microbiol Reviews. 2014; 27(4):927-948.

Schröttner P, Gunzer F, Schüppel J, Rudolph WW. Identification of Rare Bacterial Pathogens by 16S rRNA Gene Sequencing and MALDI-TOF MS. J Vis Exp. 2016; 113:e53176, doi:10.3791/53176.

Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*. 2009; 49(4):543-51.

Shinohara NKS, Barros VB, Jimenez SMC, Machado ECL, Dutra RAF, Lima Filho JL. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciênc saúde coletiva*. 2008; 13(5):1675-1683.

Singh B, Crippen TL, Zheng L, Fields AT, Yu Z, Ma Q et al. A metagenomic assessment of the bacteria associated with *Lucilia sericata* and *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99(2):869-83.

Sousa JRP, Esposito MC, Carvalho Filho FS. Composição, abundância e riqueza de Calliphoridae (Diptera) das matas e clareiras com diferentes coberturas vegetais da Base de Extração Petrolífera, bacia do Rio Urucu, Coari, Amazonas. *Rev Bras entomol*. 2010; 54(2):270-276.

Souza RB, Magnani M, Oliveira TCRM. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. *Semina: Ciências Agrárias*. 2010; 31(2):413-428.

Sukontason KL, Bunchoo M, Khantawa B, Piangjai S, Rongsriyam Y, Sukontason K. Comparison between *Musca domestic* and *Chrysomya megacephala* as carriers of bacteria in Northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2007; 38(1):38-44.

Teixeira CF. Estafilococos coagulase-negativa – um risco real para a saúde pública. 2009. Tese de doutorado do Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS, Fiocruz.

Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med.* 2006;119:S3-S10.

Tibra NK, Jalali S, Reddy AK, Narayanan R, Agarwal R. Traumatic endophthalmitis caused by *Staphylococcus gallinarum*. *J Med Microbiol.* 2010; 59(3):365-6.

Usui M, Iwasa T, Fukuda A, Sato T, Okubo T, Tamura Y. The role of flies in spreading the extended-spectrum β -lactamase gene from cattle. *Microb Drug Resist.* 2013; 19(5):415-20.

Vasconcelos SD, Cruz TM, Salgado RL, Thyssen PJ. Dipterans associated with a decomposing animal carcass in a rainforest fragment in Brazil: notes on the early arrival and colonization by necrophagous species. *J Insect Sci.* 2013; 13:145.

Walsh F, Duffy B. The Culturable Soil Antibiotic Resistome: A Community of Multi-Drug Resistant Bacteria. *PLoS ONE* 2013; 8(6):e65567.

Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11(5):355-62.

Wei T, Miyanaga K, Tanji Y. Persistence of antibiotic-resistant and -sensitive *Proteus mirabilis* strains in the digestive tract of the housefly (*Musca domestica*) and green bottle flies (Calliphoridae). *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014; 98(19):8357-66.

Woo PCY, Lau SJP, Teng JLL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel

bacteria in clinical microbiology laboratories. Clin Microbiol Infect. 2008; 14(10):908-34.

Woodford N, Wareham DW, Guerra B, Teale C. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? J Antimicrob Chemother. 2014; 69(2):287-91.

Yepes-Gaurisas D, Sánchez-Rodríguez JD, de Mello-Patiu CA, Wolff Echeverri M. Synanthropy of sarcophagidae (Diptera) in La Pintada, Antioquia-Colombia. Rev Biol Trop. 2013; 61(3):1275-87.

Zahner V, Cabral DA, Régua-Mangia AH et al. Distribution of Genes Encoding Putative Virulence Factors and Fragment Length Polymorphisms in the *vrrA* Gene among Brazilian Isolates of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(12):8107-8114.

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. Journal of Chemotherapy. 2016. DOI: 10.1080/1120009X.2016.1157946.

Zurek L, Schal C, Watson DW. Diversity and contribution of the intestinal bacterial community to the development of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae. J Med Entomol. 2000; 37(6):924-8.

Zurek L, Ghosh A. Insects represent a link between food animal farms and the urban environment for antibiotic resistance traits. Appl Environ Microbiol. 2014; 80(12):3562-7.