

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**Análise da Microbiota Cultivável de uma Colônia de Pulgas**  
***Ctenocephalides felis* (Siphonaptera, Pulicidae)**

**Tatiana Werneck Franco**

**2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Análise da microbiota cultivável de uma colônia de pulgas**  
***Ctenocephalides felis* (Siphonaptera, Pulicidae)**

**TATIANA WERNECK FRANCO**

*Sob a orientação do Professor*

**Douglas McIntosh**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F825a Franco, Tatiana Werneck , 1992-  
Análise da Microbiota Cultivável de uma Colônia de  
Pulgas Ctenocephalides felis (Siphonaptera,  
Pulicidae) / Tatiana Werneck Franco. - Rio de  
Janeiro, 2020.  
83 f.

Orientador: Douglas McIntosh.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias, 2020.

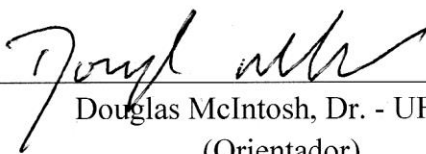
1. Ectoparasitas . 2. Comunidades microbianas. 3.  
PCR. 4. Resistência a antibióticos. I. McIntosh,  
Douglas , 1964-, orient. II Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**TATIANA WERNECK FRANCO**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra em Ciências**,  
ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM : 19/02/2020



---

Douglas McIntosh, Dr. - UFRRJ  
(Orientador)

---

Irene da Silva Coelho, Dra. - UFRRJ

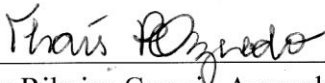


---

Maria Halina Ogrzewalska, Dra. - FIOCRUZ

---

Stefan Schwab, Dr. - EMBRAPA



---

Thais Ribeiro Correia Azevedo, Dra. - UFRRJ

*“E se o mundo não corresponde em todos os aspectos a nossos desejos, é culpa da ciência ou dos que querem impor seus desejos ao mundo?”*

*-Carl Sagan*

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, que sempre me incentivou e me deu liberdade para buscar o meu caminho. Fonte da minha inspiração de luta, garra, determinação e amor. Com quem eu mais aprendi na vida, seja através de seus erros ou acertos.

Eu me orgulho de ter uma mãe como você. Obrigada por estar sempre comigo me apoiando e se orgulhando das minhas escolhas.

Aos meus irmãos, Rodrigo, Beatriz e Bárbara, que são pessoas incrivelmente especiais, em que eu aprendo todos os dias a compartilhar, escutar, compreender e aceitar o próximo, assim como a mim mesma.

Eu tenho muita sorte em poder compartilhar a vida com vocês!

À minha família (tias, tios, primos e avó), por sempre terem me apoiado e torcendo pelas minhas conquistas.

Aos meus amigos que fiz durante toda a minha caminhada até aqui, principalmente aqueles em que me deram tanto apoio para chegar ao término da dissertação. Em especial eu gostaria de agradecer a Rafaela França pelos conselhos sobre a dissertação, principalmente no início do mestrado e a Bruna Franzan, que sempre me deu apoio sobre minhas dúvidas quanto à como escrever uma dissertação, assim como, sobre reflexões da vida e a Hellen Barbosa, que é como uma irmã para mim que sempre acompanhou a minha trajetória.

A todos os amigos que conheci do laboratório multiusuário de Biologia Molecular (BIOMOL), Departamento de Parasitologia Animal (DPA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), a ajuda deles foi essencial para que eu pudesse concluir o mestrado. Nossas conversas entre os intervalos com café e Filosofia sempre me ajudaram muito a manter a sanidade e tranquilidade para seguir com os desafios que apareceram ao longo desse tempo. Não poderia deixar de agradecer a todos os funcionários desta Instituição que são fundamentais na construção e desenvolvimento da nossa Universidade.

A todos os meus professores, que foram tão importantes no meu desenvolvimento, principalmente ao meu orientador Douglas McIntosh, do qual foi essencial para despertar ainda mais a minha curiosidade pelo saber, conhecimento e a pesquisa.

Obrigada por ter me ensinado e proporcionado tantas coisas e oportunidades de expandir meus conhecimentos não só acadêmicos, como também pessoais; concedendo-me confiança para apresentar trabalhos em congressos, principalmente fora do país e pelo incentivo de abrir o projeto de extensão. Não há muitos professores hoje em dia que nos fazem realmente aprender a pensar, refletir, e nos questionar sobre o porquê, para quê, como e para quem, estamos produzindo ciência. Sem dúvidas foi um grande aprendizado e inspiração poder ter sido sua orientanda.

Por fim, finalizo meus agradecimentos com o maior aprendizado que tive durante esses dois anos de mestrado:

*“Conhece-te a ti mesmo, torna-te consciente de tua ignorância e serás sábio.”*

*Sócrates*

Porque no fim das contas, não sabemos de nada e eu acredito que estamos aqui por essa incrível busca de sempre sermos aprendizes.

Esta laboração científica foi realizada com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Obrigada à CAPES e à UFRRJ por tudo, trabalhei ao máximo para honrar a pesquisa brasileira através deste ensaio.

*“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”*

*Marie Curie*

## **BIOGRAFIA**

Graduada em Zootecnia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2016, durante a sua graduação foi estagiária de iniciação científica no Laboratório de Bioquímica no Instituto de Zootecnia da UFRRJ, sob a orientação da Prof. Cristiane Martins Cardoso de Salles em 2013.

Foi bolsista de iniciação científica do PIBIC, como estagiária no Laboratório de Avaliação de Desempenho Equino (LADEq) e Laboratório de Pesquisa em Saúde Equina (EQUILAB) na área de Produção de Equinos sob a orientação do prof. dr. Fernando Queiroz de Almeida/UFRRJ. Atuou como estagiária bolsista do Ministério do Esporte (2014-2016).

Durante o seu mestrado em Ciências Veterinárias, iniciado em 2018, apresentou seu trabalho de pesquisa em dois Congressos de Microbiologia, sendo um deles fora do país, no Chile: "Primeiro Congresso ISME América Latina - 11 e 13 de setembro de 2019".

Foi criadora e mentora do projeto de extensão: "A Universidade Rural na Praça de Seropédica", sob a orientação da Prof. Lucia Valadares (DTPE/IE), com a proposta de divulgar as pesquisas científicas realizadas pela UFRRJ à população de Seropédica, com uma linguagem simples e de fácil entendimento ao público, assim como a realização da divulgação dos projetos de extensão que são abertos à comunidade (como aulas de dança, lutas, artes, música, pré-enem etc.), juntamente a uma feira de profissões para divulgação da importância dos cursos que existem dentro da Universidade.



## RESUMO

FRANCO, Tatiana Werneck. **Análise da Microbiota Cultivável Associada com uma colônia laboratorial de *Ctenocephalides felis*. Siphonaptera, Pulicidae**. Seropédica, RJ. 2020. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

A pulga *Ctenocephalides felis* é ectoparasita de cães e gatos em todo o mundo, atuando como vetor de patógenos zoonóticos, incluindo *Rickettsia felis* e *Bartonella* sp. A diversidade de micróbios associados ao hospedeiro e suas interações dentro de seus hospedeiros, incluindo artrópodes, são fundamentais para as funções ecológicas nessas comunidades e podem contribuir para sua evolução. Além disso, as interações simbióticas podem influenciar as transmissões de patógenos zoonóticos, através de efeitos sobre a competência vetorial. O conhecimento da microbiota de vetores tem sido utilizado para desenvolver novas abordagens de controle com base no conceito de manipulação da microbiota. Um componente chave nesta estratégia é a presença de uma microbiota estável/ “core”. O presente estudo caracterizou a estabilidade, durante oito anos, da microbiota cultivável de uma colônia de laboratório de *C. felis*. As bactérias associadas aos diferentes estágios da vida foram isoladas por cultura em placas de ágar nutriente. As bactérias foram identificadas, em nível de gênero ou espécie, por amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de um fragmento de 500 pares de bases (pb) do gene que codifica o RNA ribossômico 16S procariótico, seguido de sequenciamento de nucleotídeos. As culturas foram caracterizadas quanto à suscetibilidade a sete compostos antimicrobianos (ampicilina, cloranfenicol, cloreto de mercúrio, nitrofurantoína, tetraciclina, rifampicina e estreptomicina), utilizando um método de microdiluição. Cada uma das diferentes etapas da vida apresentou uma microbiota única, no entanto, um componente central de todas as amostras era membro do gênero *Staphylococcus*, com alguns demonstrando fenótipos resistentes a múltiplos antimicrobianos. As espécies mais prevalentes foram *S. saprophyticus*, *S. nepalensis*, *S. lentus* e *S. cohnii*, as quais foram relatadas previamente como patógenos oportunistas com potencial zoonótico. A presença constante da mesma espécie de *Staphylococcus*, em múltiplos estágios da vida, sugere que estas bactérias são componentes essenciais da microbiota. Pesquisas futuras examinarão os efeitos da manipulação do microbioma “core” como o primeiro passo no desenvolvimento de novas estratégias para o controle de infestações, como por exemplo realizando a indução de bacteriófagos específicos de bactérias presentes no microbioma.

**Palavras-chave:** Ectoparasitas, Comunidades microbianas, PCR, Resistência a antibióticos.

## ABSTRACT

FRANCO, Tatiana Werneck. **Analysis of the cultivable microbiota associated with a laboratory colony of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera, Pulicidae)**. Seropédica, RJ. 2020. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020

The flea *Ctenocephalides felis* is the principal ectoparasite of dogs and cats worldwide acting as a vector of zoonotic pathogens including *Rickettsia felis* and *Bartonella*. The diversity of host associated microbes and their interactions within their hosts, including arthropods, are fundamental to the ecological functions within those communities and may contribute to host evolution. Moreover, symbiotic interactions may influence the transmissions of zoonotic pathogens, via effects upon vectorial competence. Knowledge of the microbiota of vectors has been used to develop novel approaches for control based on the concept of microbiota manipulation. A key component in this strategy is the presence of a stable/core microbiota. The present study characterized the stability, over seven years, of the cultivable microbiota of a laboratory colony of *C. felis*. Bacteria associated with different life stages were isolated by culture on plates of nutrient agar. Bacteria were identified, to the genus or species level, by polymerase chain reaction (PCR) amplification of a 500 base pair (bp) fragment of the gene encoding prokaryotic 16S ribosomal RNA, followed by nucleotide sequencing. Cultures were characterized for susceptibility to seven antimicrobial compounds (ampicillin, chloramphenicol, mercury chloride, nitrofurantoin, oxytetracycline, rifampicin and streptomycin), using a microdilution method. Each of the different life stages presented a unique microbiota, however a core component of all samples were members of the genus *Staphylococcus*, with some demonstrating multiple-drug resistant phenotypes. The most prevalent species were *S. saprophyticus*, *S. nepalensis*, *S. lentus* and *S. cohnii* all of which have been reported as opportunistic pathogens with zoonotic potential. The constant presence of the same species of *Staphylococcus*, in multiple life stages, suggests they are essential components of the microbiota and by implication of the biology of the fleas. Future research will examine the effects of manipulating the core microbiome as the first step in the development of novel strategies for infestation control.

**Keywords:** Ectoparasites, Microbial communities, PCR, Antibiotic resistance.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Bactérias cultiváveis pertencentes à microbiota das pulgas *Ctenocephalides felis* coletadas em diferentes anos identificadas por sequenciamento do gene 16S rDNA..... 22
- Tabela 2.** Bactérias cultiváveis das pulgas *Ctenocephalides felis* coletadas em diferentes anos (2011-2018) e fases (Ovos, Larvas, Adultos- Machos e Fêmeas, identificadas por sequenciamento do gene 16S rDNA..... 23
- Tabela 3.** Número de bactérias (unidades formadoras de colônias / mL) recuperadas dos diferentes estágios de desenvolvimento das pulgas processadas entre 2011 e 2018.....25
- Tabela 4.** Resistência bacteriana das bactérias cultiváveis pertencentes à microbiota das pulgas *Ctenocephalides felis* em diferentes fases (Ovos, Larvas, Adultos - Machos e Fêmeas) coletadas em 2011..... 26
- Tabela 5.** Resistência bacteriana das bactérias cultiváveis pertencentes à microbiota das pulgas *Ctenocephalides felis* em diferentes fases (Ovos, Larvas, adultos - Machos e Fêmeas) coletadas em 2014..... 29
- Tabela 6.** Resistência bacteriana das bactérias cultiváveis pertencentes à microbiota das pulgas *Ctenocephalides felis* em diferentes fases (Ovos, Larvas, Machos e Fêmeas) coletadas em 2015..... 31
- Tabela 7.** Resistência bacteriana das bactérias cultiváveis pertencentes à microbiota das pulgas *Ctenocephalides felis* em diferentes fases (Ovos, Larvas, Adultos - Machos e Fêmeas) coletadas em 2018..... 34

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Perfis de bandas obtidos pela separação por SDS-PAGE (12,5% de acrilamida) das proteínas celulares totais produzidas a partir de isolados representativos de cocos Gram-positivos recuperados de pulgas..39
- Figura 2.** Perfis de resolução de bandas obtidos usando géis de empilhamento contendo dez em vez de 15 poços.....39

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
2.1 Distribuição Geográfica de <i>Ctenocephalides felis</i> .....	2
2.2 Biologia .....	2
2.3 Importância na Medicina Veterinária e na Saúde Pública.....	3
2.4 Microbioma de Artrópodes.....	4
2.4.1. Simbiontes presentes nas pulgas e suas associações .....	6
2.5 Controle .....	8
2.6 Resistência Antimicrobiana.....	9
2.7 Antibióticos .....	11
2.8 Sistema CRISPR.....	14
2.9 Bacteriófagos .....	15
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1 Local de Estudos e Coletas de Amostras.....	17
3.2. Processamento de Pulgas para Cultura Bacteriana.....	17
3.3. Cultura Bacteriana .....	17
3.4 Análises Moleculares.....	17
3.4.1 Extração de DNA.....	17
3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação das bactérias... 18	
3.4.3 PCR para detecção de sistemas CRISPR-Cas .....	18
3.5 Sequenciamento do DNA .....	19
3.6 Avaliação de Resistência Antimicrobiana.....	19
3.6.1 Preparação de culturas iniciais .....	19
3.6.2 Preparação de soluções estoque de agentes antimicrobianos .....	20
3.6.3 Culturas controladas .....	20
3.6.4 Determinação de perfis de resistência antimicrobiana da bactéria isolada de pulgas.....	20
3.7 Análise Eletroforética em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) de Proteínas Totais .....	21
3.7.1 Preparação do crescimento bacteriano .....	21
3.7.2 Preparação das amostras e eletroforese .....	21
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Identificação dos Isolados Através do Sequenciamento do Gene 16S rDNA .</b>	<b>22</b>
4.2 Resistência Microbiana.....	25
4.3 Detecção de Sequências Associadas ao CRISPR-CAS.....	38

4.4 Análises das proteínas celulares totais usando SDS-PAGE .....	38
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>48</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>

# 1 INTRODUÇÃO

As pulgas são ectoparasitos hematófagos predominantemente de mamíferos, sendo também parasitos de algumas aves e acidentalmente de répteis. Elas existem há pelo menos a 60 milhões de anos, de acordo com os estudos de Linard (2011), atualmente estas foram descritas com mais de 3000 espécies de pulgas da região Ártica até a Antártica, demonstrando a sua disseminação por todo o mundo (LINARDI, 2017). O parasitismo das pulgas nos mamíferos perdura a milhares de anos, causando vários impactos na saúde dos mesmos devidos esses ectoparasitas serem vetores de importantes patógenos zoonóticos, como *Yersinia pestis* agente etiológico da peste; *Rickettsia typhi* agente transmissor do tifo murino; *Rickettsia felis* agente etiológico da Riquetsiose felina; doença da arranhadura do gato por *Bartonella henselae* e outras infecções associadas causadas por *Bartonella* spp. (LAWRENCE et al., 2015).

Durante as últimas décadas, tornou-se evidente que existem muitas lacunas no nosso conhecimento sobre a maioria dos parasitos, que não podem ser preenchidas através dos métodos tradicionais da parasitologia (VASCONCELLOS et al., 2018). Neste contexto, existe um crescente corpo de evidências que sugere que a biologia de muitos parasitos e vetores (carrapatos, pulgas, mosquitos e nematóides) é influenciada por, e em alguns casos depende da presença ou ausência de, determinados grupos de microorganismos (KOYLE et al., 2016; REESE; DUNN, 2018). Como todos os outros eucariontes, os artrópodes vivem em estreita associação com microrganismos (a microbiota), que influenciam profundamente sua ecologia e evolução (TAYLOR et al., 2012). Essas associações podem ser benéficas ou prejudiciais à biologia dos insetos (Gurung et al., 2019) e a microbiota pode inclusive afetar a capacidade de transmissão de patógenos (ERICKSON et al., 2009; BRINKER et al., 2019).

A pulga de gato (*Ctenocephalides felis*) é um dos ectoparasitos mais comum de cães e gatos domésticos em todo o mundo (LAWRENCE et al., 2019). No entanto, até o momento, poucos estudos, dos quais dois foram realizados na Austrália (Murrel et al., 2003; Lawrence et al., 2015) e dois na América do Norte (Pornwiroon et al., 2007; Vasconcelos et al., 2018) examinaram a composição e a possível importância/influência da microbiota sobre fisiologia, biologia do desenvolvimento, reprodução e competência vetorial. A microbiota de outras espécies de pulgas também recebeu alguma atenção, mas seria justo afirmar que, em comparação com carrapatos e mosquitos, para os quais existem centenas de estudos examinando diversos aspectos da microbiota, as pulgas têm recebido atenção limitada.

O objetivo principal foi realizar uma avaliação dos componentes cultiváveis da microbiota de pulgas oriundas de uma colônia mantida no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro (UFRRJ), e avaliar a sua estabilidade ao longo de oito anos (2011 a 2018). Para este fim, as bactérias presentes em diferentes estágios de desenvolvimento, foram isoladas e posteriormente identificadas através do sequenciamento do gene 16S rDNA. Análises adicionais investigaram a suscetibilidade das bactérias a uma variedade de substâncias antimicrobianas e a presença de componentes do sistema CRISPR-Cas foi avaliado usando a reação de polimerase em cadeia (PCR). Com o intuito de desenvolver métodos para facilitar a expansão desta pesquisa para populações de pulgas associados com animais naturalmente infectados com pulgas, uma técnica baseada na análise de proteínas celulares totais por eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi avaliado como uma ferramenta de triagem, de baixo custo, para a identificação de espécies de bactérias do tipo cocos Gram-positivos isolados de pulgas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Distribuição Geográfica de *Ctenocephalides felis*

A espécie *Ctenocephalides felis*, conhecida popularmente como a “pulga do gato”, além de considerada um dos mais importantes ectoparasitos de cães e gatos do mundo, por ser cosmopolita, é o agente infectante e transmissor de doença, acarreta em altos gastos para seu controle e possuem problemas de resistência a inseticidas (LINARDI; SANTOS, 2012). São muito comuns de serem encontradas em regiões temperadas e tropicais, prioritariamente hospedadas em gatos e cães, podendo infestar outros animais silvestres, como gambás, guaxinins e ratos (CLARK et al., 2018). E podem facilmente infectar seres humanos por meio de picadas (BITAM et al., 2010).

As pesquisas sugerem que *C. felis* originou-se na África e como consequência da dispersão de cães e gatos mediada por humanos, juntamente a sua excelente adaptação ao meio urbano, foi amplamente difundida para outros países. Com a finalidade de descobrir a origem ancestral da pulga *C. felis*, Lawrence et al. (2019) estudaram a distribuição e as relações filogenéticas dos membros do gênero *Ctenocephalides* coletadas e identificadas em 56 países de seis continentes (Oceania, Europa, Ásia, África, América do Sul e América do Norte), e relataram a partir das análises de um ancestral comum Africano, confirmando a teoria de sua origem.

### 2.2 Biologia

As pulgas são insetos holometábolos, portanto, possuem quatro estágios de vida: ovos, larvas (três instares larvais), pupas e adultos. São hematófagas obrigatórias somente na fase adulta. O ciclo completo varia entre 25 a 30 dias, dependendo das condições ambientais e alimentação disponível (LINARDI, 2011). O conhecimento da biologia desse parasito é de extrema importância para se elaborar estratégias de manejo de controle em espécies acometidas por esses invertebrados (HALOS et al., 2014).

Os ovos das pulgas são depositados entre os pelos dos animais que caem no solo e ficam presos a substratos, onde os animais normalmente dormem e habitam (Silva et al., 2008) em temperatura e umidade adequadas a eclosão não passa de 72 horas e as larvas formam seus casulos de seis a sete dias (DURDEN et al., 2009). As larvas se alimentam de fezes das pulgas adultas e de matéria orgânica no solo, como são altamente sensíveis a luz, se protegem embaixo de folhas ou outro abrigo que possibilite sombreamento nesse estágio de desenvolvimento (Dryden; Rust, 1994) ou em ambientes internos, como entre fibras dos carpetes dentre outros refúgios (BITAM et al., 2010). Segundo Silverman e Rust, (1985), as pupas podem sobreviver até 174 dias dependendo do clima e estímulos de emergência. Em condições favoráveis as pulgas adultas emergem após cinco a nove dias da pupação; apresentam fototropismo positivo e geotropismo negativo, indo em busca do hospedeiro alimentar-se. Ou podem ficar vários dias sem consumir sangue, porém, logo após o primeiro repasto, as pulgas morrem dentro de 24-48h se forem removidas do hospedeiro (DRYDEN, 1988). A oviposição ocorre de 36 a 48 horas após o primeiro consumo sanguíneo (DA SILVA et al., 2008). Em condições climáticas ideais, 62% das pulgas emergidas podem sobreviver até 62 dias, geralmente permanecem no hospedeiro por pelo menos 50 dias (DRYDEN; RUST, 1994).

### 2.3 Importância na Medicina Veterinária e na Saúde Pública

O aparecimento de doenças transmitidas por pulgas no mundo é muito maior do que geralmente é consentido por médicos e conseqüentemente e de desconhecido por grande parte da população, em geral. Por conseqüência disso, o diagnóstico muitas vezes leva tempo para ser feito, atrasando o devido tratamento em tempo hábil da terapêutica para cada caso específico de enfermidade transmitida por esse vetor ao homem e aos animais. Por exemplo, a infecção por *Rickettsia felis* pode ser diagnosticada incorretamente como a doença riquetsiose semelhante transmitida por carrapatos (BITAM et al., 2010).

As pulgas são ectoparasitos de grande importância para a saúde animal e humana por transmitirem importantes patógenos zoonóticos, como *Bartonella henselae*, *Rickettsia* spp. (RUST, 2017; DURDEN e HINKLE, 2019). As pulgas também podem hospedar *Dipylidium caninum*, que são parasitos de cães e gatos e ocasionalmente causam infecção humana (CABELLO et al., 2011). Além de causarem estresse pelo prurido e anemia quando o grau de parasitemia é elevado, a picada também pode causar irritações alérgicas de diferentes intensidades devido a inoculação de sua saliva no corpo dos indivíduos submetidos ao repasto do inseto (RUST, 2017).

As doenças transmitidas por pulgas estão emergindo e ressurgindo em todo o planeta. (BLANTON; WALKER, 2017). Estudos indicam que as alterações climáticas irão modificar uma série de espécies, incluindo potenciais parasitas zoonóticas e, conseqüentemente, a emergência de doenças associadas, trazendo riscos tanto para os seres humanos quanto para os animais (CRIKVENICA; SLAPETA, 2019). As interferências nas interações parasito-hospedeiro vêm aumentando, devido a ações antropogênicas e por conseqüência disso, podem ressurgir de forma epidêmica (BITAM et al., 2010). Principalmente devido a massivas atividades antrópicas, como agricultura, pecuária, urbanização, entre outras, provocando mudanças climáticas, alterações da temperatura global, afetando o equilíbrio do ecossistema (DASZAK et al., 2000). A interferência do homem em áreas ambientais pode resultar em novas linhas de transmissão, infectando novos hospedeiros. Por exemplo, em áreas rurais, pulgas de animais domésticos podem ser encontradas em cães selvagens. Dessa maneira, os cães domésticos podem transportar parasitas patogênicos, entre animais domésticos, selvagens e humanos (POO-MUNOZ et al., 2016). Conforme as contribuições analíticas de Clark et al. (2018) observaram, através de modelos filogenéticos, que *C. felis* é capaz de infestar uma ampla diversidade de espécies de mamíferos selvagens através de adaptação ecológica, logo, os mais afetados serão os animais que habitam ambientes que possuem maior interferência do homem.

Ao avaliarem populações colonizadas de *C. felis*, Higgins et al. (1994), detectou, através de análise molecular, o nível de infecção por *R. felis* em oito colônias em laboratório de diferentes áreas dos Estados Unidos e registraram taxas de infecção que variaram de 43 a 93% (média de 72%). Posteriormente, Wedincamp e Foil (2003) relataram uma taxa de infecção de 65% em outra colônia nos EUA. Em 2004, a colônia de *C. felis* mantida no (LQEPV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro foi examinada para detecção da infecção por *Rickettsia felis*, em todas as fases de desenvolvimento do ciclo de vida, utilizando-se métodos baseados em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Todas as fases testadas dos ciclos (30 ovos, 30 larvas, 30 pupas, 30 machos e 30 fêmeas) estavam positivas para *R. felis*, indicando um nível de infecção de 100% (HORTA et al., 2010).

A capacidade de persistência de *R. felis* em colônias de pulgas é desconhecida. No entanto, quando se comparam os dados de Higgins et al., (1994) com os de Pornwiroon et al. (2007), foi observado que a prevalência de infecção por *R. felis* em duas das colônias tinha



caído de 83% para 0% e de 50% para 16,4%. Curiosamente, no caso da terceira colônia, o nível de infecção aumentou de 86% para 93,8%. Apesar da presença deste patógeno emergente na maioria das colônias de pulgas examinadas nos últimos 20 anos, há possibilidade de transmissão de *R. felis* para os profissionais que trabalham em laboratórios, em contato regular com pulgas colonizadas, tem sido um objeto de estudo limitado até o momento.

De acordo com Horta et al. (2010), no qual, investigaram a presença de anticorpos reativos (anti-*Rickettsia*) em gatos e seres humanos que tinham contato direto com a colônia de pulgas do LQEPV. Anticorpos reativos (anti-*R. felis*) foram detectados em sete dos oito gatos que eram regularmente usados para alimentar a colônia de pulgas. Além disso, um total de seis das 15 pessoas que trabalharam com a colônia de pulgas tinham anticorpos reativos contra *R. felis*.

Com exceção de um soro humano, todos os soros reativos para *R. felis* também foram reativos para *Rickettsia rickettsii* e/ou antígenos de *Rickettsia parkerii* com títulos semelhantes a *R. felis*. O único soro humano que foi reativo apenas a *R. felis* tinha um título final de 256, indicando que esta pessoa foi infectada por *R. felis*. Esta constatação destaca a necessidade de acompanhamento regular dos artrópodes colonizados para monitorar a presença de patógenos zoonóticos (HORTA et al., 2010).

## 2.4 Microbioma de Artrópodes

O grupo de microrganismos (comensais, simbióticos e patogênicos) que ocupa os diferentes nichos dos organismos eucariontes é denominado microbioma (NARASIMHANE; FIKRIG, 2015; TIPTON et al., 2019). Contrariamente à maioria dos procariotos, eucariotos têm capacidades metabólicas bastante limitadas e, conseqüentemente, a simbiose proporcionou uma estratégia evolutiva para estes ganharem acesso a uma gama maior de recursos metabólicos (HUNTER et al., 2015). Os simbiotes microbianos podem ser transmitidos de pais para filhos por uma variedade de métodos, incluindo herança citoplasmática, coprofagia, o contato direto durante e após o nascimento, e o meio ambiente. Além disso, a aquisição de micróbios e genes microbianos é um mecanismo poderoso para dirigir a evolução (ZILBER-ROSENBERG; ROSENBERG, 2008).

A biologia está passando por uma mudança de paradigma, no qual cada animal e planta é um holobionte (definido como hospedeiro, junto com seus simbiotes). Assim, organismos multicelulares não podem mais ser considerados indivíduos pelas definições clássicas do termo (BORDENSTEIN; THEIS, 2015). A microbiota e seu hospedeiro interagem de uma maneira que afeta a aptidão do holobionte de muitas formas, incluindo sua morfologia, o desenvolvimento, o comportamento, a fisiologia, e resistência à doença, competência vetorial, imunidade inata e adaptativa, a variação genética e até a origem e evolução das espécies (ROSENBERG; ZILBER-ROSENBERG, 2008; NARASIMHANE; FIKRIG, 2015). Tomadas em conjunto, estas interações caracterizam o holobionte como uma entidade biológica única.

A importância das interações hospedeiros-microrganismos tem sido firmemente estabelecida no campo da entomologia, em particular, os múltiplos papéis desempenhados pelas espécies da bactéria do gênero *Wolbachia*, sendo a biologia de seus hospedeiros objeto de intensa investigação nos últimos 20 anos (SARIDAKI; BOURTZIS, 2010; TAYLOR et al., 2013; MARTINEZ et al., 2014; BI; WANG, 2019). Mais recentemente um método de controle do mosquito *Aedes aegypti*, baseia-se na capacidade do gênero *Wolbachia* influenciar a biologia de seus hospedeiros, podendo interferir na transmissão dos vírus da dengue, chikungunya e zika (CARAGATA et al., 2015; JOHNSON, 2015; MOHANTY et al., 2019).

Tradicionalmente à disciplina de parasitologia, esta concentrou-se na biologia, taxonomia e ecologia de parasitos com base na análise de aspectos incluindo características morfológicas, a caracterização dos ciclos de vida, modos de infecção e transmissão, a determinação da gama de hospedeiros, as doenças causadas e as respostas imunológicas induzidas por parasitos. Além disso, o potencial de alguns parasitos (em particular, os artrópodes), na atuação como vetores de agentes microbianos e intracelulares de doenças humanas e animais (por ex. *Anaplasma* spp., *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp. e *Rickettsia* spp.), fazem parte de uma área de pesquisa bem estabelecida. No entanto, durante as últimas décadas, tornou-se evidente que existem muitas lacunas no nosso conhecimento sobre a maioria dos parasitos, que não podem ser preenchidas através dos métodos tradicionais da parasitologia. Neste contexto, existe um crescente corpo de evidências que sugere que a biologia de uma lista cada vez maior de parasitos e vetores (incluindo carrapatos, pulgas, mosquitos e nematóides) é fortemente influenciada por, e em alguns casos depende da presença ou ausência de, determinados grupos de microorganismos (HEADLEY et al., 2011; TAYLOR et al., 2012; ZUG; HAMMERSTEIN, 2015; GAO et al, 2019).

O microbioma dos artrópodes, assim como o de seres humanos, abriga uma associação complexa de microorganismos com uma variedade diversificada, composto por vírus, bactérias, fungos e protozoário, incluindo agentes patogênicos onde as interações desses organismos são fundamentais para a manutenção da vida (GAO et al., 2019). As interações entre micróbio-hospedeiro podem ser facultativas ou obrigatórias e dependem de fatores bióticos e abióticos e do hospedeiro em que estão inseridos. Os parasitos são os principais vetores de diferentes bactérias patogênicas aos animais sendo responsáveis por alta mortalidade, morbidade e perda econômica em todo o mundo (SALDAÑA et al., 2017). A medida em que há estabelecimento da relação parasito-hospedeiro, ocorre uma grande exposição ao animal a vários membros da comunidade bacteriana do parasito. Como exemplo, os carrapatos que transmitem o agente causador da doença de Lyme, *Borrelia burgdorferi*, e de doenças *Riquetsiais Rickettsiais* como à febre maculosa; as pulgas que transmitem o agente causador da peste, *Yersinia pestis*, de doenças riquetsiais como *R. felis* e doenças causadas por cepas de *Bartonella* (PORNWIROON et al., 2007; JONES et al., 2009). Os mosquitos como *Anopheles* spp. são vetores parasitos de *Plasmodium* que causam malária em humanos, *Aedes* spp. vetores do vírus da dengue, da febre amarela, zika e *Chikungunya* (WEAVER et al., 2016).

Com o advento das tecnologias moleculares foi permitido a expansão da compreensão da composição microbiana de diversos vetores, principalmente a respeito do microbioma bacteriano (SALDAÑA et al, 2017; POLLET et al., 2020). Estudos demonstraram que o microbioma do reino animal é composto de comunidades complexas vivendo tanto na parte interna quanto externa do corpo, demonstrando a influência que ele possui em afetar vários processos ecológicos e evolutivos dos seres em que habitam (Binetruy et al., 2018), como na nutrição, no metabolismo, no sistema vascular, hepático, respiratório, imunológico, endócrino e neurológico desses vetores. Essas interações estão associadas desde quando o ser vivo nasce até a sua morte (KOYLE et al., 2016). A microbiota pode inclusive afetar na capacidade de transmissão de patógenos (Vasconcellos et al., 2018) devido a interações de simbiose, podendo ocorrer inibição do crescimento e estabelecimento de organismos patogênicos e/ou a multiplicação de patógenos influenciando na diminuição da diversidade de microorganismos presentes dentro dos vetores (KELLY et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2018).

Atualmente, esforços têm se concentrado na manipulação de microorganismos internos, como estratégias de intervenção de doenças transmitidas por vetores, com o objetivo de limitar a transmissão de patógenos por artrópodes que se alimentam de sangue, principalmente de mosquitos e carrapatos (SALDAÑA et al, 2017; BINETRUY et al., 2018).

Nesse contexto, os mecanismos de coexistência entre os microrganismos, a diversidade microbiana e as suas interações são fundamentais para as funções ecológicas dentro das comunidades (Vasconcellos et al., 2018), por essa razão é importante sobre o estudo e entendimento da microbiota desse inseto. Por exemplo, os carrapatos normalmente são capazes de se contaminar com o agente etiológico da febre maculosa *R. rickettsii*, porém quando carrega o simbiote *Rickettsia peacockii*, ao picar um hospedeiro vertebrado infectado com *R. rickettsii* ele não contrai o patógeno (BALDRIDGE et al., 2004). Foi observado por Kelly et al. (2017) que a riqueza bacteriana do mosquito *Lutzomyia longipalpis* na presença do protozoário *Leishmania infantum* diminuiu progressivamente. Assim como também foi visto que na presença de *R. felis* nas pulgas *C. felis*, há uma diminuição considerável da diversidade da microbiota (PORNWIROON et al., 2007). Nos estudos realizados por Buarque et al. (2016) pressupõem que ao silenciar uma proteína antimicrobiana do intestino de *Triatoma infestans* através de técnicas moleculares, elevou a carga bacteriana no intestino, reduzindo o protozoário *Trypanosoma cruzi*, demonstrando como o controle do microbioma pelo hospedeiro influencia na dinâmica do patógeno. Recentemente, Angleró-Rodríguez et al. (2016) relataram que o fungo *Penicillium chrysogenum* aumenta a intensidade da infecção por *Plasmodium* em mosquitos *Anopheles*, levando a supressão da imunidade inata do mosquito, favorecendo a infecção por *Plasmodium*.

#### **2.4.1. Simbiontes presentes nas pulgas e suas associações**

Anteriormente o termo simbiose era considerado como uma interação benéfica entre os seres vivos. Em 1967, essa relação passou a ser chamada de interação mutualística, sendo simbiose então definida como quaisquer interações (mutualismo, comensalismo, parasitismo, predação) entre os organismos (DE AVELAR, 2006; TIPTON et al., 2019). O sistema simbiótico é bem estudado em alguns insetos que dependem de dietas restritas nutricionalmente, por exemplo, de sangue (BENNETT et al., 2019). Os microrganismos podem ser classificados como: simbiontes primários (transmitidos verticalmente), dos quais são indispensáveis para sobrevivência e os simbiontes secundários (transmitidos verticalmente, horizontalmente ou pelo meio ambiente), estando inclusos as bactérias comensais, podendo ser dispensáveis para seus hospedeiros (WEISS; AKSOY, 2011). Como exemplo de simbiontes primários, como discorre Duron et al. (2018), que demonstraram que o sangue de vertebrados ingerido pelo carrapato é limitado de vitaminas do complexo B e graças aos simbiontes herdados verticalmente da mãe o carrapato consegue ter acesso a esses nutrientes ausentes, garantindo o seu crescimento e sobrevivência. Além das interações entre hospedeiro e seus micróbios serem importantes individualmente, é também fundamental para a evolução de seus hospedeiros (BENNETT et al., 2019). Além disso, a flora bacteriana dos artrópodes representa um vasto conjunto de material genético que poderia influenciar a evolução de novos microrganismos patogênicos ou, alternativamente, a aquisição de características novas por patógenos existentes; tais como a resistência aos antibióticos ou aquisição de genes que codificam fatores de virulência (WATERFIELD et al., 2004; BOIOCCHI et al., 2019; HYDE et al., 2019). Portanto, é provável que há fatores relacionados ao hospedeiro vertebrado, como a idade, o sexo e o *status* reprodutivo assim como ambientais como temperatura e tipo de habitat, da mesma forma, influenciam as comunidades bacterianas dos artrópodes hematófagos.

Para aprofundar sobre o tema de manipulação da microbiota e a possibilidade de empregar o mesmo para o controle de artrópodes, conforme sugerido por vários autores (Narasimhane; Fikrig, 2015; Saldaña et al.; 2017; Vasconcellos et al., 2018), o primeiro pré-requisito é realizar a caracterização profunda da composição das populações de microrganismos

nas espécies de artrópodes de interesse, não somente em termos das espécies de microrganismos encontrados, mas também em termos da estabilidade destas interações. Em comparação a alguns grupos de artrópodes (particularmente, os mosquitos e carrapatos), existem poucos relatos na literatura com enfoque no microbioma de pulgas e nenhuma que considerou os possíveis impactos das variáveis citadas acima.

A primeira investigação para avaliar, efetivamente, o tópico da simbiose em pulgas (incluindo *C. felis*) foi conduzida por (BEARD et al. 1990). Nesse estudo, as técnicas de microscopia de contraste de fase e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) foram empregadas para investigar a presença de endossimbiontes em pulgas dissecadas com a intenção de gerar conhecimento sobre esses organismos e avaliar seu potencial como agentes de controle biológico. Foi observada uma variedade de microrganismos e metazoários, incluindo baculovírus, bactérias, vários protozoários, nematóides e cestóides. Organismos do tipo *Rickettsia* foram observados em vários tecidos de cada pulga examinada, em todo o sistema digestivo, nos túbulos de Malpighi e nos tecidos reprodutivos masculinos e femininos. No entanto, não foram feitas tentativas para cultivar e/ou isolar qualquer um dos organismos observados.

A maioria dos estudos investigando a microbiologia de pulgas de gatos e cães concentra-se na detecção de grupos específicos de patógenos, principalmente *Rickettsia* sp. e *Bartonella* sp., ou (em poucos casos relatados até a atualidade) de interações microbianas com ênfase principalmente na detecção molecular de *R. felis* e *Wolbachia* spp. e nas formas de transmissão (horizontal, vertical, transovariana, transstadial) destas proteobactérias (HIGGINS 1994; BOUYER et al., 2001; GORHAM et al., 2003; ROLAIN et al., 2003; WEDINCAMP; FOIL, 2003; PORNWIROON et al., 2006; PORNWIROON et al., 2007; HORTA et al., 2010; HIRUNAKA NO PUN et al., 2011; TAY et al., 2013; LAWRENCE et al., 2015; VASCONCELLOS et al., 2018). Todos esses estudos empregaram análises baseadas em biologia molecular dos componentes bacterianos do microbioma, usando principalmente métodos independentes de cultura, baseados no sequenciamento de amplicons de 16S rDNA. Os dados gerados a partir desses estudos demonstraram uma variação substancial na prevalência relativa de *R. felis* e endossimbiontes, principalmente *Wolbachia*, entre as colônias de pulgas examinadas. No entanto, a interação possível entre estes microrganismos e os outros componentes da microbiota tem recebido atenção limitada.

Os simbiotes na microbiota de um vetor podem afetar na sua reprodução, no tempo de vida e transmissão de patógenos, trazendo enorme relevância para a saúde do animal parasitado (NARASIMHANE; FIKRIG, 2015; POLLET et al., 2020). Em muitos invertebrados o *Wolbachia* é mutualista e pode ser benéfica ou essencial para a biologia do hospedeiro, necessário para a fertilidade, desenvolvimento e sobrevivência de alguns insetos, inclusive foram demonstrados ter um potencial para o controle de doenças parasitárias como a malária e a dengue (MOHANTY et al., 2019). Uma pesquisa de *C. felis* capturada na natureza, coletada nos EUA, identificou o gênero *Wolbachia* em 21% das pulgas, no entanto, foi analisado que a presença dessa espécie varia entre diferentes espécies de pulgas e as implicações práticas ainda são desconhecidas (GORHAM et al., 2003). O endossimbionte bacteriano também foi identificado em 55 (17,8%) das 309 pulgas de gatos em um estudo na França (ROLAIN et al., 2003). A observação de Tay, et al. (2013) também foi possível detectar uma taxa alta de *Wolbachia* presentes em 59 (62,1%) das 95 pulgas *C. felis* estudadas na região tropical da Malásia. Lawrence et al. (2015) ao comparar o microbioma da *C. felis* e da pulga de *echidna* observou que em ambas as espécies a *Wolbachia* foi um dominante componente da microbiota, foi demonstrado que os gêneros *Cardinium*, *Pseudomonas* e *Corynebacterium* também representaram possivelmente endossimbiontes, por estarem presentes em todas as pulgas avaliadas.

Existem poucos estudos usando colônias de pulgas como sistema modelo, para investigar a possível influência da infecção por *R. felis* sobre os outros integrantes da microbiota de *C. felis*. Porém, Pornwiroon et al. (2007) examinaram a microbiota bacteriana em três colônias de pulgas distintas, demonstrando diferentes níveis de infecção por *R. felis*. A diversidade e a riqueza de espécies de bactérias em cada colônia de pulgas foram determinadas através da construção e análise de bibliotecas de clones do gene codificador do 16S rRNA, geradas a partir de DNA genômico total, extraídos de adultos recém emergidos, como molde em reação de PCR. Diferenças significativas na prevalência de *Wolbachia* spp. foram observadas entre cada colônia, com maior prevalência em pulgas livres da infecção por *R. felis*. Com base nesses dados, foi sugerido que a infecção por *Wolbachia* spp. pode conferir um certo grau de resistência às infecções por *R. felis*. Foi observado também, que pulgas não infectadas com *R. felis* além de terem apresentado uma maior riqueza de espécies, apresentaram espécies de *Acinetobacter*, que estavam ausentes nas pulgas infectadas com *Rickettsia felis*.

É de notável interesse que *Acinetobacter* spp. foi previamente detectado como integrante da microbiota de pulgas da espécie *Oropsylla hirsuta* (ERICKSON et al., 2009), capturadas de cão selvagem da pradaria (*Cynomys ludovicianus*). Além disso, os dados dos estudos de Murrell et al. (2003) que utilizavam métodos baseados na cultura, também identificaram *Acinetobacter* spp. como componente dominante na microbiota de pulgas, incluindo *C. felis*, coletadas de uma variedade de animais na Austrália. Com base nessas observações, foi sugerido que tanto *Wolbachia* spp. e *Acinetobacter* spp. poderiam ser utilizadas para reduzir a competência vetorial de pulgas, através da criação de insetos paratransgênicos. Até o presente momento, não há nenhuma evidência experimental para apoiar esta hipótese em pulgas. No entanto, o triatomíneo *Rhodnius prolixus*, vetor de *Trypanosoma cruzi*, se tornou incompetente através dessa abordagem (BEARD et al., 2002). Além disso, o uso do *Wolbachia*, para reduzir a capacidade vetorial do mosquito *Aedes aegypti*, também foi proposto e é uma área de investigação ativa (BIAN et al., 2010; ALFANO et al., 2019).

Dentre os limitados estudos baseados na avaliação da microbiota de pulgas a partir de meio de cultura, a prevalência de espécies do gênero *Staphylococcus* caracterizadas como coagulase-negativo (CoNS) foi relatada (MURRELL et al., 2003). Além disso, a espécie *Staphylococcus saprophyticus* foi identificada com alta frequência nas bibliotecas de clones no estudo de Pornwiroon et al. (2007) e na investigação de Lawrence et al. (2015), executada na Austrália. Em contraste, não houve evidências para este grupo nas amostras de *C. felis* examinados na Califórnia (EUA), usando sequenciamento profunda da próxima geração “Next Generation Sequencing” (NGS), na investigação de VASCONCELOS et al., (2018). Sabe-se que esse grupo de micro-organismos representa comensais frequentemente encontrados da flora da pele humana e animal (BECKER et al, 2014; MA et al., 2019). Tradicionalmente estes micróbios foram considerados inofensivos à saúde, porém estudos gerados nas últimas décadas vêm demonstrado que ao contrário, essas bactérias são frequentemente associadas a infecções nosocomiais e clinicamente relevantes, tanto na medicina humana quanto na veterinária (RIGATTI et al.,2010; CZEKAJ, et al.,2015; ASAAD et al, 2016; ROSSI et al., 2017; GARG, 2019).

## 2.5 Controle

Conforme os dados do IBGE (2018), o Brasil é o segundo maior país do mundo em população de cães, gatos e aves, o número de animais de estimação tem aumentado com os anos, com a estimativa de aumentar 5% ao ano (IBGE, 2016). Os dados da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet), em 2016 relatam que

os gastos foram de cerca de R\$19 bilhões, representando um aumento de 5,7% em relação ao ano anterior. Com previsão para 2020 um aumento de R \$20 bilhões. Só nos EUA, mais de US \$15 bilhões são gastos por ano na proteção anual de animais de companhia contra pulgas (NISBET; HUNTLEY, 2006). De acordo com o relatório da Zion Market, (2019) o mercado global de parasitocidas animais foi avaliado em aproximadamente US \$8,65 bilhões em 2018 e deverá gerar cerca de US \$12,85 bilhões até 2025.

A resistência das pulgas a diversos inseticidas é de relevada importância, Coles e Bryden, (2014), fizeram um levantamento demonstrando que a *C. felis* é resistente ao maior número de diferentes categorias de inseticidas comparado a outras pulgas, dentre eles apresentam resistência a carbamatos, organofosforados, piretróides, piretrinas, organoclorados e fipronil.

É possível que por essa razão o tratamento esteja cada vez mais difícil, porém ainda não existem dados satisfatórios que comprovem a relação da resistência das pulgas com a diminuição da eficácia dos tratamentos, muito dos problemas com a resistência está associado ao fato do uso inadequado dos tratamentos. Outro problema associado ao uso de inseticidas são os impactos que podem causar no ecossistema, contaminando principalmente ambientes aquáticos e forçando pressão seletiva a outros organismos presentes no ambiente aplicado (AMÉRICO et al., 2015). Nessa circunstância, tem-se estudado novas alternativas para o controle de pulgas, sendo uma delas o estudo de endossimbiontes da microbiota desses vetores, uma vez que a microbiota controla a maioria das funções fisiológicas e químicas do organismo, podendo inclusive influenciar na transmissão de patógenos (ERICKSON et al., 2009).

## 2.6 Resistência Antimicrobiana

A descoberta dos antibióticos no final dos anos 20 revolucionou a medicina humana e veterinária, aumentando consideravelmente a expectativa de vida e salvando milhares de pessoas e animais de infecções bacterianas (KUMBHARE et al., 2019). Os antibióticos são substâncias de origem natural, semissintética ou sintéticas, que possuem a capacidade de inviabilizar ou inibir o crescimento de microrganismos. Porém o uso indiscriminado desses medicamentos na medicina veterinária e humana promoveu o surgimento de resistência antimicrobiana a todos os antibióticos atualmente disponíveis para uso (DURAND et al., 2019; KUMBHARE et al., 2019).

A emergência de bactérias resistentes e multirresistentes é um grave problema de saúde pública globalizado, segundo Darwin, a seleção natural das espécies se dá pela sobrevivência dos mais adaptados ao meio. Conforme a necessidade de continuar perpetuando sua espécie, vão passando seus genes para as próximas gerações (PIOVEZAN, 2019). Nesse contexto, a exposição de agentes antimicrobianos acaba gerando uma pressão seletiva determinante para o desenvolvimento de mecanismos de resistência. Dessa maneira, bactérias previamente sensíveis podem adquirir resistência por meio de mutações cromossômicas e / ou aquisição de materiais genéticos através dos mecanismos de conjugação, transdução ou transformação (CAUMO et al, 2010). Uma vez resistente e sendo confrontado com a contínua pressão seletiva aos mecanismos de resistência serão herdadas pelas células-filhas como garantia de sobrevivência, (LAU et al., 2017), demonstrando a extrema maleabilidade e plasticidade dos genomas bacterianos e sua excelente capacidade de adaptação (KAUR; PETERSON, 2018).

Um exemplo deste preocupante cenário aconteceu em 2015 na China, onde foi relatado pela primeira vez resistência ao antibiótico colistina isolada de animais, alimentos e seres humanos, mediada pelo gene plasmidial (*mcr-1*). Esse antibiótico era utilizado como “último

recurso” para tratar infecções fatais e multirresistentes (MDRIs) na medicina humana para o tratamento que não respondessem a outras drogas (LIU et al., 2016). Após esse relato, vários outros sobre a resistência à colistina, começaram a surgir em diferentes países, inclusive no Brasil (MENEGUZZI et al., 2017). Um estudo retrospectivo da China mostrou a presença do gene *mcr-1* em *E. coli* isolada de aves domésticas na década de 1980 e sugeriu que o surgimento desse gene poderia estar relacionado ao uso da colistina como promotora de crescimento na indústria avícola (SHEN et al., 2016), outro estudo feito por Elbediwi et al. (2019) também apontaram que uso de colistina na prática veterinária favoreceu a disseminação de genes de resistência, devido à alta taxa positiva de *mcr-1* em bactérias de origem animal. Como medida de emergência combinada de resistência ao carbapenem e à colistina mediada por plasmídeo o antibiótico tigeciclina tornou a ser o único antibiótico de último recurso para o gerenciamento de MDRIs resistentes a carbapenêmicos e colistínicos (OSEI et al., 2019).

Os genes associados com resistência e aos mecanismos de transferência existiam muito antes do uso de terapia com antimicrobianos na medicina humana e veterinária. Como exemplo, foram isoladas bactérias resistentes a antimicrobianos, no interior de geleira de regiões altas do Ártico, no Canadá, um ambiente não habitado pelo homem, levando a conclusão, não tão surpreendente, que já existia resistência natural pelas bactérias (DANCER et al., 1997). Portanto, a resistência inata corresponde à resistência que as bactérias possuem a certo tipo de antibióticos, sem terem entrado em contato com o mesmo (RADTKE, et al., 2006). Acredita-se que esses mecanismos advieram da autoproteção contra seus próprios antibióticos naturalmente produzidos (DANCER et al., 1997). Sabe-se que muitos antibióticos utilizados para tratamento anti-infeccioso foram produzidos a partir de microrganismos ambientais. Os avanços de técnicas moleculares permitiram a detecção de genes de resistência em bactéria presente na natureza (solos e água), evidenciando que a resistência aos antibióticos pode ter surgido de ambientes não-clínicos (ALONSO et al., 2001). Estudos apontam que o meio ambiente é um grande reservatório de genes de resistência (CAUMO et al., 2010). Considerando que a presença de plasmídeos é o mecanismo mais conhecido de transferência de genes resistentes a antimicrobianos (conjugação), é de suspeitar que a transferência de genes de resistência à bactéria clinicamente importantes podem ter vindo de bactérias ambientais, patogênicas ou não (Guenni et al., 2018), contudo, a pressão seletiva causada pelas atividades humanas nos últimos 70 anos acabou promovendo um aumento significativo de genes de resistência em populações bacterianas afetando a microbiota dos animais, dos humanos e do meio ambiente, Portanto, o sucesso evolutivo dessas bactérias passou a representar uma grande ameaça à saúde humana (VAZ-MOREIRA et al., 2019).

Na produção animal, os antibióticos são usados não só para fins terapêuticos, como também eram usados como promotores de crescimento, com o objetivo de aumentar a produtividade e competitividade no mercado (TANG et al., 2019) O problema se torna ainda mais agravante devido a maioria dos antibióticos não serem totalmente metabolizadas no organismo animal e seus resíduos acabam indo diretamente para o solo, água superficial e subterrânea. Por consequência, impactam negativamente os organismos presentes nestes ambientes, favorecendo a pressão seletiva, afetando o ecossistema (REGITANO; LEAL, 2010).

As consequências do uso de antimicrobianos descontrolados na clínica veterinária de pequenos animais não são diferentes das observadas na medicina humana e na produção animal (ROSSI et al., 2017; HARTANTYO et al., 2018; DOTTO et al., 2018). A resistência bacteriana pode estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações, incluindo patógenos zoonóticos, que podem ser trocadas entre animais e seres humanos principalmente através do contato direto, mas também por poeira, aerossóis ou alimentos. Assim, animais de estimação podem transportar uma variedade de bactérias, vermes, vírus e fungos, muitos desses microrganismos e em consequência da relação muito próxima

entre animais de estimação e seus donos podem ser transmitidos do animal para o proprietário e vice-versa (YEHUALAESHET et al., 2019). Como foi observado por Song et al. (2013), pessoas que tinham cães de estimação apresentavam microbiota mais semelhante com seus pets. Logo, a presença de bactérias resistentes a drogas muito utilizadas na medicina humana e animal, representa um risco de transferência zoonótica. Estudos apontaram um aumento na prevalência de resistência antimicrobiana em diferentes espécies bacterianas isoladas de animais de estimação (GUARDABASSI et al., 2010). O fator relevante sobre esse problema é que espécies que compartilham o mesmo ambiente podem trocar informações genéticas, principalmente através de plasmídeos, portanto, bactérias multirresistentes podem acabar fornecendo genes que conferem resistência a espécies patogênicas, como *S. aureus* (ROSSI, et al., 2017).

Nesse contexto, assim como existe essa relação de transferência de genes resistentes entre bactérias presentes em animais de estimação e seus proprietários, bactérias resistentes a antimicrobianos presentes em pulgas, podem ser transmitidas para seus hospedeiros e vice-versa. Existem cada vez mais estudos comprovando como os insetos podem servir como reservatórios de genes de resistência sendo potenciais vetores de disseminação. Como por exemplo, estudos sobre moscas (BOIOCCHI et al., 2019; HYDE et al., 2019) e formigas (FONTANA et al., 2010) comprovaram que esses insetos transportavam genes de resistência em hospitais. Porém há poucos estudos sobre a disseminação em outras áreas que não em hospitais e não se sabe ao certo qual é a representatividade real do risco da aquisição de infecções por esses vetores.

O que torna preocupante é o fato de a aquisição da resistência bacteriana ser mais rápida do que a velocidade de produção de novas drogas pelos laboratórios. Portanto é de extrema importância, entender os mecanismos de resistência, a partir de isolamento e identificação desses agentes em laboratório, assim como a realização de testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro*, a fim de buscar um melhor controle, com utilização terapêutica necessária e tratamento de resíduos adequados, reduzindo a resistência a antibióticos (BOIOCCHI et al., 2019).

## 2.7 Antibióticos

O aumento da resistência bacteriana se tornou um grave problema de saúde pública global, para que se possa entender sobre a prevalência de resistência a antibióticos bacterianos é imprescindível entender as origens dessa resistência, como também documentar os reservatórios ambientais de resistência a antibióticos. Assim como foi feito no trabalho de Hyde et al. (2019), do qual observaram que uma colônia de mosquito e mosquitos coletados da natureza abrigavam naturalmente populações bacterianas resistentes a antibióticos. Ainda não foi relatado na literatura dados de resistência a antimicrobianos em pulgas *Ctenocephalides* sp.

A ampicilina é um antibiótico beta-lactâmico semi-sintético, de amplo espectro, utilizado no tratamento de diversas infecções. Seu mecanismo de ação interfere na síntese de peptidoglicano, inibindo a atividade da enzima transpeptidase que leva à formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas que são importantes para rigidez da parede celular bacteriana, prejudicando a proteção da célula contra as variações osmóticas do meio. O principal mecanismo de resistência a esse antimicrobiano é a produção das enzimas  $\beta$ -lactamases que são capazes de promover a abertura do anel  $\beta$ -lactâmico. As bactérias Gram-negativas são mais resistentes a esse antibiótico, devido a sua natureza complexa da parede celular. A resistência também pode vir de modificações estruturais das proteínas ligadoras de penicilina ou através de mutações e modificações das porinas que agem na permeabilidade



bacteriana ao antimicrobiano (GIGUÈRE, et al., 2010). É indicado para cães e gatos no tratamento de infecções respiratórias, geniturinárias e gastrintestinais, além de outras localizadas ou sistêmicas causadas por: *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*, *Clostridium tetani*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus zooepidemicus*, em cães e *Pasteurella multocida*, *Streptococcus canis*, *Proteus mirabilis*, *Clostridium tetani*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. zooepidemicus* e *Leptospira interrogans* em gatos (VETNIL, 2019). Em consonância com Andrade et al. (2019) foram coletadas amostras assepticamente do orifício anal e da cavidade oral de 49 gatos fêmeas domésticas saudáveis após exame clínico e físico das cavidades retais e orais, um dos antibióticos testados que apresentaram maior resistência em ambas amostras foi a ampicilina.

O cloranfenicol é um composto neutro, lipossolúvel e estável, derivado de um ácido dicloroacético e possui uma porção nitrobenzeno, isolado originalmente de *Streptomyces venezuelae* em 1947 (SIQUEIRA et al., 2007). Seu mecanismo de ação envolve a inibição da síntese proteica microbiana, onde ele se liga à subunidade 50S do ribossomo, inibindo a síntese proteica da bactéria. É um antibiótico de amplo espectro, tendo atividade geralmente bacteriostática em Gram-positiva, Gram-negativa e impede a multiplicação de riquetsias e clamídias. O principal mecanismo de resistência ao cloranfenicol é pela enzima acetiltransferase, produzida através do gene *cat* pelas bactérias (GIGUÈRE et al., 2010).

O cloranfenicol é indicado para tratar infecções do trato gastroentérico, respiratório e urogenital de cães e gatos. Em um estudo feito por Carvalho et al. (2014), no qual avaliaram as infecções bacterianas do trato urinário (ITUs) que são causa comum de doença em cães, gatos e humanos, bem como a sua sensibilidade aos antimicrobianos utilizados na rotina clínica contra 94 cepas, 15,4% foram resistentes ao cloranfenicol. Não há muita informação na literatura sobre alta resistência ao cloranfenicol na clínica veterinária.

O cloreto de mercúrio é um agente bacteriostático de amplo espectro, era o principal método de tratamento de várias infecções até 1910 e seu uso permaneceu até os anos 1950. Passou a ser limitado, devido à sua toxicidade, poder de corrosão e ineficácia em presença de matéria orgânica (TORTORA et al., 2016). O sistema nervoso central e os rins são os principais alvos do efeito tóxico do mercúrio no homem (CLARKSON, 1997). Embora esta substância não seja mais usada em medicina veterinária, existem evidências crescentes para apoiar a ideia de que a contaminação de ambientes aquáticos e terrestres por metais pesados, incluindo mercúrio, como resultado de práticas industriais e agrícolas, é uma das principais forças por trás dos extensos níveis de resistência a antibióticos encontrados nas bactérias ambientais, que representam o reservatório mais provável para os genes de resistência que subsequentemente aparecem nos patógenos bacterianos do homem e dos animais (McIntosh et al., 2008; Skurnik et al., 2010; Dickinson et al., 2019) por esse motivo, considera-se importante avaliar a presença de resistência a esse composto.

A nitrofurantoína é um antibiótico sintético é normalmente utilizada para o tratamento de infecções urinárias. Tem como mecanismo de ação a danificação do DNA e de ribossomos das bactérias sensíveis, inibindo a síntese de proteínas. Geralmente é incomum a resistência à nitrofurantoína e muitos organismos resistentes a múltiplas drogas são sensíveis a esse medicamento (GARDINER et al., 2019). A nitrofurantoína normalmente é usada como última opção para tratamentos de infecção urinária em animais de companhia, particularmente quando estão envolvidos patógenos multirresistentes. Normalmente, é usado apenas para o tratamento de infecções bacterianas do trato urinário (ITUs) em pessoas. Pelo fato de ser considerado cancerígeno é proibido para uso em animais produtores de alimentos, mas seu uso em animais pequenos está aumentando devido ao aumento das taxas de resistência antimicrobiana a antimicrobianos veterinários. Há poucos relatos de resistência a esse antibiótico em cães e gatos na literatura. No mesmo estudo feito por Carvalho et al. (2014), citado acima, dentre as ITU's,

associadas a bactérias, de cães e gatos estudados, o menor número de cepas resistentes foi à nitrofurantoína (9,5%).

A estreptomicina é um aminoglicosídeo de amplo espectro, da classe aminoglicosídeos, isolado do bacterium *Actinomyces griseus* na década de 1940. Tem como mecanismo de ação a interferência na síntese de proteínas ou produzindo proteínas defeituosas. Esse antibiótico liga-se primeiramente à superfície da célula bacteriana e é transportado através da parede por um processo dependente de energia oxidativa. Se liga à subunidade 30S do ribossomo, gerando leitura incorreta do código genético, permitindo a ligação de aminoácidos errados na cadeia polipeptídica formando proteínas defeituosas que seriam fundamentais para o funcionamento da bactéria, levando-a em sua morte. Atua contra bacilos aeróbicos Gram-negativos e algumas bactérias Gram positivas. Os mecanismos de resistência pelas bactérias a esse antibiótico são vários e incluem alteração dos sítios de ligação no ribossomo, alteração na permeabilidade da membrana bacteriana ou modificação enzimática da droga (SERIO et al., 2017). Os genes que conferem resistência podem estar frequentemente associados a plasmídeos e em transposons (MAGNET; BLANCHARD 2005). No mesmo estudo de Carvalho et al. (2014), relataram uma alta taxa de resistência a estreptomicina contra as 94 cepas isoladas de cães e gatos.

A rifampicina é um antibiótico bactericida, que age ligando-se e inibindo a RNA polimerase dependente de DNA das bactérias, impedindo a síntese de ácidos nucleicos, impedindo a formação de RNA mensageiro, RNA transportador e RNA ribossômico, ele entra nas células fagocíticas podendo destruir microrganismos intracelulares. É utilizada principalmente para o tratamento de tuberculose e outras infecções causadas por micobactérias.

A oxitetraciclina faz parte do grupo tetraciclina e tem como função a inibição da síntese proteica de microrganismos sensíveis, ligando-se à subunidade 30S, impedindo que o RNA-transportador se fixe ao ribossomo. É um antibiótico de largo-espectro, eficaz no tratamento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. É uma substância isolada a partir do actinomiceto *Streptomyces rimosus* sendo utilizado em uma variedade de condições clínicas (ANDRADE et al., 2008). Desde que foi descoberta, em 1953, a oxitetraciclina se tornou a base antibiótica mais utilizada e comercializada no campo. Na medicina veterinária é usada principalmente na avicultura e bovinocultura. O uso generalizado de tetraciclinas tanto em animais quanto seres humanos levou a um considerável aumento de sua resistência, limitando a sua utilização. A resistência ocorre mais frequentemente como resultado da aquisição de novos genes que codificam o efluxo dependente de energia de tetraciclinas, que é bem comum em bactérias Gram-negativas, do qual as proteínas transmembranares levam a uma diminuição da concentração intracelular do antibiótico, exportando-as para fora da célula, levando a uma redução abaixo do necessário para inatividade nas células bacterianas. Outro mecanismo envolvido na resistência seria através da inibição da síntese proteica, na qual as proteínas citoplasmáticas protegem o ribossomo da ação das tetraciclinas (PEREIRA-MAIA et al., 2010). Contudo, a maioria dos genes resistentes estão associados a plasmídeos ou transposons (ROBERTS,2005). Seu uso é efetivo contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas aeróbicas e anaeróbicas, clamídias, riquetsias (*Ehrlichia* sp.), espiroquetas, micoplasma, e alguns protozoários como *Anaplasma* sp. e *Mycoplasma* spp. São utilizadas em tratamento de doenças do trato respiratório, urinário, gastroentérico, e doenças oftálmicas bacterianas dos animais domésticos.

## 2.8 Sistema CRISPR

Os sistemas CRISPR-Cas (“Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR associated proteins”), ou seja, repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas e proteínas associadas a CRISPR, representam uma estratégia de defesa de várias bactérias e *Archaeobacteria* contra bacteriófagos e/ou DNA exógenos; principalmente de origem plasmidial (JIANG et al., 2013). Utilizando dados baseados na análise de bactérias cultiváveis, foi relatado que os sistemas CRISPR-Cas são encontrados nos genomas de 40 a 50% das bactérias (MAKAROVA et al., 2011), funcionando como uma espécie de sistema imune adquirido. No entanto, dados apresentados através de uma análise aprofundada de populações bacterianas não cultiváveis demonstraram que a frequência dos sistemas CRISPR-Cas era substancialmente mais baixa (aproximadamente 10%), do que os níveis relatados anteriormente (BURSTEIN et al., 2016). Em quase todos os casos, as CRISPR-Cas consistem em um conjunto de sequências repetitivas curtas (aproximadamente de 40 pb) que são separadas por sequências espaçadoras derivadas de DNA exógeno, adquirida após a infecção por bacteriófagos ou contato com plasmídeos. As principais pesquisas que resultaram na identificação dos mecanismos envolvidos na “imunidade” baseada no CRISPR foram relatadas em 2005, por várias equipes de pesquisa independentes que descobriram que os espaçadores CRISPR estavam frequentemente homólogas a fragmentos de elementos genéticos móveis (fagos, plasmídeos e transposons). Sugere que eles eram de origem extracromossômica e provavelmente serviram para conferir um princípio de memória (funcionando de uma forma análogo aos epítomos na imunidade adaptativa por mamíferos) de um inédito “sistema imunológico” procariótico (KARIMI et al., 2018). Posteriormente, o sistema imunológico foi proposto para agir usando o princípio de interferência de RNA (RNAi) (MAKAROVA et al., 2006), baseado na presença de alguns elementos-chave que executariam as funcionalidades necessárias. Dois anos depois, em 2007, a primeira evidência experimental comprovando esta hipótese foi apresentada por Barrangou et al. (2014), demonstrando que as regiões CRISPR com a imunidade adaptativa em *Streptococcus thermophilus*. Especificamente, a aquisição do DNA do fago na extremidade líder de uma matriz CRISPR levou à imunidade hereditária específica da sequência contra fagos contendo sequências homólogas. Logo após, foi demonstrado em *E. coli* que a imunidade baseada no CRISPR é mediada por pequenos RNAs interferentes, não codificadores (crRNAs) do CRISPR que direcionam o CRISPR associado complexo para defesa antiviral (BROUNS et al., 2008). Subsequentemente, a imunidade mediada pelo CRISPR contra o DNA plasmidial foi demonstrado em *Staphylococcus epidermidis* e análises bioinformáticas posteriores demonstraram que o sistema CRISPR-Cas é um sistema imunológico procariótico ativo contra fagos e plasmídeos utilizada largamente nos Reinos Archaea e Bacteria (MARRAFFINI et al., 2008; OSTRIA-HERNÁNDEZ et al., 2015). As vantagens de possuir um sistema CRISPR-Cas, como defesa contra-ataques de fagos, são evidentes e podem explicar sua distribuição aparentemente ampla. No entanto, o valor desse sistema como barreira contra a aquisição de plasmídeos não é tão claro. Neste contexto, a aquisição de plasmídeos pela transferência horizontal de genes permite que as bactérias têm a capacidade de adaptar a diferentes ambientes ou responder ao estresse ambiental, portanto, ocorrem desvantagens quando por exemplo plasmídeos que transmitem resistência a antibióticos são degradados/excluídos pela bactéria (JIANG et al., 2013)

O estudo dos sistemas CRISPR-Cas foi inicialmente visto principalmente como uma questão de interesse acadêmico, no entanto, tornou-se aparente que esses módulos desempenham papéis essenciais na evolução bacteriana e que têm implicações práticas na capacidade de uma determinada espécie bacteriana de adquirir e disseminar DNA associado às plasmídeos ou fagos (WESTRA et al., 2019). Além disso, a natureza única das regiões espaciais

tem sido sugerida para representar um possível meio para genotipagem no nível de espécies ou mesmo ao nível de isolado (KARIMI et al., 2018).

As espécies de *Staphylococcus* são um bom exemplo de bactérias que dependem da transferência de elementos genéticos acessórios para sua adaptação ao ambiente. Fagos e plasmídeos fornecem rotas fundamentais para a disseminação de determinantes de virulência e resistência a antibióticos (BAE et al., 2006; DIEP et al., 2006). Cepas patogênicas adquiriram resistência a todos os antibióticos conhecidos (FURUYA et al., 2006), principalmente através da aquisição de plasmídeos conjugados portadores de genes de resistência (SAIMA et al., 2020). Curiosamente, essas bactérias também possuem sistemas CRISPR-Cas que fornecem imunidade aos plasmídeos (JIANG et al., 2013). Essa observação levou à hipótese de que, como consequência das forças de seleção opostas, as regiões CRISPR-Cas estão em um estado contínuo de fluxo. Nesse cenário, as sequências CRISPR-Cas são adquiridas e espalhadas por transferência horizontal de genes (CHAKRABORTY et al., 2010) e proliferam em habitats nos quais os fagos são uma importante fonte de mortalidade e, por outro lado, são prontamente perdidos ou tornam-se não funcionais em ambientes onde a aquisição de genes e elementos genéticos acessórios (plasmídeos, transposons) são críticos ou essenciais para a evolução adaptativa (BERNHEIM, et al., 2019).

Em contraste com a medicina humana, o estudo dos sistemas CRISPR-Cas em medicina veterinária recebeu atenção limitada até agora. No entanto, uma exceção notável a essa tendência foi o estudo de Rossi et al. (2017), que teve como objetivo caracterizar as espécies de staphylococcus, isolados da orofaringe de gatos domésticos no Brasil e avaliar os perfis de resistência antimicrobiana e a existência de sistemas CRISPR. Os resultados desta investigação demonstraram que quase 60% das cepas apresentavam plasmídeos, sendo 99% resistentes a pelo menos um dos oito antimicrobianos examinados, sendo um total de 12% considerados multirresistentes. A presença de sistemas CRISPR (detectados por PCR), foi baixo (4%) entre as 75 cepas estudadas; um achado considerado consistente com papel putativo deste grupo de bactérias como reservatório de genes de resistência. Além disso, os autores descreveram pela primeira vez a existência de um sistema CRISPR-cas em *Staphylococcus lentus*. Com base em estudos anteriores, que indicaram a associação frequente entre membros do gênero *Staphylococcus* e pulgas, Murrel et al., (2003); Pornwiroon et al. (2007); Erickson et al. (2009); Lawrence et al., 2015; Aivelo et al. (2019) seria valioso investigar a presença desses elementos na microbiota desses ectoparasitos. Essa informação seria importante em relação à resistência aos antibióticos (especificamente ao potencial destas bactérias agirem como reservatórios) e ao potencial de suscetibilidade aos fagos.

## 2.9 Bacteriófagos

Os bacteriófagos, conhecidos como fagos, são vírus que infectam especificamente bactérias. Podem ser caracterizados por seus estilos de vida como obrigatoriamente líticos, temperados ou crônicos, dentro do hospedeiro (VAN BELLEGHEM et al., 2019). No ciclo lítico ou virulento, ao invadir as bactérias, os bacteriófagos se replicam e causam lise das células infectadas liberando novos fagos começando um novo ciclo. No ciclo lisogênico, também conhecido como temperado, o vírus possui um ciclo lítico, mas adicionalmente é capaz de integrar-se na genoma do hospedeiro, ao injetar seu DNA viral, incorporando-se ao genoma da bactéria (na forma de um profago), disseminando seu material genético para as células filhas, sem que ocorra a lise das células infectadas onde permanecem latentes até serem induzidos (geralmente em resposta a algum tipo de dano ao DNA de hospedeiro) a se replicar (KAKASIS; PANITSA, 2018).

Os fagos também podem se replicar através dos ciclos crônicos ou pseudo-lisogênico, estes, ao sair das células hospedeiras, não causam lise (MIRZAEI et al., 2017). O estado lisogênico pode ser convertido em lítico quando a bactéria está submetida a condições estressantes por exemplo agentes indutores como a mitomicina C, a luz UV, antibióticos em concentrações subletais e outros produtos químicos (DE PAEPE et al., 2014). Além disso, a competição interespecie entre as bactérias em ambientes naturais pode resultar na produção de substâncias como o peróxido de hidrogênio que é capaz de induzir a morte de outras bactérias através da indução de fagos lisogênicos (Selva, et al., 2009), demonstrando a importância dos estudos sobre o efeito dos bacteriófagos na co-evolução das microbiomas.

Em contraste com a ideia de usar fagos líticos como terapia antibacteriana, a possibilidade de empregar profagos para controle de patógenos recebeu apenas uma atenção limitada. No entanto, em algumas situações, a terapia usando indução de profago pode ser particularmente atraente como meio de biocontrole por fagos, especialmente onde fagos líticos para uma determinada bactéria ou população de bactérias, não podem ser facilmente isolados, devido a mecanismos ou requisitos exigentes de crescimento de células hospedeiras de defesa fágica codificada pelo hospedeiro (mas onde profágios completos são integrados ao genoma do hospedeiro).

A terapia fágica convencional requer vários estágios, incluindo isolamento, purificação, caracterização, produção em massa, determinação de misturas apropriadas de fagos e desenvolvimento de um método de entrega apropriado. A possibilidade de usar a indução dos profagos presentes na microbiota dos ectoparasitos ainda não foi investigada. Porém estudos em laboratório já relataram que os antibióticos podem ser eficazes em níveis subinibitórios quando as bactérias carregam fagos latentes, isogênicos (ALBINO, 2011).

De acordo com Clifton et.al. (2019) utilizando um modelo populacional da relação bactéria-fago para examinar o papel que os fagos latentes desempenham na população bacteriana ao longo do tempo em resposta ao tratamento com antibióticos, observaram que o estresse induzido pela administração de antibióticos, mesmo que as bactérias sejam resistentes à morte por antibióticos, é suficiente para controlar a infecção sob certas condições.

As microbiotas e microbiomas de numerosas espécies de mosquitos e carrapatos têm sido o foco de centenas de investigações durante a última década (SCOLARI, et al., 2019; GAO et al., 2019; DÍAZ-SÁNCHEZ, et al., 2019). No entanto, apesar desse esforço extensivo, o resultado desses estudos foi essencialmente descritivo, com apenas um número muito limitado de aplicações práticas relatadas até o momento (CARAGATA, et al., 2019). Ao mesmo tempo, e de maneira surpreendente, apenas uma atenção limitada foi dada à avaliação do papel da microbiota de pulgas, incluindo *C. felis*. De fato, somente dois estudos foram realizados durante a última década, apesar da importância desse ectoparasita para a saúde humana e animal.

A finalidade da investigação atual foi empregar uma colônia de laboratório de *C. felis* como um sistema modelo para examinar a composição da microbiota durante diferentes estágios de desenvolvimento e avaliar a possível existência de uma microbiota estável. Além disso, buscaram avaliar o nível de resistência antimicrobiana na microbiota, a frequência dos elementos CRISPR-Cas e desenvolver métodos para estudos futuros que permitiria a ampliação do escopo das investigações para incluir populações naturais de *C. felis*.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Local de Estudos e Coletas de Amostras

O estudo foi realizado nas dependências do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular (BIOMOL), Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). As pulgas da espécie *C. felis* utilizadas no estudo foram coletadas da colônia mantida em gatos do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária/UFRRJ, cedidas pela Prof<sup>a</sup> Thaís Ribeiro Correia Azevedo. As coletas foram realizadas em fevereiro de 2011, maio de 2014, agosto de 2015, e maio de 2018.

### 3.2. Processamento de Pulgas para Cultura Bacteriana

As amostras das pulgas (50 ovos, 10 larvas (F3), 10 fêmeas e 10 machos) foram coletadas em tubos com tampa de rosca (volume de 1,5 mL) e colocados em gelo por cinco minutos para reduzir a atividade. Em seguida, as amostras foram submetidas à lavagem em Solução salina tamponada de Fosfato (PBS), pH 7,4 para remoção de bactérias de contaminação ambiental/sujeira, seguindo-se o seguinte protocolo. Acrescentou-se 500 µL de PBS estéril nos tubos de tampa com rosca contendo as amostras, submetendo-os em seguida a uma centrifugação por cinco minutos com rotação de 16000 xg. Este procedimento foi repetido três vezes em cada tubo de amostra. Em seguida, as amostras, suspensas em 500 µL de PBS foram homogeneizadas utilizando-se 50 mg de esferas de vidro em um "mini-beadbeater" na velocidade máxima durante um minuto. Depois de homogeneizadas, as amostras foram diluídas em série em PBS (por um fator de 10) para produzir diluições variando de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup>.

### 3.3. Cultura Bacteriana

Alíquotas de 50 µL de cada diluição foram utilizadas para inocular placas em duplicata de Ágar nutriente (NA; Difco), que foram então incubadas a 30°C por 96 horas. As placas eram examinadas diariamente e representantes dos diferentes tipos de colônia foram selecionadas para preparar subculturas em novas placas de NA. Todas as culturas foram sub cultivadas três vezes em placas de NA para obter culturas puras. Culturas de estoque foram preparadas usando crescimento de 24h recuperado de placas de NA, sendo ressuspendido em caldo nutriente (Difco), suplementado com 17% de glicerol e os estoques com posterior armazenamento a -20°C.

### 3.4 Análises Moleculares

#### 3.4.1 Extração de DNA

A partir das colônias puras isoladas em placas de NA, as bactérias foram suspensas numa concentração de aproximadamente 10<sup>8</sup> células/mL em 500µL de água ultrapura (Ambion), em tubos de 1,5mL com tampa de rosca e aquecidas a 100°C por 10 min sendo depois centrifugadas (16.000 x g por dois minutos). Após a centrifugação, de 400µL os

sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de tampa de rosca e congelados a -20°C para análises posteriores.

### 3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação das bactérias

As bactérias foram identificadas por uma combinação de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de amplicons através do método de Sanger. O alvo para o ensaio de PCR foi um fragmento de aproximadamente 500 pares de bases (pb), referente às regiões hipervariáveis V1, V2 e V3 do gene (16S rDNA) que codifica o RNA ribossomal 16S eubacteriana (rRNA). As reações empregaram os iniciadores “primers” universais 16S500 “forward” (5'-TGG AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e 16S500 “reverse” (5'-TAC CGC GGC TGC TGG CAC-3'). A amplificação foi realizada utilizando um “mix” composto de uma alíquota de 2 µL de DNA molde, 1,25 µL de tampão de reação (10X concentrado), 200 µM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 pmol de cada primer, 0,5 U de platinum Taq “Hot-start” DNA polimerase e água ultra pura (Ambion) para obter um volume final de 12,5 µL. As condições de ciclagem para a amplificação foram realizadas com uma desnaturação inicial de 95°C durante cinco minutos (para ativar a polimerase), seguido de 30 ciclos a 95°C por 15 segundos, 56°C por 15 segundos e 72°C por 15 segundos e a extensão final foi realizada a 72 °C por cinco minutos.

### 3.4.3 PCR para detecção de sistemas CRISPR-Cas

A presença dos sistemas CRISPR em bactérias cocos Gram positivos foi examinada por PCR duplex empregando os iniciadores/“primers” e as condições de ciclagem relatados por Rossi et al. (2017). Especificamente, os iniciadores cas1IIF (5'-AAT ATA GAG GGC CAA GCG GC-3 ') / cas1IIR (5'-CGC ATG CAG CAA GTT AAT CAG C-3 ') foram usados para detectar um fragmento de 324 pb do gene *cas1* das Sistemas CRISPR do tipo II; e cas1IIIF (5'-TGT TAC TGC GAA GGA AAA TAG C-3 ') / cas1IIIR (5'-CGT CCA CGT TTA AAT TGT TTG CC-3 '), para detectar um fragmento de 471 pb do *cas1* gene dos sistemas CRISPR do tipo III. Os pares de iniciadores cas1IIF/R e cas1IIIF/R foram utilizados em uma reação duplex contendo uma alíquota de 2µL de DNA molde, 0,5 unidades da DNA polimerase GoTaq G2 (Promega, Estados Unidos) 2,5 mL de tampão enzimático 5X concentrado (concentração final de MgCl<sub>2</sub> = 1,5 mM), 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 mM de cada primer e água ultra pura (Ambion) para obter um volume final de 12,5 µL. Amplificação foi realizada com os seguintes parâmetros de ciclo: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida por 30 ciclos a 95°C por 30 s, 50°C por um minuto e 72°C por um minuto e 72°C por três minutos. A espécie *S. epidermidis* (RP62A) foi usada como controle positivo para o tipo III-CRISPR cas 1 e *S. epidermidis* L10 como controle positivo para o tipo II-CRISPR cas1 (ambas gentilmente cedidas por Amanda Vieira Araújo Alves do Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro) foram utilizados como controles positivos da reação.

Todas as PCRs realizadas neste estudo incorporaram dois controles negativos. O primeiro destes compreendia uma amostra em que o DNA de teste foi substituído pela mesma quantidade de água de biologia molecular, que foi adicionada ao tubo antes destes serem retirados do ambiente (livres de DNA) no qual as misturas para a reação da PCR foram preparadas e distribuídas para os tubos de reação individuais. Este controle, denominado água dentro, serviu para confirmar que os componentes da mistura da reação estavam livres de DNA contaminante. O segundo controle negativo denominado água fora, também foi composto de

um tubo pelo qual o DNA foi substituído por um volume equivalente de água de biologia molecular. No entanto, este tubo controle foi mantido no ambiente (potencialmente contaminado por DNA), durante o período em que os DNA's moldes foram adicionados aos tubos individuais contendo alíquotas da mistura principal para PCR. Este tubo era sempre o último tubo a ser preparado. Deste modo, o controle intitulado água fora, serviu para determinar se havia ocorrido contaminação durante o processo de adição de amostras de DNA teste nos tubos individuais de reação. Uma reação positiva em qualquer controle invalida todas e quaisquer reações positivas registradas com os DNA 's nas amostras teste.

A eletroforese de todos os ensaios acima descritos foi realizada em gel de agarose 1,5%, com tampão de corrida Tris-Acetato com EDTA (TAE) (1X= 40 mM Tris base; 40 mM ácido acético; 1 mM EDTA pH 8,0), a uma tensão elétrica constante de 5V/cm durante 60 minutos. Após a corrida, os fragmentos de DNA presentes no gel de agarose foram corados em Brometo de Etídeo (BE: 0,5µg/ml) durante 10 minutos e posteriormente submersos em água destilada por 30 minutos para remoção do excesso de BE. Às amostras aplicadas no gel foram adicionados 2,5µL de tampão de carregamento de amostra.

A observação e fotografia foram feitas digitalmente sob iluminação ultravioleta em documentador e as imagens resultantes foram analisadas utilizando o software gel analyzer. Em todas as PCR's o peso molecular dos amplicons foi confirmado através da comparação com o marcador de peso molecular (100 pb GeneRuler Ladder DNA, produto # SM024, Thermo Scientific).

### **3.5 Sequenciamento do DNA**

Os produtos das PCR foram purificados com Exo-SAP-IT (*GE Healthcare Life Sciences* Code number US 77702) e submetidos ao sequenciamento através do “Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit” (*Applied Biosystems* Catalog number: 4337455). Os “amplicons” foram sequenciados em ambas as direções utilizando os mesmos iniciadores empregados na PCR, e a reação de “cycle-sequencing” foi realizada no termociclador modelo 9700 (*Applied Biosystems*), utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial à 96°C durante 60 seg, seguidos de 30 ciclos de 10 seg a 96°C, 5 segundos à 50°C para o anelamento quatro minutos, à 60°C para a extensão. Após a reação, a remoção dos nucleotídeos não incorporados foi feita através de precipitação com EDTA/etanol seguido por ressuspensão em 10 µL de formamida (*Applied Biosystems*). Todo o sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador de DNA automático (modelo 3500 *Applied Biosystems*), localizado no Departamento de Parasitologia Animal, UFRRJ. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa Sequencher® (Versão 5.3; *Gene codes Corporation*), e as sequências obtidas foram identificadas usando o programa BlastN, junto ao banco de dados GenBank.

### **3.6 Avaliação de Resistência Antimicrobiana**

#### **3.6.1 Preparação de culturas iniciais**

Um total de 155 culturas bacterianas, representando as culturas-estoque produzidas a partir de quatro pontos de coleta diferentes (2011- 2018), foram utilizadas para inocular placas de NA, com incubação a 30°C por 48 horas. Colônias únicas e bem isoladas foram inoculadas em 3 mL de caldo nutritivo com incubação a 30°C por 18 h. Posteriormente, as culturas de caldo foram armazenadas a 4°C. Esses caldos serviram como culturas iniciais para uso na



avaliação da resistência antimicrobiana aos sete compostos seguintes; ampicilina, cloranfenicol, cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>), estreptomicina, nitrofurantoína, oxitetraciclina e rifampicina.

### **3.6.2 Preparação de soluções estoque de agentes antimicrobianos**

Os antibióticos foram preparados como soluções estoque em concentrações finais de 100 mg / mL em PBS (ampicilina, estreptomicina e HgCl<sub>2</sub>) ou em etanol a 70% (cloranfenicol). No caso da oxitetraciclina, a solução estoque foi preparada a uma concentração de 50 mg / mL em hidróxido de sódio 0,1 M (NaOH). Todas as soluções foram esterilizadas por filtração por membrana (filtro de membrana 0,22 µM, Millipore). As soluções estoques de nitrofurantonina e rifampicina foram preparadas em N, N-dimetil formamida estéril a uma concentração final de 50 mg / mL. Todas as soluções de estoque foram armazenadas a -20°C em alíquotas de 1 ml, para evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento.

### **3.6.3 Culturas controladas**

Duas cepas bacterianas, obtidas de dentro da coleção de culturas bacterianas do laboratório BIOMOL, foram empregadas como controles internos para garantir a reprodutibilidade entre os ensaios. As culturas utilizadas foram *Escherichia coli* DH5α (código R2 na coleção do BIOMOL) e *Pseudomonas aeruginosa* (código R16). As culturas iniciais desses organismos foram preparadas como descrito acima e armazenadas a 4°C. Os perfis de resistência (concentração inibitória mínima - CIM) das cepas de controle foram determinados usando um método padronizado de microdiluição (em caldo) realizado em placas de 96 poços (Sarstedt). A concentração inicial foi de 100 µg/mL (preparada em caldo nutriente). Esta solução foi diluída em série (por um fator de dois), usando uma pipeta multicanal para produzir poços contendo concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3.125 e 1.625 µg/mL (o volume final em cada poço foi de 150 µL). Cada placa também continha poços com caldo de nutrientes (controles livres de antibióticos). Esses poços serviram como controle positivo de inoculação; em que o crescimento bacteriano (turbidez) nesses poços foi comparado ao crescimento registrado na presença das diferentes concentrações de cada composto antimicrobiano. As culturas utilizadas para a determinação da CIM foram preparadas como se segue. As placas de NA foram inoculadas com crescimento das culturas iniciadoras (mantidas a 4°C) com incubação a 30°C por 48 horas para produzir colônias únicas. As placas (96 poços), contendo 150 µl de caldo nutritivo / poço, foram inoculadas com crescimento de uma única colônia e as placas foram incubadas por três horas para garantir que as culturas crescessem ativamente. A inoculação das placas contendo as soluções antimicrobianas foi realizada utilizando uma pipeta multicanal. As ponteiros da pipeta foram imersas nas culturas bacterianas e foram imediatamente imersas nos poços contendo as soluções antimicrobianas. As placas foram incubadas a 30°C por 72 horas, com inspeção diária. O nível de crescimento registrado nos poços de controle positivo (sem antibiótico) foi comparado ao obtido nos poços contendo as diferentes concentrações de cada antimicrobiano e a última concentração demonstrada para inibir o crescimento (turbidez) foi considerada a CIM.

### **3.6.4 Determinação de perfis de resistência antimicrobiana da bactéria isolada de pulgas**

Com base no grande número de isolados a serem examinados (137 isolados) foi tomada a decisão de usar uma abordagem de linha de corte ("cut-off") para determinar resistência ou suscetibilidade. Essa decisão foi motivada principalmente por razões financeiras. Assim, todos

os agentes antimicrobianos foram avaliados inicialmente a uma concentração de 10 µg/mL. O procedimento usado para preparar as culturas e inocular os caldos foi como relatado acima para as culturas de controle. Com base nessas análises iniciais, as culturas foram classificadas como resistentes (crescimento a 10 µg/mL) ou suscetíveis (sem crescimento a 10 µg/mL). Todas as culturas foram examinadas pelo menos duas vezes e cada experimento incluiu as cepas de controle como controles internos de qualidade para a variação intra-ensaio. As estirpes consideradas resistentes para os diferentes antimicrobianos foram avaliadas posteriormente para determinar a sua capacidade de crescer na presença de concentrações mais elevadas (até 100 µg/mL) dos compostos aos quais foram inicialmente considerados resistentes. Para conseguir isso, concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL foram avaliadas usando os mesmos métodos descritos acima.

### **3.7 Análise Eletroforética em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) de Proteínas Totais**

#### **3.7.1 Preparação do crescimento bacteriano**

A técnica de desnaturação da eletroforese em gel de poliacrilamida em (SDS-PAGE) foi utilizada para examinar o perfil de bandas das proteínas celulares totais das diferentes bactérias cocos Gram-positivas recuperadas das pulgas. O crescimento bacteriano para SDS-PAGE foi produzido em placas de NA com incubação a 30°C por 48h. Todo o crescimento foi coletado das placas e ressuspenso em 5mL de PBS para produzir suspensões homogêneas. As suspensões resultantes foram divididas em alíquotas de 1 mL em microtubos com tampa de rosca (volume de 1,5 mL) e as células foram coletadas por centrifugação 16000 X g durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e os “pellets” foram congelados a -20°C.

#### **3.7.2 Preparação das amostras e eletroforese**

Os “pellets” foram retirados do freezer e homogeneizados em 25 µl de água ultrapura. Em seguida 25 µL de tampão da amostra (glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10%, SDS 4%, Tris-HCl pH 6,8 (0,125 M), e azul de bromofenol 0,2%), foram adicionados a cada tubo e misturadas (por agitação leve para evitar a produção de um excesso de espuma). Os tubos foram fervidos por 10 minutos, centrifugados rapidamente e 20 µL da mistura foram aplicados no gel de “stacking” (4% poliacrilamida). Os géis de resolução (12.5% poliacrilamida), com 0,75 mm de espessura foram confeccionados e submetidos a corrida (120 V durante 105 minutos) em tampão Tris-glicina (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0.1% SDS, pH 8.3), usando um sistema mini-Protean 3 (BIO-RAD). Os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie R-250 0,25% (p/v) dissolvido em 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético durante 45 minutos.

A marcação em excesso (“background”) foi removida por descoloração com uma solução de 20% (v/v) de metanol e 5% (v/v) de ácido acético por 30min. Imagens dos géis foram capturadas digitalmente por escaneamento. A metodologia empregada neste estudo foi qualitativa em vez de quantitativa (nenhum marcador foi incluído nos géis para determinar os pesos moleculares das bandas). No entanto, para avaliar a variabilidade intra-experimental, todos os géis incluíram uma preparação padronizada de proteínas celulares totais produzidas a partir de uma cultura de 24 horas de *E. coli* DH5α.

## RESULTADOS

### 4.1 Identificação dos Isolados Através do Sequenciamento do Gene 16S rDNA

Foram isoladas e sequenciadas através do gene 16S rDNA um total de 155 bactérias cultiváveis pertencentes à microbiota das pulgas *C. felis* coletadas nos diferentes anos nas diferentes fases da vida (ovos, larvas e adultos - machos e fêmeas). Verificaram trinta isolados de 2011; 39 isolados de 2014; 36 isolados de 2015 e 50 isolados de 2018, porém, dentre as 155 bactérias, 11 isolados não foram identificados por sequenciamento e dois foram excluídos das análises, devido contaminação das amostras, portanto, foram identificadas através do sequenciamento um total de 142 bactérias.

Das 142 bactérias identificadas, foram encontrados quatro Filos Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Bacteroidetes, sendo Firmicutes o de maior ocorrência. Dentre os Filos foram identificados 21 gêneros diferentes, *Actinobacterium*, *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Cytophaga*, *Dermacoccus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Exiguobacterium*, *Jeotgalicoccus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Naxibacter*, *Sinomonas*, *Staphylococcus*, e *Stenotrophomonas*, além de 38 espécies (Tabela 1).

Do Filo Firmicutes, a maioria dos isolados tiveram sua identidade de sequência mais significativa atingida pelo gênero *Staphylococcus* representado por 70,4% da quantidade total de bactérias identificadas. Desses 70,4%, a espécie predominante entre todas as fases e anos foi *S. nepalensis* (23,2%), seguida por *S. saprophyticus* (15,4%), *S. lentus* (14,7%) e *S. cohnii* (7,7%).

**Tabela 1.** Bactérias cultiváveis pertencentes à microbiota das pulgas *Ctenocephalides felis* coletadas em diferentes anos identificadas por sequenciamento do gene 16S rDNA.

Espécies	2011	2014	2015	2018	Total
<i>Actinobacteria</i> sp.				2	2
<i>Agrococcus terrus</i>		1			1
<i>Arthrobacter creatinoliticus</i>	1				1
<i>Arthrobacter oryzae</i>	3				3
<i>Bacillus koreensis</i>	1				1
<i>Bacillus megaterium</i>	1				1
<i>Bacillus</i> sp.			1		1
<i>Brachybacterium</i> sp.				1	1
<i>Brevibacterium jeotgali</i>		1			1
<i>Brevibacterium</i> sp.			1		1
<i>Corynebacterium</i> sp.		1		1	2
<i>Curtobacterium</i> sp.			1		1

<i>Cytophaga</i> sp.	1				1
<i>Dermacoccus</i> sp.		1	2		3
<i>Enterobacter cloacae</i>		1			1
<i>Enterobacter ludwigii</i>		1			1
<i>Enterococcus faecalis</i>	2		1		3
<i>Enterococcus hirae</i>	1				1
<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	1				1
<i>Jeotgalicoccus</i> sp.	1	3	1		5
<i>Kocuria korensii</i>			1		1
<i>Microbacterium</i> sp.		2			2
<i>Micrococcus luteus</i>		2			2
<i>Naxibacter</i> sp.	1				1
<i>Sinomonas atrocyanae</i>	3				3
<i>Staphylococcus cohnii</i>	2		3	5	10
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		1	1		2
<i>Staphylococcus equorum</i>	1				
<i>Staphylococcus kloosii</i>				1	1
<i>Staphylococcus lentus</i> genotype 1	5	4	6		15
<i>Staphylococcus lentus</i> genotype 2	5		1		6
<i>Staphylococcus nepalensis</i>	9	14	4	6	33
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>				2	2
<i>Staphylococcus pseudolugduensis</i>		1			1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	7	2	2	11	22
<i>Staphylococcus sciuri</i>				1	1
<i>Staphylococcus xylosus</i>			1	2	3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>				1	1
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>36</b>	<b>28</b>	<b>48</b>	<b>142</b>

As fases de ovos e larvas apresentaram uma maior variedade de espécies de bactérias comparadas às fases adultas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Bactérias cultiváveis das pulgas *Ctenocephalides felis* coletadas em diferentes anos (2011-2018) e fases (Ovos, Larvas, Adultos- Machos e Fêmeas, identificadas por sequenciamento do gene 16S rDNA.

Fases	Gênero	Ano				Total
		2011	2014	2015	2018	
<b>Ovos</b>	<i>Brachybacterium</i>				1	1
	<i>Brevibacterium</i>		1			1
	<i>Corynebacterium</i>		1			1
	<i>Micrococcus</i>			1		1
	<i>Naxibacter</i>	1				1
	<i>Cytophaga</i>		1			1
	<i>Actinobacterium</i>				2	2
	<i>Bacillus</i>	2				2
	<i>Dermacoccus</i>			1	1	2
	<i>Enterococcus</i>	1			1	2
	<i>Jeotagaliococcus</i>		1		1	2
	<i>Sinomonas</i>	3				3
	<i>Arthrobacter</i>	4				4
	<i>Staphylococcus</i>	2	7	3	5	17
	<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>40</b>
<b>Larvas</b>	<i>Agrococcus</i>		1			1
	<i>Brevibacterium</i>			1		1
	<i>Corynebacterium</i>				1	1
	<i>Curtobacterium</i>			1		1
	<i>Enterococcus</i>		1			1
	<i>Exiguobacterium</i>	1				1
	<i>Micrococcus</i>			1		1
	<i>Enterobacter</i>			2		2
	<i>Jeotagaliococcus</i>			3		3
	<i>Staphylococcus</i>	7	8	6	9	30
		<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	<b>10</b>
<b>Fêmeas</b>	<i>Dermacoccus</i>				1	1
	<i>Enterococcus</i>		1			1
	<i>S. maltophilia</i>				1	1
	<i>Staphylococcus</i>	6	7	4	12	29
	<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>32</b>
<b>Machos</b>	<i>Bacillus</i>			1		1
	<i>Kocuria</i>				1	1
	<i>Microbacterium</i>			2		2

<i>Staphylococcus</i>	3	7	2	12	24
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>28</b>

#### 4.2 Resistência Microbiana

Na tabela 3 foi observado o número de bactérias (unidades formadoras de colônias / mL) nos diferentes anos e estágios do desenvolvimento das pulgas.

**Tabela 3.** Número de bactérias (unidades formadoras de colônias / mL) recuperadas dos diferentes estágios de desenvolvimento das pulgas processadas entre 2011 e 2018.

Estágios	Anos de coletas			
	2011	2014	2015	2018
	UFC/mL			
Ovos	$2,0 \times 10^4$	$3,6 \times 10^5$	$8,8 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$
Larvas	$7,8 \times 10^5$	$2,6 \times 10^6$	$4,4 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$
Fêmeas	$3,6 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$
Machos	$2,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$

UFC=Unidades formadoras de colônias. OBS.: Machos e Fêmeas adultos.

No ano de 2011, um total de  $2 \times 10^4$  colônias por mL de homogenato foram recuperados dos ovos (Tabela 4). Um total de 13 isolados que demonstraram morfologias distintas de colônias foram selecionados e utilizados para produzir culturas puras. Foram identificadas 8 espécies bacterianas (com base no sequenciamento de 16S rDNA), entre os 13 isolados. A maioria das espécies (7/8) foi Gram-positiva. A única bactéria Gram-negativa foi *Naxibacter*, um betaproteobacteria, considerado um isolado multirresistente, por apresentar resistência a três antimicrobianos (ampicilina, nitrofurantoína e estreptomicina, todos em concentração de 25 µg/mL).

**Tabela 4.** Resistência bacteriana das bactérias cultiváveis pertencentes à microbiota das pulgas *Ctenocephalides felis* em diferentes fases (Ovos, Larvas, Adultos - Machos e Fêmeas) coletadas em 2011.

<b>Amostra</b>	<b>Identificação (16S rDNA)</b>	<b>Perfil de resistência</b>
<b>Ovos</b>		
O1	<i>Arthrobacter oryzae</i>	
O2	<i>Arthrobacter oryzae</i>	N10
O3	<i>Arthrobacter oryzae</i>	A10
O4	<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>	N50
O5	<i>Sinomonas atrocyanae</i>	A25 / N25
O6	<i>Staphylococcus cohnii</i>	
O7	<i>Bacillus megaterium</i>	
O8	<i>Enterococcus hirae</i>	
O10	<i>Staphylococcus cohnii</i>	
O11	<i>Naxibacter</i> sp.	A25/ N25/S25
O12	<i>Sinomonas atrocyanae</i>	
O13	<i>Sinomonas atrocyanae</i>	N50
O15	<i>Bacillus koreensis</i>	N10
<b>Larvas</b>		
LA1	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	
LA2	<i>Staphylococcus aprophyticus</i>	N10
LB	<i>Staphylococcus aprophyticus</i>	N10
LC	<i>Staphylococcus aprophyticus</i>	N10
LD	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	C10
LE	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	C25
LF	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	C10
LGW	<i>Staphylococcus aprophyticus</i>	N10
<b>Fêmeas</b>		
F1	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	
F2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
F3	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	
F4	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	
F5	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	C25/ Ox25
F6	<i>Staphylococcus aprophyticus</i>	N10
<b>Machos</b>		
M1	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	Ox25

M2	<i>Staphylococcus aprophyticus</i>	
M3	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	A25/C25/N10/S25/O x25

A=Ampicilina; Cloranfenicol; N=nitrofurantoína; Ox=oxitetraciclina; S=Estreptomicina.  
OBS.: Machos e Fêmeas adultos.

A maioria (9/12) dos isolados Gram-positivos foram bastões representados por membros dos Filos Actinobacteria (*A. oryzae* (3 isolados); *A. creatinolyticus* (1 isolado); *S. atrocyanae* (3 isolados) e Firmicutes (*Bacillus megaterium* (1 isolado); *Bacillus koreensis* (1 isolado). Os outros três organismos foram cocos Gram-positivos e membros do Filo Firmicutes (*S. cohnii*) (2 isolados) e *Enterococcus harae* (1 isolado).

Os dados de resistência a antibióticos dos isolados dos ovos de pulgas de 2011 (Tabela 4), demonstraram que todos os cocos foram sensíveis a cada um dos sete antimicrobianos examinados, assim como o isolado de *Bacillus megaterium* (07). O isolado de *Bacillus koreensis* (O15) mostrou resistência à nitrofurantoína (CIM 12,5 µg/mL). Os perfis de resistência a antibióticos dos membros da Actinobacteria foram mais variados. O isolado de *A. creatinolyticus* (O4) foi resistente a nitrofurantoína (CIM 100 µg/mL), os isolados de *A. oryzae* (O1) e *S. atrocyanae* (O12) foram sensíveis a todos os sete antimicrobianos. O isolado *A. oryzae* (O2) foi resistente ao nitrofurantoína (CIM 12,5 µg/mL), enquanto *A. oryzae* (O3) foi resistente a ampicilina (CIM 12,5 µg/mL). Os outros dois isolados de *S. atrocyanae* (O5 e O13) também demonstraram perfis de resistência distintos. O isolado (O5) foi resistente a ampicilina e nitrofurantoína, com valores de CIM de 50 µg/mL para ambos os antimicrobianos. Por último, o isolado (O13) foi resistente apenas a nitrofurantoína, porém o nível de resistência foi maior CIM de 100 µg/ml. Um total de  $7,8 \times 10^5$  colônias por mL de homogenato foram recuperados das larvas. Um total de 8 isolados que demonstraram morfologias distintas de colônias foram selecionados e utilizados para produzir culturas puras. Foram identificadas três espécies bacterianas, (com base no sequenciamento de 16S rDNA), entre os 8 isolados. Todos foram Gram-positivos.

A maioria (7/8) dos isolados foi de cocos representados por membros do Filo Firmicutes (*S. saprophyticus* (quatro isolados); *S. nepalensis* (três isolados). O outro organismo foi um bastão Gram positivo membro do Filo Firmicutes (*Exiguobacterium acetylicum*; 1 isolado).

Os dados de resistência a antibióticos dos isolados de larvas 2011 (Tabela 4), demonstrou que todas as bactérias foram resistentes a pelo menos um dos sete antimicrobianos examinados, exceto *Exiguobacterium* (LA1) que foi sensível a cada um dos antimicrobianos testados. Ambos os isolados de *S. saprophyticus* (LA2, LB, LC), apresentaram resistência à nitrofuranoína na concentração de 12,5 µg/mL. Os isolados de *S. nepalensis* (LD, LE e LF), foram resistentes ao cloranfenicol (CIM de 12,5 µg/mL), porém, o nível de resistência de *S. nepalensis* (LE) foi maior (CIM 50 µg/mL).

Um total  $3,6 \times 10^5$  colônias por mL de homogenato foram recuperados das fêmeas. Um total de 6 isolados que demonstraram morfologias distintas de colônias foram selecionados e utilizados para produzir culturas puras. Foram identificadas duas espécies bacterianas, (com base no sequenciamento de 16S rDNA), entre os seis isolados. Todas as espécies foram classificadas como cocos Gram-positivos pertencentes ao Filo Firmicutes (*S. nepalensis* (4 isolados); *S. saprophyticus* (2 isolados).

Os dados de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos das pulgas fêmeas de 2011 (Tabela 4), demonstraram perfis de resistência variados entre as bactérias da mesma espécie, *S. nepalensis* (F5) apresentou resistência ao cloranfenicol (CIM 50 µg/mL) e a



oxitetraciclina (CIM 50 µg/mL), porém os demais isolados de *S. nepalensis* (F1, F3 F4), foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. O mesmo ocorreu para os isolados de *S. saprophyticus* (F2 e F6), enquanto (F2) foi sensível a cada um dos antibióticos testados, o (F6) apresentou resistência à nitrofurantoína (CIM 12,5 µg/mL).

Um total de  $2,2 \times 10^5$  colônias por mL de homogenato foram recuperados de pulgas machos (Tabela 3). Um total de 3 isolados que demonstraram morfologias distintas de colônias foram selecionados e utilizados para produzir culturas puras. Foram identificadas 2 espécies bacterianas, (com base no sequenciamento de 16S rDNA), entre os três isolados. Todos os isolados foram classificados como cocos Gram-positivos membros do Filo Firmicutes (*S. nepalensis* (2 isolados); *S. saprophyticus* (1 isolado)).

Os dados de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos das pulgas machos de 2011 (Tabela 4), demonstraram que *S. saprophyticus* (M2) foi sensível a todos os antimicrobianos utilizados. Os isolados de *S. nepalensis* apresentaram perfis de resistência distintos, o isolado de *S. nepalensis* (M1) foi resistente apenas a oxitetraciclina (CIM 50 µg/mL), enquanto que o *S. nepalensis* (M3) foi considerado um organismo multirresistente, por apresentar resistência a cinco antimicrobianos (ampicilina, cloranfanfenicol, oxitetraciclina e estreptomicina, todos em concentrações de 50 µg/mL e nitrofurantoína na concentração de 12,5 µg/mL).

No ano de 2014, representados na tabela abaixo, (Tabela 5), um total  $3,6 \times 10^5$  colônias por mL de homogenato foram recuperados dos ovos. Um total de 11 isolados demonstrou morfologias distintas de colônias, foram selecionados e utilizados para produzir culturas puras. Foram identificadas 8 espécies bacterianas, (com base no sequenciamento de 16S rDNA), entre os 11 isolados. A maioria das espécies (7/8) foram Gram-positivas. A única bactéria Gram-negativa foi o *Cytophagae* sp. membro do Filo Bacteroidetes, do qual não foi realizado o teste antimicrobiano, devido ao fato dessa cepa não ter crescido na placa no dia da realização do teste. A maioria (8/11) dos isolados Gram-positivos foram cocos representadas por membros dos Filos Firmicutes (*S. lentus* (dois isolados); *S. nepalensis* (três isolados), *S. equorum* (um isolado); *S. pseudolugnensis* (um isolado); *Jeotagaliococcus* sp. (um isolado)). Os outros três organismos eram em forma de bastão e membros do Filo Actinobacteria (*Brevibacterium jeotgali* (um isolado); *Corynebacterium* sp. (um isolado) e do Filo Bacteroidetes (*Cytophaga* sp.; um isolado).

Os dados de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos dos ovos das pulgas de 2014, demonstraram que *Jeotagaliococcus* sp. (O10) apresentou resistência a oxitetraciclina (CIM acima de 100 µg/mL). O isolado de *S. pseudolugnensis* (O6) também apresentou resistência a oxitetraciclina em um nível de concentração menor (CIM 12,5 µg/mL). Os isolados de *S. lentus* (O1, O7) apresentaram perfis distintos, *S. lentus* (O1) também foi resistente a oxitetraciclina (CIM 50 µg/mL), enquanto *S. lentus* (O7) foi sensível a cada um dos antimicrobianos testados. O mesmo ocorreu com os isolados de *S. nepalensis* (O2 e O8), ambos foram resistentes a nitrofurantoína (CIM 12,5 µg/mL), porém o *S. nepalensis* (O8) foi resistente também a oxitetraciclina (CIM 50 µg/mL), enquanto que o *S. nepalensis* (O11) foi sensível a cada um dos antimicrobianos testados.

**Tabela 5.** Resistência bacteriana das bactérias cultiváveis pertencentes à microbiota das pulgas *Ctenocephalides felis* em diferentes fases (Ovos, Larvas, adultos - Machos e Fêmeas) coletadas em 2014.

<b>Amostra</b>	<b>Código</b>	<b>Identificação (16S rDNA)</b>	<b>Perfil de resistência</b>
<b>Ovos</b>	O1	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype 2	Ox 12,5
	O2	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	N10
	O3	<i>Staphylococcus equorum</i>	
	O4	<i>Brevibacterium jeotgali</i>	
	O5	<i>Cytophaga</i>	X
	O6	<i>Staphylococcus pseudolugduensis</i>	Ox10
	O7	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype 1	
	O8	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	N10/O25
	O9	<i>Corynebacterium</i> sp	
	O10	<i>Jeotgalicoccus</i> sp.	Ox100
	O11	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	
<b>Larvas</b>	L1	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype 2	A100/O12,5
	L2	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype 1	
	L3	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	C25
	L4	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	
	L5	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype 2	A10/O25
	L6	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
	L7	<i>Enterococcus faecalis</i>	
	L8	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
	L9	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype 1	
	L10	<i>Agrococcus terrus</i>	
<b>Fêmeas</b>	F1	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype 2	Ox25
	F2	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	
	F3	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	N10
	F4	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	Ox25
	F5	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype 1	
	F6	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	X
	F8A	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype 2	Ox25
	F8B	<i>Enterococcus faecalis</i>	N10
<b>Machos</b>	M1	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	
	M2	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	Ox10
	M3	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	

M4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ox25
M7	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	X
M8	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	Ox50
M9	<i>Staphylococcus lentus genotype 1</i>	

A=Ampicilina; Cloranfenicol; N=Nitrofurantoína; Ox=Oxitetraciclina; X=Não foi testada contra os antimicrobianos. **OBS.:** Machos e fêmeas adultos.

Um total de  $2,6 \times 10^6$  colônias por mL de homogenato foram recuperados das larvas. Foi selecionado um total de 10 isolados que demonstraram morfologias distintas de colônias para produzir culturas puras. Cinco espécies bacterianas foram identificadas (com base no sequenciamento de 16S rDNA), entre os 10 isolados. Todas as bactérias foram cocos Gram-positivos representados por membros dos Filos Actinobacteria (*Agrococcus terrus*; 1 isolado) e Firmicutes (*S. lentus* (4 isolados); *S. nepalensis* (2 isolados); *S. saprophyticus* (2 isolados) e *Enterococcus faecalis* (1 isolado)

Os dados de resistência a antibióticos das bactérias das larvas coletadas em 2014 (Tabela 5), demonstraram que os isolados de *S. lentus* (L1, L2, L5, L9) apresentaram resistência distintas, enquanto L1 foi resistente a ampicilina (CIM maior que 100 µg/mL) e a oxitetraciclina (CIM 25 µg/mL) o isolado de *S. lentus* (L5) apresentou resistência aos mesmos antibióticos, no entanto em concentrações distintas (CIM 12,5 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente), já os isolados *S. lentus* (L2 e L9) foram sensíveis a todos os antibióticos testados. Assim como ocorreu com os isolados de *S. nepalensis* (L3 e L4), onde o (L3) foi resistente ao cloranfenicol (CIM 50 µg/mL) e o *S. nepalensis* (L4) apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. Os isolados *S. saprophyticus* (L6 e L8) e *Agrococcus terrus* (L10) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados.

Em relação às pulgas fêmeas de 2014, um total de  $5,2 \times 10^5$  colônias por mL de homogenato foram recuperados, um total de 9 isolados que demonstraram morfologias distintas de colônias foram selecionados e utilizados para produzir culturas puras. Foram identificadas 3 espécies bacterianas, entre os 9 isolados. Dentre eles, uma espécie não foi identificada, ficando com um total de 8 isolados identificados, (com base no sequenciamento de 16S rDNA). Todos os isolados foram cocos Gram-positivos membros do Filo Firmicutes (*S. lentus* (3 isolados); *S. nepalensis* (4 isolados); *Enterococcus faecalis* (1 isolado).

Em relação aos dados de resistência aos antibióticos das bactérias isoladas das pulgas fêmeas coletadas em 2014 (Tabela 5), foi observado que *Enterococcus faecalis* (F8B) apresentou resistência à nitrofurantoína (CIM 12,5 µg/mL). Os isolados *S. lentus* (F1, F8A, F5) apresentaram resistência distinta, ambos os *S. lentus* (F1, F8A) foram resistentes à oxitetraciclina (CIM 50 µg/mL), porém *S. lentus* (F5) foi sensível a todos os antimicrobianos testados. Assim como ocorreu com os isolados de *S. nepalensis*, enquanto (F2) foi sensível a todos os antimicrobianos testados, os isolados *S. nepalensis* (F3, F4) apresentaram resistência a diferentes antimicrobianos, F3 a nitrofurantoína (CIM 12,5 µg/mL) e o F4 a oxitetraciclina (CIM 50 µg/mL), o isolado *S. nepalensis* (F6) não foi testado, pois essa cepa não cresceu na placa no dia da realização do teste antimicrobiano.

Um total de  $3,8 \times 10^5$  colônias por mL de homogenato foram recuperados dos machos. Um total de nove isolados que demonstraram morfologias distintas de colônias foram selecionados e utilizados para produzir culturas puras. Foram identificadas três espécies bacterianas, entre os nove isolados. Dentre os nove isolados, duas espécies não foram

identificadas, ficando com um total de 7 isolados identificados, (com base no sequenciamento de 16S rDNA).

Todas os sete isolados foram classificados como cocos Gram-positivos pertencentes ao Filo Firmicutes, sendo *S. nepalensis* (5 isolados), *S. lentus* (1 isolado) e *S. epidermidis* (1 isolado).

Os dados de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos das pulgas machos coletados em 2014 (Tabela 5), demonstraram que o isolado de *S. epidermidis* (M4) apresentou resistência a oxitetraciclina (CIM 50 g/mL), os isolados de *S. nepalensis* apresentaram resistências distintas, enquanto (M1, M3) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, os isolados (M2, M8) foram resistente a oxitetraciclina, porém em concentrações diferentes (CIM 12,5 e 100 µg/mL respectivamente). O *S. nepalensis* (M7) não foi testado, pois essa cepa não cresceu na placa no dia da realização do teste antimicrobiano.

**Tabela 6.** Resistência bacteriana das bactérias cultiváveis pertencentes à microbiota das pulgas *Ctenocephalides felis* em diferentes fases (Ovo, Larvas, Machos e Fêmeas) coletadas em 2015.

<b>Amostra</b>	<b>Código</b>	<b>Identificação (16S rDNA)</b>	<b>Perfil de resistência</b>
<b>Ovos</b>	O1	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	N10/Ox25
	O2	<i>Micrococcus luteus</i>	A10/Ox25
	O4	<i>Dermacoccus</i> sp.	N50
	O5A	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	
	O5B	<i>Staphylococcus lentus genotype 1</i>	N10/Ox25
<b>Larvas</b>	L1	<i>Staphylococcus lentus genotype 1</i>	A25/N10
	L2	<i>Jeotgalicoccus</i> sp.	Ox50
	L3A	<i>Jeotgalicoccus</i> sp.	Ox50
	L3B	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Ox50
	L4	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	N10/Ox50
	L5	<i>Micrococcus luteus</i>	Ox10
	L6	<i>Curtobacterium</i> sp.	
	L7	<i>Enterobacterium cloacae</i>	A50/O50
	L8	<i>Enterobacteria ludwiggi</i>	00/C25/N50/S25/Ox50
	L9	<i>Staphylococcus lentus genotype1</i>	A50/N50
	L10	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Ox100
	L11	<i>Brevibacterium</i> sp.	Ox10
	L12	<i>Jeotgalicoccus</i> sp.	Ox10
	L13	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	Ox25/N10
	F1	<i>Staphylococcus cohnii</i>	A25

	F4	<i>Staphylococcus cohnii</i>	N10/O10
	F5	<i>Staphylococcus lentus genotype1</i>	Ox25
	F6	<i>Staphylococcus cohnii</i>	
<b>Machos</b>	M1	<i>Microbacterium</i> sp.	
	MIB	<i>Bacillus</i> sp.	
	M3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X
	M4	<i>Microbacterium</i> sp.	A12,5
	M7	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	Ox10

A=Ampicilina; C=Cloranfenicol; N=Nitrofurantoína; Ox=Oxitetraciclina; S=Estreptomicina;

X=Não foi testada contra os antimicrobianos. **OBS.:** Machos adultos.

No ano de 2015, um total de  $8,8 \times 10^4$  colônias por mL de homogenato foram recuperados dos ovos. Um total de sete isolados demonstrou morfologias distintas de colônias foram selecionados e utilizados para produzir culturas puras. Foram identificadas quatro espécies bacterianas, entre sete isoladas. Dentre estas isoladas, duas espécies não foram identificadas por sequenciamento, ficando com um total de cinco isolados identificados, (com base no sequenciamento de 16S rDNA). Todos os cinco isolados foram classificados como cocos Gram-positivos, membros dos Filos Firmicutes (*S. nepalensis* (2 isolados); *S. lentus* (1 isolado) e Actinobacteria (*Micrococcus luteus* (1 isolado); *Dermacoccus* sp. (1 isolado). (Tabela 6).

Os dados de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos de ovos de pulgas de 2015 (Tabela 6), demonstraram que somente um isolado foi sensível a todos os antimicrobianos, o isolado *S. nepalensis* (O5A), entretanto, o outro isolado da espécie *S. nepalensis* (O1) apresentou resistência à nitrofurantoína (CIM 12,5 µg/mL) e a oxitetraciclina (CIM 50 µg/mL), o isolado *S. lentus* (O5B) apresentou o mesmo perfil de resistência que O1. O *Dermacoccus* sp. (O4) foi resistente a nitrofurantoína (CIM 100 µg/mL) e o isolado *Micrococcus luteus* (O2) apresentou resistência a ampicilina (CIM 12,5 µg/mL) e oxitetraciclina (CIM 50 µg/mL).

Um total de  $4,4 \times 10^5$  colônias por mL de homogenato foram recuperados das larvas. Um total de 14 isolados demonstrou morfologias distintas de colônias foram selecionados e utilizados para produzir culturas puras. Foram identificadas 10 espécies bacterianas, entre os 14 isolados.

A maioria das espécies (8/10) foi classificada como Gram-positivas. Entre os isolados identificados (2/10) foram Gram-negativos pertencentes ao Filo das Proteobacterias, o isolado *Enterobacter cloacae* (L7) apresentou resistência a ampicilina e oxitetraciclina (CIM 100 µg/mL) e *Enterobacter ludwigii* (L8) foi considerado um organismo multirresistente, por apresentar resistência a mais de três antimicrobianos (ampicilina com uma CIM acima de 100 µg/mL, cloranfenicol e estreptomicina (CIM 50 µg/mL), nitrofurantoína e oxitetraciclina CIM 100 µg/mL).

A maioria das bactérias isoladas (10/14) foram classificadas como cocos Gram-positivas representadas por membros dos Filos Actinobacteria *Micrococcus luteus* (1 isolado) e Firmicutes (*S. lentus* (2 isolados); *Jeotagalioccus* sp. (3 isolados); *S. saprophyticus* (2 isolados); *S. xylosus* (1 isolado); *S. nepalensis* (1 isolado). Dois isolados Gram-positivos foram bastões (2/14) e membros do Filo Actinobacteria (*Curtobacterium* sp. (1 isolado); *Brevibacterium* sp.

(1 isolado). E (2/14) dos isolados foram bastões Gram-negativos pertencentes ao Filo das Proteobacterias, (*Enterobacter cloacae* (1 isolado); *Enterobacter ludwigii* (1 isolado)).

Os dados de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos das larvas de 2015 (Tabela 6), demonstraram que todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano testado, exceto o *Curtobacterium* sp (L6) que foi sensível a todos os antimicrobianos testados. Os isolados de *Micrococcus luteus* (L5) e *Brevibacterium* sp (L11) mostraram resistência a oxitetraciclina na mesma concentração de 12,5 µg/mL. O isolado *S. xylosus* foi resistente a oxitetraciclina em uma concentração maior que 100 µg/mL e o *S. nepalensis* foi resistente a oxitetraciclina (CIM de 50 µg/mL) e nitrofurantoína (CIM de 12,5 µg/mL). Ambos os isolados de *Jeotagaliococcus* sp apresentaram resistência a oxitetraciclina na concentração de 100 µg/mL, porém o (L12) apresentou uma concentração inibitória mínima mais baixa de 12,5 µg/mL. Os dois isolados *S. lentus* (L1 e L9) apresentaram resistência a ampicilina e a nitrofurantoína, porém em concentrações distintas, o (L1) apresentou uma CIM de 50 µg/mL para ampicilina e 12,5 µg/mL de nitrofurantoína e o (L9) apresentou CIM de 100 µg/mL para ambos antimicrobianos. Os dois isolados da espécie *S. saprophyticus* (L3B e L4) foram resistentes a oxitetraciclina (CIM de 100 µg/mL), porém o L4 também apresentou resistência à nitrofurantoína (CIM de 12,5 µg/mL).

Um total de  $3,8 \times 10^5$  colônias por mL de homogenato foram recuperadas das fêmeas. Um total de 6 isolados que demonstraram morfologias distintas de colônias foram selecionados e utilizados para produzir culturas puras. Dentre os 6 isolados 2 espécies não foram identificadas, ficando com um total de 4 isolados identificados por sequenciamento. Foram identificadas 2 espécies bacterianas, (com base no sequenciamento de 16S rDNA), entre os 4 isolados.

Todas as 4 bactérias foram classificadas como cocos Gram-positivos do Filo Firmicutes (*S. lentus*) (1 isolados); *S. cohnii* (3 isolados).

Os dados de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos das pulgas fêmeas de 2015 (Tabela 6), demonstraram que os isolados de *S. cohnii* (F1, F4, F6) apresentaram perfis de resistências distintas, o (F6) foi sensível a todos os antimicrobianos, enquanto (F1) apresentou resistência a ampicilina (CIM 50 µg/mL), o (F4) apresentou resistência à nitrofurantoína e oxitetraciclina, ambos na mesma concentração de 12,5 µg/mL. E o único isolado *S. lentus* foi resistência a oxitetraciclina (CIM 50 µg/mL).

Um total de  $2,4 \times 10^5$  colônias por mL de homogenato foram recuperados dos machos. Um total de 9 isolados demonstraram morfologias distintas de colônias foram selecionados e utilizados para produzir culturas puras. Dentre os 9 isolados, 4 espécies não foram identificadas por sequenciamento, ficando com um total de 5 isolados identificados. Foram identificadas 4 espécies bacterianas diferentes, (com base no sequenciamento de 16S rDNA) entre os 5 isolados.

Dos isolados (2/5) foram identificados como cocos Gram-positivos, pertencentes aos Filos Firmicutes (*S. epidermidis*), (1 isolado); *S. nepalensis*, (1 isolado) e os outros 3 foram identificados como bastões membros dos Filos Actinobacteria (*Microbacterium* sp.), (2 isolados) e Firmicutes *Bacillus* sp. (1 isolado).

Os dados de resistência a antibióticos das bactérias de pulgas machos coletados em 2015 (Tabela 6), demonstraram que o isolado de *Microbacterium* sp. (M4) apresentou resistência a ampicilina (CIM de 25 µg/mL), porém o outro isolado de *Microbacterium* sp. (M1) foi sensível a todos os antimicrobianos. O *S. nepalensis* (M7) mostrou resistência a oxitetraciclina (CIM 12,5µg/mL). O isolado *Bacillus* sp. (M1B) foi sensível a todos os antimicrobianos e o *S.*

*epidermidis* (M3) não foi testado, pois essa cepa não havia crescido no dia do teste antimicrobiano.

**Tabela 7.** Resistência bacteriana das bactérias cultiváveis pertencentes à microbiota das pulgas *Ctenocephalides felis* em diferentes fases (Ovos, Larvas, Adultos - Machos e Fêmeas) coletadas em 2018.

<b>Amostra</b>	<b>Código</b>	<b>Identificação (16S rDNA)</b>	<b>Perfil de resistência</b>
<b>Ovos</b>	O1	<i>Staphylococcus equorum</i>	
	O2	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype 2	
	O3	<i>Jeotgalicoccus</i> sp.	X
	O4	<i>Staphylococcus</i> <i>saprophyticus</i>	N10/Ox25
	O5	<i>Enterococcus faecalis</i>	
	O6	<i>Actinobacterium</i> sp.	
	O7	<i>Staphylococcus equorum</i>	
	O8	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype 1	
	O9	<i>Dermacoccus</i> sp.	N100
	O10	<i>Actinobacterium</i> sp.	
	O11	<i>Brachybacterium</i>	N10
<b>Larvas</b>	L1	<i>Staphylococcus sciuri</i>	
	L2	<i>Corynebacterium</i> sp.	C10/N25/S10
	L3	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	N10/Ox25
	L4	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	
	L5	<i>Staphylococcus cohnii</i>	
	L6	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	O10
	L7	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	
	L8	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	
	L9	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	Ox50
	L10	<i>Staphylococcus cohnii</i>	N10
<b>Fêmeas</b>	F1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
	F2	<i>Staphylococcus xylosum</i>	
	F3	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Ox10
	F5	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	

	F6	<i>Staphylococcus kloosii</i>	Ox50
	F7	<i>Staphylococcus equorum</i>	
	F8	<i>Dermaococcus</i> sp.	N50
	F9	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
	F10	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype <i>I</i>	Ox10
	F11	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype <i>I</i>	
	F12	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
	F13	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	O10
	F14	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	N10/Ox25
	F15	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	A100/H10/R100/N10 0/S100/Ox50
<b>Machos</b>	M3	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype <i>I</i>	
	M4	<i>Staphylococcus xylosus</i>	
	M5	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	
	M6	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Ox25
	M7	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	
	M8	<i>Staphylococcus cohnii</i>	
	M9	<i>Staphylococcus cohnii</i>	
	M10	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Ox50
	M11	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype <i>I</i>	
	M12	<i>Staphylococcus cohnii</i>	
	M13	<i>Staphylococcus lentus</i> genotype <i>I</i>	
	M14	<i>Kocuria korensii</i>	R100/N50
	M15	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	Ox25

A=Ampicilina; C=Cloranfenicol; N=Nitrofurantoína; Ox=Oxitetraciclina; S=Estreptomicina; R=Rifampicina; H=Cloreto de mercúrio; X=Não foi testada contra os antimicrobianos. OBS.: Machos e fêmeas adultos.

No ano de 2018, um total de  $1,4 \times 10^5$  colônias por mL de homogenatos foram recuperados dos ovos (Tabela 3). Um total de 11 isolados demonstrou morfologias distintas de colônias foram selecionados e utilizados para produzir culturas puras. Foram identificadas 8 espécies bacterianas, (com base no sequenciamento de 16S rDNA), entre os 11 isolados.



Todas foram classificadas como Gram-positivas. A maioria (8/11) dos isolados foram cocos representadas por membros do Filo Firmicutes (*S. equorum* (2 isolados); *S. lentus* (2 isolados), genotype 1 e 2); *S. saprophyticus* (1 isolado); *Jeotgaliococcus* sp. (1 isolado); *Demacoccus* sp. (1 isolado) e *Enterococcus faecalis* (1 isolado). Os outros três organismos foram bastões (3/11) e membros do Filo Actinobacteria (*Actinobacterium* sp. (2 isolado); *Brachybacterium* sp. (1 isolado)).

Os dados de resistência a antibióticos das bactérias dos ovos coletados em 2018 (Tabela 7) demonstraram que sete isolados (O1, O2, O5, O6, O7, O8, O10) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. O isolado de *S. saprophyticus* (O4) mostrou resistência à nitrofurantoína (CIM 12,5 µg/mL) e a oxitetraciclina (CIM 50 µg/mL). O isolado *Dermacoccus* sp. também apresentou resistência à nitrofurantoína, porém com uma concentração maior (CIM acima de 100 µg/mL), e o isolado *Brachybacterium* foi resistente a nitrofurantoína (CIM 12,5 µg/mL). A bactéria *Jeotgaliococcus* sp. (O3) não foi testada porque essa cepa não cresceu no dia do teste antimicrobiano.

Um total de  $5,0 \times 10^5$  colônias por mL de homogenato foram recuperados das larvas. Um total de 12 isolados que demonstraram morfologias distintas de colônias foram selecionados e utilizados para produzir culturas puras. Entretanto dois isolados não foram identificados por sequenciamento. Foram identificadas seis espécies bacterianas, (com base no sequenciamento do 16S (rDNA) de 10 isolados. Todos os isolados foram identificados como Gram-positivos.

A maioria (9/10) foram cocos e membros do Filo Firmicutes (*S. sciuri*), (1 isolado); *S. nepalensis* (2 isolados); *S. saprophyticus* (2 isolados); *S. cohnii* (2 isolados) e *S. pettenkoferi* (2 isolados). O único Gram-positivo em forma de bastão foi membro do Filo Actinobacteria, *Corynebacterium* sp. (1 isolado), essa bactéria foi considerada um organismo multirresistente, por apresentar resistência a três antimicrobianos diferentes (cloranfenicol CIM 12, 5 µg/mL, nitrofurantoína CIM 50 µg/mL e CIM estreptomicina 12,5 µg/mL).

Os dados de resistência a antibióticos das bactérias isoladas de larvas coletadas 2018 (Tabela 7), demonstraram os isolados *S. scuri* (L1), *S. nepalensis* (L4 e L8) foram sensíveis a todos os antimicrobianos. Os isolados de *S. saprophyticus* (L3 e L6), apresentaram perfis de resistência distintos, o isolado (L3) foi resistente à nitrofurantoína (CIM 12,5 µg/mL) e a oxitetraciclina (CIM 50 µg/mL), enquanto o (L6) foi resistente somente a oxitetraciclina com uma concentração inibitória mínima menor que L3 (CIM 12,5 µg/mL). Os dois isolados de *S. cohnii* (L10 e L5) também apresentaram resistência diferente, o (L10) apresentou resistência a nitrofurantoína (CIM 12,5 µg/mL) enquanto a L5 foi sensível a cada um dos antibióticos testados. Os perfis de resistência de *S. pettenkoferi* (L7 e L9) também foi diferente, enquanto (L9) foi resistente a oxitetraciclina (CIM 100 µg/mL), o (L7) foi sensível a cada um dos antimicrobianos testados.

Um total de  $1,8 \times 10^5$  colônias por mL de homogenato foram recuperadas das fêmeas. Um total de 14 isolados que demonstraram morfologias distintas de colônias foram selecionados e utilizados para produzir culturas puras. Foram identificadas 8 espécies bacterianas, (com base no sequenciamento de 16S rDNA), entre os 14 isolados.

A maioria das espécies (7/8) foram cocos Gram-positivos. A única bactéria Gram-negativa foi *Stenotrophomonas maltophilia* (F15), pertencente ao Filo Proteobacteria, esse isolado (F15) foi considerado um organismo multirresistente, por apresentar resistência a todos os antibióticos utilizados e em concentrações bem elevadas, cloreto de mercúrio (CIM 12,5 µg/mL), oxitetraciclina (CIM 100 µg/mL), e para os demais antibióticos a CIM foi acima de 100 µg/mL.

Os isolados (13/14) Gram-positivos foram representadas por membros dos Filos Firmicutes (*S. sapro* (6 isolados); *S. lentus* (2 isolados); *S. xylosus* (1 isolado); *S. kloosii* (1 isolado); *S. equorum* (1 isolado); *S. nepalensis* (1 isolado) e Actinobacteria (*Dermacoccus* sp. (1 isolado)).

Os dados de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos das pulgas fêmeas coletadas em 2018 (Tabela 7) demonstraram que *S. kloosii* mostrou resistência alta a oxitetraciclina (CIM 100 µg/mL), *S. nepalensis* também apresentou resistência a oxitetraciclina, porém em uma concentração mais baixa (CIM 12,5 µg/mL). O isolado *Dermacoccus* sp. demonstrou resistência alta a nitrofurantoína (CIM 100 µg/mL). Os isolados de *S. saprophyticus* apresentaram perfis de resistências diferentes. Os isolados (F1, F5, F9, F12) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, enquanto que os isolados (F3 e F14) apresentaram resistências distintas entre si, enquanto o isolado (F3) foi resistente a oxitetraciclina com uma CIM 12,5 µg/mL, o isolado (F14) foi resistente a oxitetraciclina com uma CIM mais alta que de 50 µg/mL e a nitrofurantoína (CIM 12,5 µg/mL).

Um total de  $2,4 \times 10^5$  colônias por mL de homogenato foram recuperados dos machos. Um total de 13 isolados demonstrando morfologias distintas de colônias foram selecionados e utilizados para produzir culturas puras. Foram identificadas 6 espécies bacterianas, (com base no sequenciamento de 16S rDNA), entre os 13 isolados.

Todos os isolados foram cocos Gram-positivos membros dos Filos Firmicutes (*S. lentus* (3 isolados); *S. xylosus* (1 isolado); *S. nepalensis* (3 isolados); *S. sapro* (2 isolados); *S. cohnii* (3 isolados) e Actinobacteria (*Kocuria koreensis* (1 isolado)).

Os dados de resistência a antibióticos dos isolados bacterianos das pulgas machos coletados em 2018 (Tabela 7), demonstraram que todos os *S. lentus* e *S. cohnii* foram sensíveis aos antimicrobianos testados, assim como o isolado *S. xylosus*. Os dois isolados de *S. saprophyticus* (M6 e M10) apresentaram resistência a oxitetraciclina, porém em concentrações diferentes (CIM foi de 50 µg/mL e 100 µg/mL respectivamente). Os três isolados de *S. nepalensis* também apresentaram resistência distintas, os isolados *S. nepalensis* (M5 e M7) foram sensíveis a todos os antibióticos testados, enquanto o isolado *S. nepalensis* (M15) apresentou resistência a oxitetraciclina (CIM 50 µg/mL), por fim a espécie *Kocuria koreensis* apresentou resistência à nitrofurantoína (CIM 100 µg/mL) e a rifampicina com uma CIM acima de 100 µg/mL.

Apesar de algumas espécies iguais terem sido isoladas da mesma fase e ano, por exemplo, *S. nepalensis* M7 e *S. nepalensis* M15 que foram isoladas em 2018, as características morfológicas descritas apresentaram distinções quanto aspectos visuais morfológicos como a cor das colônias (M7 colônia média perolada, M15 colônia média amarela forte) essa caracterização foi provavelmente devido à presença/competição de outras bactérias presentes na mesma placa. Os perfis distintos de resistência a antibióticos registrados para isolados considerados idênticos com base nos dados de sequenciamento mostraram que a seleção baseada em diferenças na morfologia das colônias era muito eficaz e demonstrou que várias cepas da mesma espécie estavam presentes na amostra.

Resumidamente, entre as 142 bactérias, 137 foram testadas quanto o perfil de suscetibilidade frente a sete antimicrobianos nas diferentes concentrações (concentrações). Os antibióticos que apresentaram o maior número de cepas resistentes foram a oxitetraciclina e nitrofurantoína. Um total de 54,74% (75/137) foi resistente a pelo menos um dos antimicrobianos testados e também pode-se observar que 28% das bactérias resistentes apresentaram resistência a pelo menos dois antibióticos diferentes. Dos 136 isolados 33,08% (45/136) foram resistentes a oxitetraciclina; 25,55% (35/137) foram resistentes a nitrofurantoína; 10,22% (14/137) foram resistentes a ampicilina; 5,84% (8/137) foram

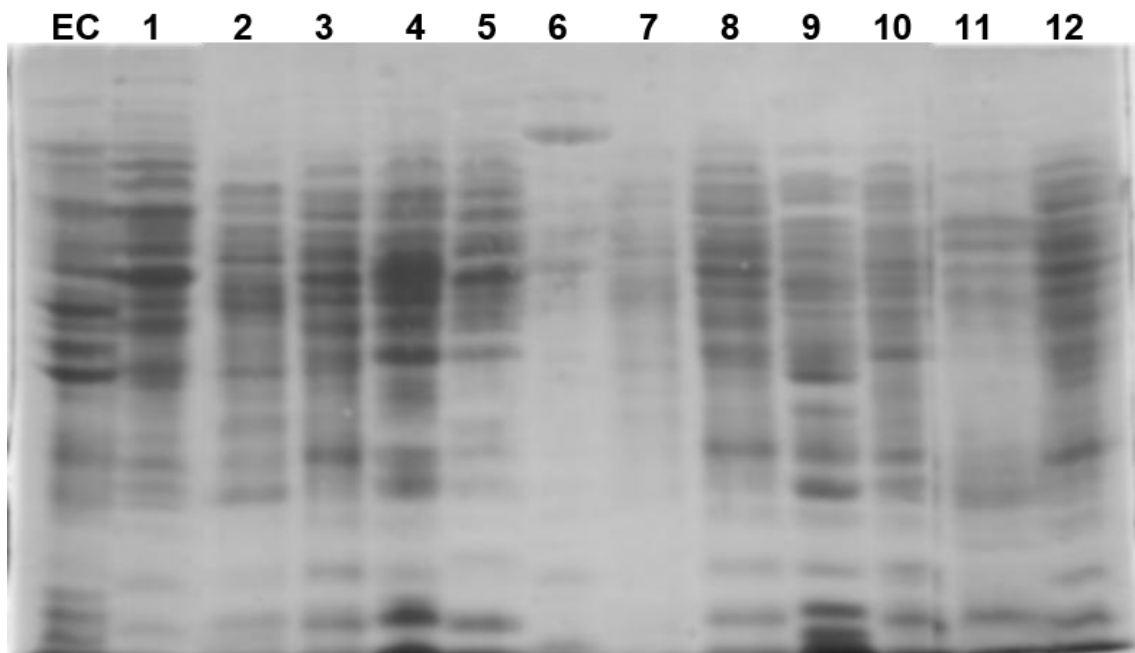
resistentes ao cloranfenicol; 3,65% (5/137) foram resistentes a estreptomicina; 2,19% (3/137) foram resistentes a rifampicina e 0,72% (1/137) foram resistentes ao cloreto de mercúrio. Entre os isolados resistentes, 6,66% (5/75) foram resistentes a pelo menos três classes diferentes de antimicrobianos, sendo, portanto, considerados multirresistentes. Entre os 100 *Staphylococcus* isolados, 50% apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico e uma cepa de *S. nepalensis* isolada em 2011 foi considerada multirresistente, devido a sua resistência a três classes de antimicrobiano distinto.

#### **4.3 Detecção de Sequências Associadas ao CRISPR-CAS.**

A triagem dos cocos Gram-positivos usando o PCR duplex para CRISP-Cas identificou um único isolado de *S. saprophyticus* (recuperado de uma fêmea - isolados F12) em 2018, como positivo para o amplicon de 324 pb correspondente à proteína CasII. As tentativas de sequenciar este amplicon não tiveram êxito.

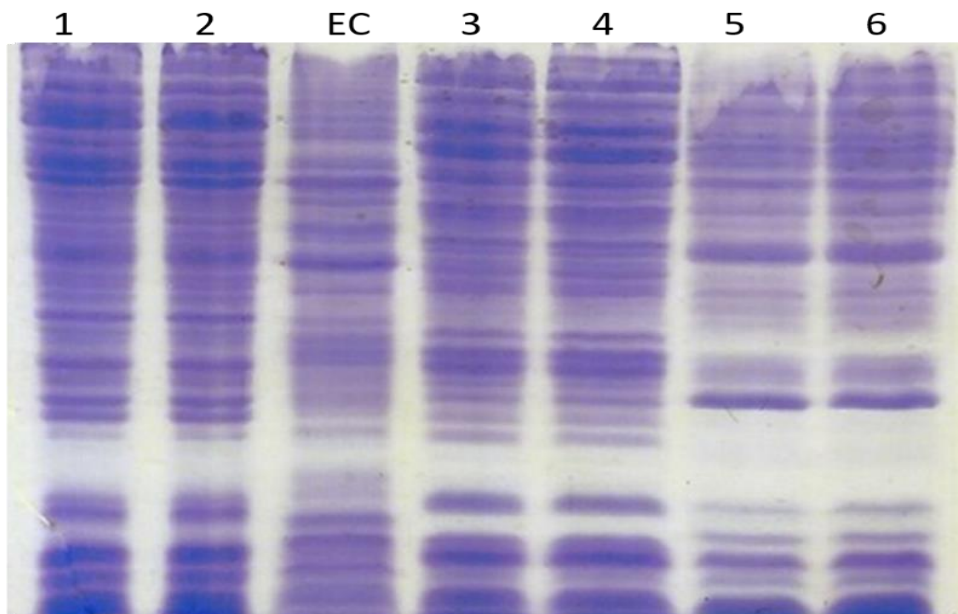
#### **4.4 Análises das proteínas celulares totais usando SDS-PAGE**

Uma análise inicial das diferentes espécies de cocos Gram-positivos (identificados pelo seqüenciamento do 16S rDNA, demonstrou que cada espécie de *Staphylococcus*, incluindo os dois genótipos de *S. lentus*, apresentava um perfil único de bandas em géis de 12.5% poliacrilamida (Figura 1 e Figura 2). Em relação aos quatro isolados identificados como espécies de *Jeotgalicoccus* sp. três produziram o mesmo perfil de bandas (Figura 1), enquanto o quarto isolado (que possuía uma seqüência de 16S rDNA distinta), tinha um perfil distinto (no entanto diferente de todos das outras bactérias; dados não mostrados). Dados semelhantes foram registrados para os três isolados identificados como *Dermacoccus* sp. (o perfil mostrado por dois dos isolados é apresentado na Figura 1). A resolução dos padrões de bandas foi melhorada quando um pente que produzia poços maiores foi utilizado para preparar os géis de empilhamento. Na figura 1, o gel de empilhamento continha 15 poços, enquanto (Figura 2) os géis de empilhamento continham apenas dez poços.



**Figura 1.** Perfis de bandas obtidos pela separação por SDS-PAGE (12,5% de acrilamida) das proteínas celulares totais produzidas a partir de isolados representativos de cocos Gram-positivos recuperados de pulgas.

EC= *E. coli*; 1=*S. cohnii* 2= *S. lentus* (genótipo I); 3= *S. nepalensis*; 4= *S. saprophyticus*; 5=*S. equorum*; 6= *S. kloosii*; 7= *Staphylococcus* sp.; 8= *S. pseudo lugdunensis*; 9=*S. scuri*; 10= *S. xylosum*; 11= *Jeotgalicoccus* sp.; 12= *Dermacoccus* sp.



**Figura 2.** Perfis de resolução de bandas obtidos usando géis de empilhamento contendo dez em vez de 15 poços.

1= *S. lentus* (genótipo I), 2= *S. lentus* (genótipo II) EC= *E. coli* 3= *S. nepalensis* (isolado 2011) 4= *S. nepalensis* (isolado 2018) 5= *S. saprophyticus* (isolado 2011) 6= *S. saprophyticus* (isolado em 2018).

## 5 DISCUSSÃO

A importância de estudar a microbiota, principalmente a porção bacteriana, como um componente central da biologia de todos os eucariotos está firmemente estabelecida (HADRICH, 2018; CARTHEY et al., 2020). O número de estudos das microbiotas de seres humanos e animais (de produção, de estimação e selvagens), cresceu exponencialmente na última década e essa tendência também foi refletida no campo da entomologia médica (Fredensborg et al., 2020; Pollet et al., 2020; Gurgung et al., 2019; Hyde et al., 2019), resultando em centenas de artigos relacionados à composição e (em alguns poucos casos) aspectos funcionais das microbiotas de artrópodes vetores de agentes virais, parasitários e bacterianos (HEALY et al., 2017; ALFANO et al., 2019; SOUZA-NETO et al., 2019). A quantidade limitada de dados funcionais foi atribuída, por alguns autores (BRINKER et al., 2019; Pollet et al., 2020), a dificuldades na comunicação efetiva do significado (principalmente o significado ecológico) de grandes quantidades de dados de sequenciamento (TIPTON et al., 2019).

A pulga de gato (*Ctenocephalides felis*) é o ectoparasita mais comum de cães e gatos domésticos em todo o mundo (LAWRENCE et al., 2019; TIPTON et al., 2019). No entanto, até o momento, apenas quatro estudos, dos quais dois foram realizados na Austrália (Murrell et al., 2003; Lawrence et al., 2015) e dois na América do Norte (Pornwiroon et al., 2007; Vasconcellos et al., 2018) examinaram a composição e a possível importância/influência à microbiota da pulga sobre fisiologia, biologia do desenvolvimento, reprodução e competência em vetores. A microbiota de outras espécies de pulgas também recebeu alguma atenção, mas seria justo afirmar que, em comparação com carrapatos e mosquitos, as pulgas recebem atenção limitada, sem estudos realizados no Brasil.

Os estudos iniciais de microbiotas de artrópodes, como os atribuídos ao autor Murrell et al., (2003), usaram métodos baseados na cultura. No entanto, essa abordagem foi gradualmente substituída pelo uso de técnicas independentes de cultura cada vez mais complexas, com o sequenciamento da próxima geração “Next Generation Sequencing” (NGS), também denominado metagenômica, que atualmente é visto por muitos autores como o método padrão-ouro para determinação e caracterização de microbiota. O principal argumento a favor dessa abordagem é que ela gera uma análise mais precisa e profunda das espécies bacterianas presentes em um determinado hospedeiro, do que pode ser obtido com a cultura (CAO et al., 2017; GREAY et al., 2018). Este argumento é apoiado pelas limitações amplamente reconhecidas das técnicas de cultura existentes para recuperar a maioria das bactérias presentes nas amostras ambientais (CAO et al., 2017; HADRICH et al., 2018; GREAY et al., 2018; CARTHEY et al., 2020; FREDENSBORG et al., 2020). Os rápidos avanços nas tecnologias de sequenciamento, juntamente com a queda dos custos, apresentam amplas oportunidades para estudos de microbiomas em uma vasta e diversificada gama de ambientes (HADRICH et al., 2018; CARTHEY et al., 2020; POLLET et al., 2020). No entanto, esses impressionantes desenvolvimentos tecnológicos foram acompanhados por um crescimento considerável no número de variáveis metodológicas, incluindo amostragem, armazenamento, extração de DNA, pares de iniciadores, tecnologia de sequenciamento, versão química, comprimento de leitura, tamanho da pastilha e pipelines de análise, entre outros. Um fato frequentemente esquecido é que esse aumento na variabilidade ameaça comprometer tanto a reprodutibilidade quanto a comparabilidade dos estudos realizados (LAUDADIO et al., 2019).

Curiosamente, observamos um retorno gradual sob às investigações dos componentes culturais das microbiotas, em muitas áreas de pesquisa (microbiologia clínica, microbiologia de alimentos e controle biológico etc.). Em muitos casos, esses métodos são usados em conjunto e/ou como métodos complementares ao NGS (PANDYA et al., 2017;

DISSANAYAKE et al., 2018; PERUZY et al., 2019). Esse fenômeno emergiu da constatação de que, embora a detecção e (em alguns casos), a quantificação da microbiota possa ser relativamente e facilmente obtida por análise metagenômica, a capacidade atual de usar esses dados para aplicações práticas é muito limitada. Além disso, a metagenômica apresenta uma série de desvantagens, principalmente a ignorância de populações menores, presentes em uma concentração menor que  $10^5$  UFC / mL e a caracterização taxonômica não confiável dos membros da microbiota no nível da espécie (LAGIER et al. 2012; SANKAR et al. 2015; TAMAMES et al., 2019). Essas desvantagens e a necessidade de caracterizar totalmente as bactérias motivaram alguns pesquisadores a expressarem mais interesse pela cultura, desenvolvendo novas técnicas que visam o cultivo de bactérias anteriormente não cultivadas (OVERMANN, GARCIA-PICHEL, 2013). Entre esses métodos, a 'culturômica', desenvolvida pela primeira vez em 2012 e baseada na diversificação das condições da cultura, para imitar o mais próximo possível os ambientes naturais em que as bactérias vivem, permitiu o isolamento de mais de 1000 espécies bacterianas do intestino humano ao longo dos últimos anos (OVERMAN et al., 2013; LAGIER et al. 2012, 2016).

No presente estudo, a decisão de usar uma abordagem baseada em cultura, em vez de empregar análises baseadas em sequenciamento especificamente, “Next Generation Sequencing” (NGS), para caracterizar a microbiota, foi realizada principalmente por razões financeiras. Isso foi claramente necessário, dada a contínua crise no financiamento para a pesquisa científica brasileira (MONTEIRO, 2020). No entanto, é importante ressaltar que os estudos microbiológicos através dos métodos tradicionais de cultura permitem obter colônias puras individualizadas, tornando a realização de testes rápidos e de baixo custo na identificação bacteriana. Como por exemplo, para testar e quantificar a susceptibilidade de isolados clínicos/ambientais a antimicrobianos, ou a realização de testes rápidos de identificação de espécies, por exemplo, os métodos de SDS-PAGE ou Ionização e dessorção a laser assistida por matriz “Time of Flight” (MALDI-TOF) espectrometria de massa. A disponibilidade de culturas bacterianas também é essencial para a realização do processo conhecido como paratransgênese que se fundamenta no uso de simbiontes cultiváveis para interferir na transmissão de patógenos transmitidos por vetores (LOPEZ-ORDONEZ et al., 2018).

Os níveis de crescimento bacteriano recuperados em placas de ágar nutriente das amostras de pulgas estavam na faixa de  $2,0 \times 10^4$  (ovo; 2011) a  $2,6 \times 10^6$  ufc/mL (larvas, 2014). Os ovos apresentaram consistentemente as menores contagens bacterianas (Tabela 3), e os maiores números registrados foram nas amostras larvais. Observamos que muitas colônias recuperadas em placas de ágar nutriente apresentaram morfologias altamente semelhantes. No entanto, na subcultura, como culturas puras no mesmo meio, foi possível perceber uma variedade de tipos distintos de colônias, que exibiam uma variedade de características de textura e olfativas únicas: características que não eram detectadas ao crescer nas placas de cultura mista originais. No entanto, em alguns casos, foi observado o contrário, assim colônias que apresentavam morfologias distintas em culturas mistas subsequentemente apresentaram morfologias semelhantes às de outras bactérias isoladas das mesmas amostras, quando cultivadas como culturas puras. Esse foi particularmente notável no caso da produção de pigmentos. Dado que seria impraticável produzir culturas puras de cada colônia individual, acreditamos que é possível que nossa avaliação baseada na cultura possa ter subestimado a diversidade de espécies em algumas amostras e superestimado em outras. Em alguns casos, a hipótese de superestimação foi sustentada pelos dados gerados a partir da identificação por sequenciamento das culturas puras. Assim, na maioria das amostras de pulgas, a mesma espécie bacteriana foi identificada mais de uma vez, indicando que as características morfológicas não eram suficientes para permitir a identificação diferencial. No entanto, os dados dos testes resistentes a antibióticos mostraram que, em alguns casos, bactérias mostrando a mesma

sequência 16S rDNA apresentaram valores distintos de CIM para várias antimicrobianas, indicando que eram isolados distintos da mesma espécie e fornecendo suporte para a hipótese de sub-representação.

A identificação bacteriana foi realizada por análise de sequência de aproximadamente 500 nucleotídeos das regiões V1, V2 e V3 do gene 16S rRNA, com um total de 38 espécies bacterianas cultiváveis diferentes sendo identificadas (Tabelas 1 e 2). As sequências de RNA ribossômico procarionte 16S (rRNA) são amplamente utilizadas na microbiologia ambiental e na evolução molecular como marcadores confiáveis para a classificação taxonômica e análise Filogenética das bactérias. A sequência do gene 16S rRNA foi usada pela primeira vez em 1985 para análise Filogenética (LANE et al., 1985). Por conter regiões altamente conservadas para o desenho do primer e regiões hipervariáveis para identificar características Filogenéticas dos microrganismos, a sequência do gene 16S rRNA se tornou o gene marcador mais amplamente utilizado para a criação de perfis de comunidades bacterianas (TRINGE, HUGENHOLTZ, 2008). A sequência completa do gene 16S rRNA tem aproximadamente 1400 pares de bases (bp) e consiste em nove regiões hipervariáveis que são separadas por nove regiões altamente conservadas (BAKER et al., 2003; WANG et al., 2008). Devido ao custo elevado do sequenciamento do gene inteiro, as sequências do gene 16S rRNA usadas na maioria dos estudos são sequências parciais (YANG et al., 2016). Portanto, a seleção de primers adequados é fundamental para estudar a Filogenia e taxonomia bacteriana em vários ambientes. No entanto, a seleção das regiões hipervariáveis mais eficientes para análise Filogenética e classificação taxonômica ainda é discutida. Utilizamos os primers contidos no sistema comercial de identificação MicroSeq 500 16S rRNA (Thermofisher), desenvolvido há mais de 20 anos, mas que ainda hoje é amplamente utilizado. Este sistema amplifica os primeiros 500 nucleotídeos da extremidade 5' da sequência 16S rDNA e foi relatado para identificação de isolados bacterianos que sistemas comerciais automatizados não conseguiram identificar corretamente. (FONTANA et al., 2005; YANG et al., 2016). Apesar das sequências parciais possuírem algumas vantagens em relação às sequências completas, como redução do tempo de análise e diminuição do custo do trabalho, vale ressaltar não podemos ter 100% de confiabilidade nos resultados, principalmente para identificação de espécies do mesmo gênero como, por exemplo, *Staphylococcus* sp., que apresentam um elevado grau de similaridade sequencial entre as espécies.

Um dos principais objetivos desta investigação foi determinar a existência (ou não) de uma microbiota estável / “core”, cuja presença pode formar uma plataforma para métodos inovadores de controle, com base na manipulação da microbiota. Um total de 142 espécimes foram identificadas e classificadas em 4 Filos, 21 gêneros e 38 espécies. A composição das populações bacterianas presentes nos diferentes estágios de desenvolvimento das pulgas demonstrou certo grau de variabilidade, principalmente entre as fases de ovos e larvas, mas algumas espécies foram comuns em todas as fases, e durante todos os anos. Neste contexto, membros do gênero *Staphylococcus*, principalmente espécies classificadas como coagulase-negativo (CoNS) foram o mais abundante (11/38).

Como foi relatado para algumas outras espécies de artrópodes de importância para saúde humana e animal, (Scolari et al., 2019) os resultados da atual investigação indicaram que a colônia de pulgas empregada neste estudo contém uma microbiota estável, dentro da qual três espécies de esta Filococos (*S. lentus*, *S. nepalensis* e *S. saprophyticus*) representaram os componentes predominantes nos estágios de larvas e adultos. Sendo, portanto, considerada a microbiota central das pulgas *C. felis* da qual pode servir como alvo para manipulação do microbiota. Estudos têm demonstrado que a biologia de muitos parasitas e vetores é influenciada por, e em alguns casos depende da presença ou ausência de determinados grupos de microrganismos que influenciam profundamente sua ecologia e evolução (KOYLE, et al.,

2016; REESE; DUNN, 2018). Dessa maneira, ao identificarmos uma microbiota central presente ao longo de tanto tempo incluindo nas diferentes fases da vida do hospedeiro, podemos saber qual o ponto inicial de partida para estudos relacionados a manipulação da microbiota, como uma ferramenta para o controle microbiano (TAYLOR, et al., 2012; ZUG; HAMMERSTEIN, 2015; SALDAÑA et al., 2017; GAO, et al., 2018).

O estudo vigente procurou expandir o conhecimento em relação à microbiota da pulga *C. felis* e produzir os primeiros dados referentes a este aspecto da biologia de pulgas na América Latina. Em contraste aos quatro estudos anteriores (Murrell et al., 2003; Pornwiroon et al., 2007; Lawrence et al., 2015; Vasconcellos et al., 2018) que apenas examinou adultos. Neste foram feitos em quatro estágios de desenvolvimento diferentes, especificamente ovos, larvas e adultos do gênero, machos e fêmeas, os quais foram coletadas ao longo de quatro anos intercalados (2011, 2014, 2015, 2018). Como visto, representa-se o primeiro estudo sobre este tema a incluir as variáveis espaciais e temporais no desenho da investigação. A importância de incluir variáveis temporais e espaciais nos estudos da microbiota de qualquer espécie pode parecer óbvia, no entanto, poucos estudos com artrópodes incluíram essas variáveis (LALZAR et al., 2012; DURON et al., 2017). A importância de considerar a questão da escala nos estudos de microbiota de carrapatos foi recentemente revisada (Pollet et al., 2020) e também foi discutido no contexto da microbiota intestinal de mosquitos na China (Li et al., 2019) e na América do Norte (DUGUMA, et al., 2019). Na opinião desses autores, uma grande quantidade dos dados produzidos sobre esses tópicos é essencialmente sem significado, fora do contexto dos estudos individuais, principalmente porque é extremamente difícil realizar comparações intra-estudo e como tal, apesar de mais de 100 estudos publicados no caso de carrapatos e quase 300 artigos referente a mosquitos nossa compreensão funcional do microbiota desses vetores deve ser considerada como preliminar.

Dentro do gênero *Staphylococcus* existe uma gama de espécies que além de comporem parte da flora normal da pele e membranas mucosas de mamíferos e aves, podem também agir como agentes patogênicos oportunistas na medicina humana e veterinária. Neste ofício, não encontramos espécies patogênicas obrigatórias, no entanto, algumas das espécies isoladas já foram relatadas como patógenos facultativos de humanos e animais. Entre elas, os CoNS que são um grupo de bactérias que anteriormente eram considerados inofensivos Ma, et al. (2019), porém o seu papel tem se tornado cada vez mais reconhecido por seu potencial para causar doenças graves (TEIXEIRA, 2009). Um aspecto particularmente interessante das CoNS é suas capacidades de servir como um reservatório potencial de genes de resistência a antimicrobianos (Fišarová, et al., 2019) em produzir biofilmes, o que torna as infecções associadas com esse grupo particularmente difíceis de serem tratadas (GÓMEZ-SANZ, et al., 2019).

A transmissão de estafilococos comensais de animais para humanos e vice-versa é reconhecida, principalmente entre animais de estimação e seus donos (YEHUALAESHET, et al., 2019). As análises executadas por Ma, et al., (2019), na Austrália, caracterizou a diversidade de estafilococos mucocutâneos de cães e gatos. Os autores observaram que a maioria dos isolados eram CoNS (93 de 107, 86,9%). Algumas destas espécies foram encontradas dentro da microbiota das pulgas *C. felis*, o que também foram examinados e encontrados neste ensaio, e no estudo de Murrell et al, (2003) incluindo as espécies: *S. sciuri*, *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. epidermidis* e *S. pettenkoferi*. Embora exista uma grande variedade de *Staphylococcus* sp. com diferentes espécies hospedeiras em ambientes distintos preferidos, é de conhecimento que a transmissão de estafilococos comensais ocorre comumente entre indivíduos nos níveis intra e interespecies (MA, et al., 2019). Nesse contexto, uma vez que ocorre a transmissão de microrganismos entre animais domésticos e seres humanos (relação interespecífica), o mesmo pode ocorrer entre a pulga e os animais em que parasitam, dessa forma é necessário conhecer os organismos comensais da microbiota de animais domésticos na



consideração do surgimento e epidemiologia da resistência antimicrobiana, assim como, o surgimento de patologias associados a infecções bacterianas. Portanto, mais estudos são necessários para compreender a coabitação potencial entre vetor-hospedeiro como um fator de risco para aquisição, infecção e transmissão de estafilococos (GÓMEZ-SANZ et al., 2019).

É de conhecimento que muitos artrópodes abrigam uma riqueza de bactérias simbióticas, das quais exercem um forte efeito na adaptação do hospedeiro e que influenciam na sua evolução (POLLET et al., 2020). Embora os recentes avanços nos métodos moleculares tenham permitido uma quantificação abrangente de comunidades microbianas em um conjunto diverso de espécies, a maioria dos grupos de artrópodes ainda permanece amplamente inexploradas. Os insetos possuem uma grande diversidade de microrganismos, sendo a maioria deles simbioses mutualistas, porém tanto o ambiente em que estes estão inseridos quanto às fontes de alimentação interferem nessa composição da microbiota. Insetos criados em condições laboratoriais possuem uma alimentação mais homogênea, diferente dos que vivem livremente na natureza (LOPEZ-ORDONEZ et al., 2018). Nesta sondagem e acompanhamento laboratorial, as fases de ovos e larvas apresentaram consistentemente, maiores em variedades de espécies, sendo principalmente bactérias ambientais, incluindo gêneros ainda não identificados na microbiota de pulgas e que já foram identificados na microbiota de outros insetos, como *Jeotgalicoccus*, *Naxibacter* e *Exiguobacterium* (Chun-Hong, et al., 2014; Bahrndorff, et al 2017; Khan, et al., 2017), enquanto os adultos apresentaram variedade de espécies bacteriana limitada (principalmente *Staphylococcus*) possivelmente refletindo as mudanças bioquímicas e fisiológicas associadas com o processo de metamorfoses.

As três principais espécies de *Staphylococcus* sp., juntos com *S. cohnii* foram relatadas como patógenos oportunistas com potencial zoonótico e a maioria foi identificada como componente da microbiota oral de gatos domésticos no Brasil (ROSSI et al., 2017). A espécie de maior prevalência na colônia brasileira foi *S. nepalensis*, estando presente em todas as fases do ciclo biológico do artrópode e os anos de diagnóstico. Por outro lado, Nováková et al. (2006) observou a ocorrência de *S. nepalensis* em diferentes fontes, incluindo material clínico humano, sugerindo que essa espécie pode ser ocasionalmente patogênica. Os gêneros *S. lentus* e *S. nepalensis* foram encontrados posteriormente em diferentes ordens de insetos, (Chandel et al., 2013; Maleki-Ravasan et al., 2015) e foram relatados como patógenos oportunistas de galinhas quando em associação com o ácaro hematófago *Dermanyssus gallinae* (VALIENTE et al., 2009). Em contraste, no caso da mosca *Musca domestica*, *S. lentus* foi tido como benéfico para o desenvolvimento das larvas (ZUREK, et al., 2000).

No ensaio, as espécies *S. lentus* foram isoladas no ano de 2014, 2015 e 2018, mas foram ausentes a presença destas nas amostras processadas em 2011. Assim, apesar de ter sido relatada a sua importância em alguns hospedeiros citados acima, aparentemente a sua presença não é necessária para o desenvolvimento da colônia. A mesma conclusão pode ser atribuída a *S. cohnii*, que esteve presente em todos os anos, exceto 2014. Essa espécie é considerada como uma bactéria ambiental capaz de causar infecções oportunistas em humanos (SOLDERA et al., 2013).

Em comum com *S. nepalensis*, a espécie *S. saprophyticus* foi encontrada em todos os anos e fases das pulgas. Essa espécie está presente na microbiota normal da pele, região periuretral e mucosas das vias urinárias e genitais de humanos e quando ocorre um desequilíbrio da microbiota ela pode estar responsável por infecção urinária, segundo Levinson (2010), encontrou coincidentemente, e esta foi a espécie que mais apresentou resistência ao antibiótico nitrofurantoína, do qual é utilizado para tratamento de infecção urinária. Os autores, Lopez-Ordenez et al. (2018) compararam a diferença da diversidade da microbiota de *Triatoma dimidiata* nas diferentes fases da vida dos insetos criados em laboratório com os do coletado no ambiente, o que também constataram que *Staphylococcus* foi o gênero mais abundante (6/14

isolados). Contudo, sendo *S. saprophyticus* a espécie de maior prevalência detectada. Alguns estudos baseados na avaliação da microbiota de insetos a partir de meio de cultura, demonstraram a prevalência de espécies do gênero *Staphylococcus* caracterizadas como coagulase-negativo (CoNS) em carrapatos, pulgas e piolhos (Murrell, et al., 2003) e em carrapatos, como vistas por Egyed, et al. (2014); Lucero-Velasco et al. (2018), o que corroboram com os dados encontrados neste experimento. As investigações de Lucero-Velasco et al. (2018), analisou a microbiota cultivável de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e também encontrou algumas bactérias em comum com às do atual estudo, como: *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *Jeotgalicoccus*, *B. megaterium*, *Actinobacteria* e *M. luteus*. Todas estas bactérias foram encontradas na colônia de pulgas. No entanto, a sua isolamento foi esporádica. No presente estudo *Jeotgalicoccus* sp. foi isolado das fases de ovos e larvas em todos os anos, exceto em 2011. Essas bactérias são comuns no meio ambiente e no estudo apresentaram alta resistência à oxitetraciclina.

Foram isoladas duas cepas *S. epidermidis* em 2014 e 2015. A cepa isolada em 2014 apresentou resistência à oxitetraciclina. Essa cepa tem sido relatada como patogênica em medicina veterinária, relacionado a infecção de pele e ouvido de cães (Ma et al., 2019), sendo frequentemente isolado em animais de estimação como patógeno primário, ou isolado de animais saudáveis (SCHOENFELDER, et al., 2010; LONCARIC, et al. 2019). Em um estudo feito por Weiß et al. (2013) na Alemanha, isolaram bactérias de uma clínica veterinária e observaram que a maioria das cepas fenotipicamente resistentes a múltiplos antimicrobianos pertenciam a essa espécie. O que também foi relatado por Gómez-Sanz et al. (2019), nas espécies *S. epidermidis* como a predominante entre os animais testados, com uma prevalência geral de 12,1% (9,3% entre cães versus 25% em gatos), correspondendo a 66% das cepas. Em seres humanos, *S. epidermidis* foi a espécie mais comum entre as infecções por CoNS (24-80%) (GÓMEZ-SANZ, et al., 2019).

A caracterização das bactérias cultivadas em termos de resistência aos compostos antimicrobianos demonstrou que a maior parte da microbiota das pulgas não se apresenta como um reservatório para mecanismos de resistência antimicrobiana. O exame desse aspecto da microbiota foi realizado com base nos achados de pesquisadores brasileiros que identificaram resistência múltipla a antimicrobianos em espécies de estafilococos (incluindo aqueles recuperados e relatados neste estudo), isolados da cavidade oral de gatos saudáveis no estado do Rio de Janeiro (ROSSI et al., 2017). A triagem das culturas bacterianas para componentes do sistema imunológico CRISPR-CAS, demonstrou uma ausência quase total entre os cocos Gram-positivos recuperados neste estudo, um achado similar aos dados apresentados em relação às espécies de estafilococos associados com gatos (ROSSI et al., 2017).

A maioria das pesquisas que investigam a capacidade dos insetos de abrigar bactérias resistentes a antibióticos concentrou-se nas moscas e o seu potencial como vetores para transportar bactérias resistentes a antibióticos de instalações de produção animal para populações humanas (HYDE, et al., 2019). Além disso, também foi constatado que abelhas, formigas e vários insetos que alimentam de plantas carregam bactérias resistentes a antibióticos (IGNASIAK; MAXWELL, 2017). Não há pesquisas detalhadas sobre a flora microbiana de pulgas *C. felis* e esse é o primeiro relato sobre a resistência antimicrobiana de bactérias cultiváveis de pulgas *C. felis*. Conduziram-se nesta evidência científica, o isolamento de bactérias resistentes a antibióticos, incluindo um baixo número de isolados resistentes a múltiplos antibióticos. Este achado faz sentido uma vez que foi relatado que o uso de antibióticos, para tratamento dos gatos empregados na manutenção da colônia, é limitado.

Entre as 142 bactérias identificadas por sequenciamento, 137 foram testadas quanto ao perfil de suscetibilidade frente a sete antimicrobianos de diferentes concentrações (10; 12,5; 25; 50; 100 µg/ mL). Um total de 54% (75/137) foi resistente a pelo menos um dos antimicrobianos

testados e pode-se observar que 28% das bactérias resistentes apresentaram resistência a pelo menos dois antibióticos diferentes. Entre os 137 isolados examinados 33% (45/137) foram resistentes a oxitetraciclina e 25% (35/137) foram resistentes à nitrofurantoína. Uma revisão da literatura e conversas informais com médicos veterinários da UFRRJ, apontam que esse antibiótico não é um agente de primeira linha na medicina veterinária sendo infreqüentemente utilizado para tratamento de infecções urinárias e a presença de resistência bacteriana é rara (WEESE et al. 2019). As pesquisas de Pompa et al. (2010), com o uso desse medicamento para o tratamento de gatos com infecções bacterianas obtiveram sucesso no tratamento de bactérias multirresistentes. Como as pulgas foram obtidas a partir de uma colônia controlada em animais de laboratório, é considerado e provável que a elevada resistência a esse antimicrobiano encontrado pode ser conferida a partir de mecanismos de resistência inata.

A maior frequência de resistência foi encontrada para oxitetraciclina, que faz parte do grupo das tetraciclina, assim como visto no trabalho de Rossi, et al. (2017), que avaliou a resistência antibacteriana presente na microbiota cultivável da cavidade oral de gatos. Os autores constataram que a maioria das cepas de *Staphylococcus* sp. foi resistente ao grupo das tetraciclina, fármacos amplamente utilizados na medicina humana e veterinária. Dessa forma, pode ter ocorrido ao longo dos anos uma pressão de seleção seletiva no meio ambiente, tornando amplamente resistente a esse medicamento. Neste sentido, este estudo demonstrou que 50% dos isolados de *Staphylococcus* identificaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados (50/100). Em concordância com Boiocchi et al. (2019) em que avaliou a resistência antimicrobiana da microbiota de moscas, onde o gênero *Staphylococcus* sp. também foi encontrado e apresentou a maior proporção de cepas resistentes num total de 83,3%.

Conforme sugerido por vários autores, os CoNS podem ser capazes de trocar material genético, incluindo elementos que codificam resistência antimicrobiana, entre si. Além de também poder atuar como um reservatório de genes resistentes a antimicrobianos para espécies patogênicas como *S. aureus* Rossi et al. (2017), principalmente se os genes de resistência estiverem associados a plasmídeos. Embora a maioria das espécies do gênero *Staphylococcus* seja comum e inofensivo na microbiota de mamíferos, o contato com outras bactérias patogênicas que compartilham o mesmo ambiente e apresentam genes de resistência em plasmídeos, podem acarretar a chance de transferência de genes de resistência antimicrobiana (ROSSI et al., 2016). Esse gênero é um exemplo de bactérias que dependem da transferência de elementos genéticos acessórios para sua adaptação e conseqüentemente evolução; os fagos e plasmídeos fornecem rotas fundamentais para a disseminação de determinantes de virulência e resistência a antibióticos (BAE et al., 2006). Neste encargo de análises técnicas não verificamos a presença de plasmídeos e fagos, porém foi observado que entre os isolados que apresentaram resistência 6,7% (4/75), foram resistentes a pelo menos três classes diferentes de antimicrobianos, sendo, portanto, considerados multirresistentes aos gêneros, *Corynebacterium*, *Naxibacter* e *Stenomaltophilius*; e à espécie, *Enterococcus faecalis*. Curiosamente, em contraste com a maioria das cepas de *S. nepalensis*, um único isolado (M3) recuperado de uma pulga macho, em 2011 demonstrou resistência a 5 dos 7 compostos antimicrobianos avaliados. A ausência desse fenótipo nas amostras subsequentes (2014-2018) indicou que, na ausência de pressão seletiva, essa cepa não era mantida na microbiota da colônia. Isso pode ter refletido, efeitos negativos na replicação e competitividade associados ao transporte desses determinantes de resistência. Pesquisas futuras terão como escopo determinar a natureza molecular desse fenótipo de MDR.

Ainda na pesquisa relatado por Rossi et al. (2017) demonstraram que a maioria das cepas estafilocócicas isoladas apresentaram ser multirresistentes as drogas testadas e com potencial patogênico, observaram também que algumas dessas cepas apresentaram plasmídeo e não apresentavam sistema CRISPR, ou seja, repetições palindrômicas curtas agrupadas e

regularmente interespaçadas e proteínas associadas a CRISPR, que representam uma estratégia de defesa de várias bactérias e muitos Archaeobacterias contra bacteriófagos e/ou DNA exógenos; principalmente de origem plasmidial (JIANG et al., 2013).

Nesse aperfeiçoamento diagnóstico, uma única cepa de *S. saprophyticus* apresentou sistema CRISPR e esta foi sensível a todos os antimicrobianos testados, o que condiz com a hipótese de sua função, segundo Rossi, et al. (2017).

O que procurou no sistema de CRISPR e em outras cepas cocos gram-positivos que foram sensíveis a todos os antimicrobianos e essas constaram a serem negativas. Contudo, o sistema CRISPR ainda precisa ser melhor estudado para saber a sua relação entre os DNAs exógenos com a história evolutiva das bactérias.

As pulgas são animais móveis e ágeis, alguns cientistas apontam que uma pulga consegue saltar até 200 vezes o seu tamanho, além de sua reprodução ser espantosa, com apenas dois casais de pulgas adultas colocadas num animal pelo período de 90 dias, ao final, já haverá mais de 2.500 formas jovens no ambiente e mais de 450 pulgas adultas alimentando-se ao mesmo tempo no hospedeiro, dessa maneira, elas poderiam atuar como um vetor para espalhar bactérias resistentes a antibióticos entre ambientes. Os insetos já foram identificados como uma via possível pela qual os determinantes da resistência a antibióticos se espalham das áreas rurais para as urbanas (ZUREK; GHOSH, 2014). Por essa razão é de extrema importância pesquisas de resistências antimicrobianas em pulgas, porém de acordo com este estudo, foi demonstrado pouco risco de transferência antimicrobiana, visto que poucas bactérias foram multirresistentes.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação de duas espécies de *Staphylococcus* que foram isoladas continuamente durante um período de sete anos, em todas as fases da vida das pulgas criadas na colônia, foi ao mesmo tempo inovador e proporcionou informações pertinentes sobre a temática avaliada neste experimento. No entanto, é importante questionar a importância desse achado em relação às populações naturais de pulga de gato. Para resolver isso, prevê-se que seria necessário colher muitas centenas de pulgas adultas de animais naturalmente infectados. No entanto, como afirmado anteriormente, a ciência brasileira está sofrendo uma das piores crises financeiras da história recente e, como tal, o uso de análises consideradas caras com base nas sequências de colônias bacterianas não seria uma opção viável para esses testes e consequentemente para as pesquisas nessa área. Nesse contexto, o custo associado à realização da análise baseada em sequência de um único fragmento de 500 pb de 16S rDNA, é atualmente de R \$70,00 subindo para R \$210,00 para sequenciar o gene inteiro, o que torna dispendioso financeiramente os procedimentos, e até mesmo inviável dependendo do que se pretende colocar em pauta de estudo. Na tentativa de encontrar uma solução para esse obstáculo, foi realizada uma avaliação do SDS-PAGE das proteínas celulares totais como meio de fornecer identificação diferencial de cocos Gram-positivos recuperados de pulgas. Os resultados desta análise foram promissores e permitiram a identificação diferencial de *S. lentus*, *S. nepalensis* e *S. saprophyticus* a um custo inferior a 10 centavos por isolado.

## 7 CONCLUSÃO

Após as análises realizadas neste trabalho, foi possível concluir que:

- Cada uma das diferentes etapas da vida da pulga *C. felis* apresentou uma microbiota única, no entanto, um componente central de todas as amostras era membro do gênero *Staphylococcus*. A presença constante da mesma espécie de *Staphylococcus* sp., em múltiplos estágios de vida, sugere que estas bactérias são componentes essenciais da microbiota das pulgas *C. felis* da colônia;
- As espécies de maior ocorrência foram: *S. nepalensis*, *S. saprophyticus*. As quais foram relatadas previamente como patógenos oportunistas com potencial zoonótico;
- Algumas bactérias foram resistentes aos antimicrobianos testados, dentre elas, poucas demonstraram fenótipos resistentes a múltiplos antimicrobianos, representando pouco risco de transferência antimicrobiana, visto que poucas bactérias foram multirresistentes, e,
- Ao realizar uma avaliação do SDS-PAGE das proteínas celulares totais como meio de fornecer identificação diferencial de cocos gram-positivos recuperados de pulgas. Os resultados desta análise foram promissores e permitiram a identificação diferencial de *S. lentus*, *S. nepalensis* e *S. saprophyticus* a um custo inferior a 10 centavos por isolado.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIVELO, T.; TSCHIRREN, B. Bacterial microbiota composition of a common ectoparasite of cavity-breeding birds, the Hen Flea *Ceratophyllus gallinae*. **Ibis**, p. 1-15, 2019.

ALBINO, Luiz Augusto Aguiar et al. Isolamento, caracterização e uso de bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella typhimurium*. 2011.

ALFANO, N.; TAGLIAPIETRA, V.; ROSSO, F.; MANICA, M.; ARNOLDI, D.; PINDO, M.; RIZZOLI, A. Changes in Microbiota Across Developmental Stages of *Aedes koreicus*, an Invasive Mosquito Vector in Europe: Indications for Microbiota-Based Control Strategies. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p.1-15, 2019.

ALONSO, A.; SANCHEZ, P; MARTINEZ, J.L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 1-9, 2001.

AMÉRICO, J. H. P.; DE OLIVEIRA MANOEL, L.; TORRES, N. H.; FERREIRA, L. F. R. O uso de agrotóxicos e os impactos nos ecossistemas aquáticos. **Revista Científica, ANAP Brasil**, v. 8, n. 13, p. 1-15, 2015.

AMPICILINA-VETERIN-ORAL. **vetnil.com.br**, 2019. Disponível em: < <http://www.vetnil.com.br/produtos/ampicilina-veterin-oral/> >. Acesso em: 15/01/2019.

ANDRADE, A. C. S.; DOS SANTOS, I. C.; BARBOSA, L. N.; DA SILVA CAETANO, I. C.; ZANIOLO, M. M.; FONSECA, B. D.; GONÇALVES, D. D. Antimicrobial Resistance and Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production in Enterobacteriaceae Isolates from Household Cats (*Felis silvestris catus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, p. 1-9, 2019.

ANDRADE, S. F. Quimioterápicos, antimicrobianos e quimioterápicos. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica Veterinária**, 3 ed. São Paulo: Editora Roca, 2008.

ANGLERÓ-RODRÍGUEZ, Y. I.; BLUMBERG, B. J.; DONG, Y.; SANDIFORD, S. L.; PIKE, A.; CLAYTON, AM.; DIMOPOULOS, G. A natural *Anopheles*-associated *Penicillium chrysogenum* enhances mosquito susceptibility to *Plasmodium* infection. **Scientific reports**, v. 6, n. 34084, p. 1-10, 2016.

BAE, T.; BABA, T.; HIRAMATSU, K.; SCHNEEWIND, O. Prophages of *Staphylococcus aureus* Newman and their contribution to virulence. **Mol Microbiol**, v. 62, n. 4, p. 1035-1047, 2006.

BAHRNDORFF, S.; DE JONGE, N.; SKOVGÅRD, H., NIELSEN, J. L. (2017). Bacterial communities associated with houseflies (*Musca domestica* L.) sampled within and between farms. **PLoS One**, v.12, n. 1, 2017.

BAKER, G. C.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiol Methods**, v. 55(3), p. 541–55, 2003.

BAKER, G. C.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods*, by culturomics. **Nat Microbiol**, v.55(3), p.541-55, 2003.

BALDRIDGE, G. D.; BURKHARDT, N. Y.; SIMSER, J. A.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G. Sequence and expression analysis of the *ompA* gene of *Rickettsia peacockii*, an endosymbiont of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 70, n. 11, p. 6628-6636, 2004.

BARRANGOU, R.; MARRAFFINI, L.A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. **Molecular cell**, v. 54, n. 2, p. 234-244, 2014.

BAUER, A. W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4 ts, p. 493-496, 1966.

BEARD, C. B.; BUTLER, J. F.; HALL, D. W. Prevalence and biology of endosymbionts of fleas (Siphonaptera: Pulicidae) from dogs and cats in Alachua County, Florida. **Journal of medical entomology**, v. 27, n. 6, p. 1050-1061, 1990.

BEARD, C.B.; CORDON-ROSALES, C.; DURVASULA, R.V. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p.123-141, 2002.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 870-926, 2014.

BEN, Y.; FU, C.; H. U, M.; LIU, L.; WONG, M. H.; Z HENG, C. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: a review. **Environmental research**, v. 169, p. 483-493, 2019.

BENNETT, K. L.; ALMANZA, A, MCMILLAN, W.; O, SALTONSTALL, K.; VDOVENKO E. L.; VINDA, J. S.; MEJIA L.; DRIESSE, K.; DE LEÓN, L. F.; LOAIZA, J.R. Habitat disturbance and the organization of bacterial communities in Neotropical hematophagous arthropods. **PloS One**, v.14 p. 9, 2019.



BERNHEIM, A.; BIKARD, D.; TOUCHON, M.; ROCHA, E.P. A matter of background: DNA repair pathways as a possible cause for the sparse distribution of CRISPR-Cas systems in bacteria. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. v. 374, n. 1772, p. 20180088, 2019.

BI, J.; WANG, Y.F. The effect of the endosymbiont *Wolbachia* on the behavior of insect hosts. **Insect science**, p. 1-32, 2019.

BIAN, G.; XU, Y.; LU, P.; XIE, Y.; XI, Z. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Pathology**, v. 6 n.4, p. 1-32, 2010.

BINETRUY, F.; DUPRAZ, M.; BUYSSE, M.; DURON, O. Surface sterilization methods impact measures of internal microbial diversity in ticks. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 268, 2019.

BITAM, I.; DITTMAR, K.; PAROLA, P.; WHITING, M. F.; RAOULT, D.L. Fleas and flea-borne diseases. **International journal of infectious diseases**, v. 14, n. 8, p. e667-e676, 2010.

BLANTON L. S.; WALKER D. H. Flea-borne rickettsioses and rickettsiae. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 96, n. 1, p. 53-56, 2017.

BOIOCCHI, F.; DAVIES, M. P.; HILTON, A. C. AN Examination of Flying Insects in Seven Hospitals in the United Kingdom and Carriage of Bacteria by True Flies (Diptera: Calliphoridae, Dolichopodidae, Fanniidae, Muscidae, Phoridae, Psychodidae, Sphaeroceridae). **Journal of Medical Entomology**, v. 56, p. 1684-1697, 2019.

BORDENSTEIN, S. R.; THEIS, K. R. Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. **PLoS biology**, v. 13, p. 8: e1002226, 2015.

BOUYER, D. H.; STENOS, J.; CROCQUET-VALDES, P.; MORON, C. G.; POPOV, V. L.; ZAVALA-VELAZQUEZ, J. E.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 2, p. 339-347, 2001.

BRINKER, P.; FONTAINE, M.C.; BEUKEBOOM, L. W.; SALLES, J.F. Host, symbionts, and the microbiome: the missing tripartite interaction. **Trends in microbiology**, v.27, p. 480-488, 2019.

BROUNS, S. J.; JORE, M. M.; LUNDGREN, M.; WESTRA, E. R.; SLIJKHUIS, R. J.; SNIJDERS, A. P.; VAN DER OOST, J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. **Science**, v.321, n.5891, p. 960-964, 2008.

BUARQUE, D. S.; GOMES, C. M.; ARAÚJO, R. N.; PEREIRA, M. H.; FERREIRA, R. C.; GUARNERI, A. A.; TANAKA, A. S. A new antimicrobial protein from the anterior midgut of *Triatoma infestans* mediates *Trypanosoma cruzi* establishment by controlling the microbiota. **Biochimie**, v. 123, p. 138-143, 2016.

BURSTEIN, D.; SUN, C. L.; BROWN, C.T.; SHARON, I.; ANANTHARAMAN, K.; PROBST, A.J., ...& BANFIELD, J.F. Major bacterial lineages are essentially devoid of CRISPR-Cas viral defence systems. **Nature communications**, feb, 2016, v.7, n.10613, 2016.

CABELLO, R.R.; RUIZ, A.C.; FERREGRINO, R.R.; ROMERO, L.C.; FERREGRINO, R.R.; ZAVALA, J.T. *Dipylidium caninum* infection. **BMJ case reports**, bcr0720114510. 2011.

CAO, Y.; FANNING, S.; PROOS, S.; JORDAN, K.; SRIKUMAR, S. A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p. 1-16, 2017.

CARAGATA, E. P, TIKHE, C. V, DIMOPOULOS, G. Curious entanglements: interactions between mosquitoes, their microbiota, and arboviruses. **Current opinion in virology**. Aug 2019 v.1, n.37, p.26-36, 2019.

CARAGATA, E. P.; DUTRA, H. L.; MOREIRA, L. A. Exploiting intimate relationships: controlling mosquito-transmitted disease with *Wolbachia*. **Trends in parasitology**, v. 32, n. 3, p. 207-218, 2016.

CARTHEY, A. J.; BLUMSTEIN, D. T.; GALLAGHER, R. V.; TETU, S. G.; GILLINGS, M. R. Conserving the holobiont. **Functional Ecology**, p. 1-31, 2020.

CARTHEY, A.J.; BLUMSTEIN, D.T.; GALLAGHER, R.V.; TETU, S.G.; GILLINGS, M.R. Conserving the holobiont. **Functional Ecology**, p. 1-31, 2020.

CARVALHO, V. M.; SPINOLA, T.; TAVOLARI, F.; IRINO, K.; OLIVEIRA, R. M.; RAMOS, M. C. C. Infecções do trato urinário (ITU) de cães e gatos: etiologia e resistência aos antimicrobianos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 62-70, 2014.

CAUMO, K. S.; DUARTE, M.; CARGNIN, S. T.; RIBEIRO, V. B.; TASCA, T.; MACEDO, A. J. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato: revista de divulgação de educação, ciência e tecnologia**. Novo Hamburgo, RS. v. 11, n.16, p.89-188, 2010.

CHAKRABORTY, S.; SNIJDERS, A. P.; CHAKRAVORTY, R.; AHMED, M.; TAREK A. M. Comparative network clustering of direct repeats (DRs) and cas genes confirms the

possibility of the horizontal transfer of CRISPR locus among bacteria. **Mol Phylogenet Evol**, v.56, n.3, p. 878-887, 2010.

CHANDEL, K.; MENDKI, M. J.; PARIKH, R. Y.; KULKARNI, G.; TIKAR, S. N., SUKUMARAN, D.; VEER, V. Midgut microbial community of *Culex quinquefasciatus* mosquito populations from India. **PloS one**, v.8, n.11, 2013.

CHUN-HONG, L.; JIE, C.; YONG-ZHI, Z.; HOU-SHUANG, Z. H. A. N. G.; HAI-YAN, G. O. N. G.; JIN-LIN, Z. The Midgut Bacterial Flora of Laboratory-Reared Hard Ticks, *Haemaphysalis longicornis*, *Hyalomma asiaticum*, and *Rhipicephalus haemaphysaloides*. **Journal of Integrative Agriculture**, 2014.

CLARK, N. J.; SEDDON, J. M.; ŠLAPETA, J.; WELLS, K. Parasite spread at the domestic animal-wildlife interface: anthropogenic habitat use, phylogeny and body mass drive risk of cat and dog flea (*Ctenocephalides* spp.) infestation in wild mammals. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 8, 2018.

CLIFTON, S.M.; KIM, T.; CHANDRASHEKHAR, J.H.; O'TOOLE, G.A.; RAPTI, Z.; WHITAKER, R. J. Lying in Wait: Modeling the Control of Bacterial Infections via Antibiotic-Induced Proviruses. **MSystems**, v. 4, n. 5, p. e00221-19, 2019.

COLES, T.B.; DRYDEN, M. W. Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 8, 2014.

CRKVENCIC, N.; ŠLAPETA, J. Climate change models predict southerly shift of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) distribution in Australia. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 137, 2019.

CZEKAJ, T.; CISZEWSKI, M.; SZEWCZYK, E.M. Staphylococcus haemolyticus—an emerging threat in the twilight of the antibiotics age. **Microbiology**, v. 161, n. 11, p. 2061-2068, 2015.

D. HUBÁLEK, Z. Identificação baseada no gene 16S rRNA da flora bacteriana cultivada dos carrapatos *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* e *Haemaphysalis concinna*, vetores de patógenos vertebrados. **Folia Microbiol**, v.54, n.419, 2009.

DANCER, S. J.; SHEARS, P.; PLATT, D. J. Isolation and characterization of coliforms from glacial ice and water in Canada's High Arctic. **Journal of applied microbiology**, v. 82, n. 5, p. 597-609, 1997.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 443- 449, 2000.

DE AVELAR, D. M. Endossimbiontes de *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) de cães vadios de Belo Horizonte, MG–Brasil. 2006. 114f. **Dissertação de mestrado** – Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

DE PAEPE, M.; LECLERC, M.; TINSLEY, C. R.; PETIT, M. A. Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, n.39, 2014.

DÍAZ-SÁNCHEZ S.; ESTRADA-PEÑA A.; CABEZAS-CRUZ A.; DE LA FUENTE J. Evolutionary insights into the tick hologenome. **Trends in parasitology**. 2019 Jul 19.

DICKINSON A.W.; POWER A.; HANSEN M. G.; BRANDT K. K.; PILIPOSIAN G, APPLEBY P, O'NEILL P. A.; JONES R. T.; SIEROCINSKI P.; KOSKELLA B.; VOS M. Heavy metal pollution and co-selection for antibiotic resistance: A microbial palaeontology approach. **Environment international**, v. 1, n. 132, p. 105-117, 2019.

DIEP, B. A.; GILL, S. R.; CHANG, R. F.; PHAN, T. H.; CHEN, J. H.; DAVIDSON, M. G.; SENSABAUGH, G. F. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet** v. 367, p. 731–739. 2006.

DISSANAYAKE, A. J.; PURAHONG, W.; WUBET, T.; HYDE, K. D.; ZHANG, W.; XU, H.; ZHANG, G.; FU, C.; LIU, M.; XING, Q.; LI X. Direct comparison of culture-dependent and culture-independent molecular approach reveal the diversity of fungal endophytic communities in stems of grapevine (*Vitis vinifera*). **Fungal Diversity**, v. 90(1), p. 85-107, 2018.

DOTTO, G.; BERLANDA, M.; PASOTTO, D.; MONDIN, A.; ZAMBOTTO, G, MENANDRO, M. L. Pets as potential carriers of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* of significance to public health. **The new microbiologica**. 2018 Apr v.1;41(2), p. 168-72, 2018.

DRYDEN, M. W.; RUST, M. K. The cat flea: biology, ecology and control. **Veterinary Parasitology**, v. 52, n. 1-2, p. 1-19, 1994.

DUGUMA, D.; HALL, M. W, SMARTT, C. T, DEBBOUN, M.; NEUFELD, J. D. Variações de microbiota no mosquito vetor da doença de *Culex nigripalpus* do vírus do Nilo Ocidental e da encefalite de Saint Louis de diferentes origens geográficas. **PeerJ**, v.6, e6168, 2019.

DURAND, G. A.; RAOULT, D.; DUBOURG, G. Antibiotic discovery: History, methods and perspectives. **International journal of antimicrobial agents**, v. 53.4, p. 371-382, 2019.

DURDEN, L.A.; HINKLE, N.C. Fleas (Siphonaptera). In: Medical and Veterinary Entomology. **Academic Press**, p. 145-169, 2009.

DURON, O.; BINETRUY, F.; NOËL, V.; CREMASCHI, J.; MCCOY, K.D.; ARNATHAU, C.; PLANTARD, O.; GOOLSBY, J.; PÉREZ DE LEÓN, A.A.; HEYLEN, D.J.; VAN, OOSTEN, A.R. Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. **Molecular ecology**, v. 26(11), p. 2905-2921, 2017.

DURON, O.; MOREL, O.; NOËL, V.; BUYSSE, M.; BINETRUY, F.; LANCELOT, R.; VIAL, L. Tick-bacteria mutualism depends on B vitamin synthesis pathways. **Current Biology**, v. 28, n. 12, p. 1896-1902. e5, 2018.

EGYED, L.; MAKRAI, L. Cultivable internal bacterial flora of ticks isolated in Hungary. **Experimental and Applied Acarology**, v. 63, n. 1, p. 107-122, 2014.

ELBEDIWI, M.; LI, Y.; PAUDYAL, N.; PAN, H.; LI, X.; XIE, S.; YUE, M. (2019). Carga Global de Bactérias Resistentes a Colistina: Estudo Mobilizado de Genes de Resistência à Colistina (1980-2018). **Microrganismos**, v. 7 (10), p. 461, 2019.

ERICKSON, D.L.; ANDERSON, N.E.; CROMAR, L.M.; JOLLEY, A. Bacterial Communities Associated With Flea Vectors of Plague. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 6, p.1532-1536, 2009.

FIŠAROVÁ, L.; PANTŮČEK, R.; BOTKA, T.; DOŠKAŘ, J. Variabilidade dos plasmídeos de resistência em estafilococos coagulase-negativos e sua importância como reservatório de resistência antimicrobiana. **Pesquisa em microbiologia**, v. 170, n. 2, p. 105-111, 2019.

FONTANA, C.; FAVARO, M.; PELLICCIONI, M.; PISTOIA, E, S.; FAVALLI, C. Use of the MicroSeq 500 16S rRNA gene-based sequencing for identification of bacterial isolates that commercial automated systems failed to identify correctly. **Journal of clinical microbiology**, v. 43(2), p.615-619, 2005.

FONTANA, R.; WETLER, R. M. D. C.; AQUINO, R. S.; ANDRIOLI, J. L.; QUEIROZ, G. R.; FERREIRA, S. L.; DELABIE, J. H. Pathogenic bacteria dissemination by ants (Hymenoptera: Formicidae) in two hospitals in northeast Brazil. **Neotropical entomology**, v.39(4), p. 655-663, 2010.

FREDENSBORG, B.L.; FOSSDAL, Í.; KÁLVALÍÐ, I.; JOHANNESSEN, T.B.; STENSVOLD, C.R.; NIELSEN, H.V.; KAPEL, C.M. Parasites modulate the gut-microbiome in insects: A proof-of-concept study. **PloS one**, v.15(1), e0227561, p 1-18, 2020.

FURUYA, E.Y, LOWY FD.; FRANKLIN D. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. **Nat Rev Microbiol** v.4, n. 36, p.45, 2006.

GAO, H.; CUI, C.; WANG L.; JACOBS-LORENA, M.; WANG, S. Mosquito Microbiota and Implications for Disease Control. **Trends in Parasitology**, v. 36, p. 98-111, 2019.

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

GARG, *Staphylococcus cohnii*: Not so innocuous. **Journal of Acute Disease**, v.5, p. 239, 2019.

GIGUÈRE, S., PRESCOTT, J. F., BAGGOT, J. D., WALKER, R. D., & DOWLING, P. M. TERAPIA antimicrobiana em medicina veterinária. **Roca**, São Paulo. P. 683, 2010.

GÓMEZ-SANZ, E.; CEBALLOS, S.; RUIZ-RIPA, L.; ZARAZAGA, M., TORRES, C. (2019). Clonally Diverse Methicillin and Multidrug Resistant Coagulase Negative Staphylococci Are Ubiquitous and Pose Transfer Ability Between Pets and Their Owners. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p. 485, 2019.

GORHAM, C. H.; FANG, Q. Q.; DURDEN, L. A. *Wolbachia* endosymbionts in fleas (Siphonaptera). **Journal of Parasitology**, v.89.2, p. 283-289, 2003.

GREAY, T.L, GOFTON AW, PAPANINI A, RYAN UM, OSKAM CL, IRWIN PJ. Recent insights into the tick microbiome gained through next-generation sequencing. *Parasites & vectors*, v. 11(1), p.12, 2018.

GRENNI, P.; ANCONA, V.; CARACCILO, A.B. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. **Microchemical Journal**, v. 136, p. 25-39, 2018.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Princípios da utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais. **Guia de antimicrobianos em veterinária**, p. 17-30, 2010.

GURUNG, K.; WERTHEIM, B.; FALCAO S.J. The microbiome of pest insects: it is not just bacteria. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 167, n. 3, p. 156-170, 2019.

HADRICH, D. Microbiome research is becoming the key to better understanding health and nutrition. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 212, 2018.

HALOS, LÉNAÏG.; BEUGNET, F.; CARDOSO, L.; FARKAS, R., FRANC, M., GUILLOT, J.; WALL, R. Flea control failure? Myths and realities. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 5, p. 228-233, 2014.

HARTANTYO, S.H.; CHAU, M.L.; FILLON, L.; ARIFF, A.Z.; KANG, J.S.; AUNG, K.T.; GUTIÉRREZ, R.A. Sick pets as potential reservoirs of antibiotic-resistant bacteria in Singapore. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v.7, n.1, p.106, 2018.

HEADLEY, S. A.; SCORPIO, D. G.; VIDOTTO, O.; DUMLER, J. S. NEORICKETTSIA helminthoeca and salmon poisoning disease: a review. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 2, p. 165-173, 2011.

HEALY, S. P.; BROWN, L.D.; HAGSTROM, M. R.; FOIL, L. D.; MACALUSO, K. R. Effect of *Rickettsia felis* strain variation on infection, transmission, and fitness in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of medical entomology**, v. 54(4), p. 1037-1043, 2017.

HESSE, S.; ADHYA, S. Phage Therapy in the Twenty-First Century: Facing the Decline of The Antibiotic Era; Is it Finally Time for The Age of the Phage? **Annual review of microbiology**, v. 73, 2019.

HIGGINS, J.A.; SACCI Jr, J.B.; SCHIEFER, M.E.; ENDRIS, R.G.; AZAD, A.F. Molecular identification of rickettsia-like microorganisms associated with colonized cat fleas (*Ctenocephalides felis*). **Insect Molecular Biology**, v. 3, n.1, p.27–33, 1994.

HIRUNKANOKPUN, S.; THEPPARIT, C.; FOIL, L. D.; MACALUSO, K. R. Horizontal transmission of *Rickettsia felis* between cat fleas, *Ctenocephalides felis*. **Molecular ecology**, v. 20, n. 21, p. 4577-4586, 2011.

HORTA, M. C.; SCOTT, F. B.; CORREIA, T. R.; FERNANDES, J. I.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia felis* infection in cat fleas *Ctenocephalides felis felis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41(3), p. 813-818, 2010.

HUNTER, D. J., TORKELSON, J. L., BODNAR, J., MORTAZAVI, B., LAURENT, T., DEASON, J.; ZHONG, J. The *Rickettsia* endosymbiont of *Ixodes pacificus* contains all the genes of de novo folate biosynthesis. **PLoS one**, v. 10, n. 12, 2015.

HYDE, J.; GORHAM, C.; BRACKNEY, D.E.; STEVEN, B. Antibiotic resistant bacteria and commensal fungi are common and conserved in the mosquito microbiome. **PLoS one**, 2019, v.14, p.8, 2019.

IGNASIAK, K.; MAXWELL, A. Antibiotic-resistant bacteria in the guts of insects feeding on plants: prospects for discovering plant-derived antibiotics. **BMC microbiology**, 17(1), 223, 2017.

JIANG, W.; MANIV, I.; ARAIN, F.; WANG, Y.; LEVIN, B.R.; MARRAFFINI, L.A. Dealing with the evolutionary downside of CRISPR immunity: bacteria and beneficial plasmids. **PLoS genetics**, v.9(9), e1003844, 2013.

JOHNSON, K. The impact of Wolbachia on virus infection in mosquitoes. **Viruses**, v. 7, n. 11, p. 5705-5717, 2015.

JONES, R.T.; KNIGHT, R.; MARTIN, A.P. Bacterial communities of disease vectors sampled across time, space, and species. **The ISME Journal**, v. 4, n. 2, p. 223, 2009.

KAKASIS, A.; PANITSA, G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. **International journal of antimicrobial agents**, v. 53, n. 1, p. 16-21, 2019.

KHAN, H. A. A.; AKRAM, W.; FATIMA, A. Resistance to pyrethroid insecticides in house flies, *Musca domestica* L., (Diptera: Muscidae) collected from urban areas in Punjab, Pakistan. **Parasitology research**, v.116, n.12, p. 3381-3385, 2017.

KARIMI, Z.; AHMADI A.; NAJAFI, A.; RANJBAR, R. Bacterial CRISPR regions: general features and their potential for epidemiological molecular typing studies. **The open microbiology journal**, v.12, p.59, 2018.

KAUR, P.; PETERSON, E. Mecanismos de resistência a antibióticos em bactérias: relações entre determinantes de resistência de produtores de antibióticos, bactérias ambientais e patógenos clínicos. **Frontiers in Microbiology**, v. 9: 2928, 20 p.1-21,2018.

KELLY, P. H.; BAHR, S. M.; SERAFIM, T. D.; AJAMI, N. J.; PETROSINO, J. F.; MENESES, C.; WILSON, M. E. The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. **MBio**, v. 8, n. 1, p. e01121-16, 2017.

KOHL, T.; PONTAROLO, G.H.; PEDRASSANI, D. Resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de amostras de animais atendidos em hospital veterinário. **Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar**, v. 5, n. 2, p. 115-127, 2016.

KOYLE, M. L.; VELOZ, M.; JUDD, A. M.; WONG, A. C.; NEWELL, P. D.; DOUGLAS, A. E.; CHASTON, J. M. Rearing the fruit fly *Drosophila melanogaster* under axenic and gnotobiotic conditions. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 113, 2016.

KUMBHARE, M. R.; SURANA A. R.; ABHALE, A. U.; BHOIR, A. A.; AGRAWAL S. P. An Updates on Antibiotic Resistance. **Drug Designing & Intellectual Properties International Journal India**, 01.03.2019. v.2 p. 1-5, 2019.

LAGIER, J. C.; ARMOUGOM, F.; MILLION, M.; HUGON, P.; PAGNIER, I.; ROBERT, C.; TRAPE, J. F. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 12, p. 1185-1193, 2012.



LAGIER, J. C.; KHELAIPIA, S.; ALOU, M. T.; NDONGO, S.; DIONE, N.; HUGON, P.; DURAND, G. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota culturomics. **Nature microbiology**, v. 1, n. 12, p. 1-8, 2016.

LALZAR, I.; HARRUS, S.; MUMCUOGLU, K. Y.; GOTTLIEB, Y. Composition and seasonal variation of *Rhipicephalus turanicus* and *Rhipicephalus sanguineus* bacterial communities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.78, n.12, p.4110-4116, 2012.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n.20, p. 6955–6959, 1985.

LAU, C. H. F.; VAN E. K.; GORDON, S.; RENAUD, J.; TOPP, E. N. Antibiotic resistance determinants from agricultural soil exposed to antibiotics widely used in human medicine and animal farming. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 83, p.16, 2017.

LAUDADIO, I.; FULCI, V.; STRONATI L.; CARISSIMI, C. Next-generation metagenomics: Methodological challenges and opportunities. **Omics: a journal of integrative biology**, v.23, n.7, p.327-33, 2019.

LAWRENCE, A. L.; HIL, S. F.; CHONG R.; WEBB, C. E.; TRAUB, R.; BROWN, G.; ŠLAPETA, J. Evaluation of the bacterial microbiome of two flea species using different DNA-isolation techniques provides insights into flea host ecology. **FEMS microbiology ecology**, vol. 91.12, 2015.

LAWRENCE, A.; WEBB, C. E.; CLARK, N. J.; HALAJIAN, A.; MIHALCA, A. D.; MIRET, J.; ŠLAPETA, J. Out-of-Africa, human-mediated dispersal of the common cat flea, *Ctenocephalides felis*: the hitchhiker's guide to world domination. **International journal for parasitology**, v. 49, n. 5, p. 321-336, 2019.

LEDERBERG, J.; MCCRAY, A.T. Ome SweetOmics--A genealogical treasury of words. **The Scientist**, v.15.7, p 8-8, 2001.

LEVISON, M. E.; KAYE, D. Treatment of complicated urinary tract infections with an emphasis on drug-resistant gram-negative uropathogens. **Current infectious disease reports**, v15, n.2, p.109-115, 2013.

LFANO, N.; TAGLIAPIETRA, V.; ROSSO, F.; MANICA, M.; ARNOLDI, D.; PINDO, M.; RIZZOLI, A. Changes in Microbiota Across Developmental Stages of *Aedes koreicus*, an Invasive Mosquito Vector in Europe: Indications for Microbiota-based Control Strategies. **Frontiers in Microbiology**. v.10, n.2832, p. 1-15, 2019.

LINARDI, P. M. SANTOS J. L. C. *Ctenocephalides felis felis* vs *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): algumas questões identificam corretamente estas espécies. *Rev Bras Parasitol Vet.* v.21, n.4, p.345-54, 2012.

LINARDI, P.M. Checklist of Siphonaptera (Insecta) from Mato Grosso State, Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, p.107, 2017.

LINARDI, P.M. Checklist de Siphonaptera (Insecta) from São Paulo State, Brazil. **Biota Neotropical**, vol. 11, p. 607-617, 2011.

LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; YU, L. F. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

LONCARIC, I.; KÜBBER-HEISS, A.; POSAUTZ, A.; STALDER, G. L.; HOFFMANN, D.; ROSENGARTEN, R.; WALZER, C. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. carrying the *mecC* gene, isolated from wildlife. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 10, p. 2222-2225, 2013.

LOPEZ-ORDONEZ, T.; FLORES-LÓPEZ, C. A.; MONTEJO-LOPEZ, R.; CRUZ-HERNANDEZ, A.; CONNERS, E. E. Cultivable Bacterial Diversity in the Gut of the Chagas Disease Vector *Triatoma dimidiata*: Identification of Possible Bacterial Candidates for a Paratransgenesis Approach. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v.5, p. 174, 2018.

LUCERO-VELASCO, E. A.; MOLINA-GARZA, Z. J.; GALAVIZ-SILVA, L. First survey of cultivable bacteria from *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and assessment of the antagonism against five microorganisms of clinical importance. *International Journal of Acarology*, v. 44, n. 4-5, p. 204-209, 2018.

MA, G. C. WORTHING, K. A.; WARD, M. P.; NORRIS, J. M. Estafilococos Comensais Incluindo *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina de Cães e Gatos em Remote New South Wales, Austrália. **Microb Ecol**, p. 1-11, 2019.

MALEKI-RAVASAN, N.; OSHAGHI, M. A.; AFSHAR, D.; ARANDIAN, M. H.; HAJIKHANI, S.; AKHAVAN, A. A.; AMINIAN, K. Aerobic bacterial flora of biotic and abiotic compartments of a hyperendemic Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) focus. **Parasites & vectors**, v.8(1), p. 63, 2015.

MAGNET, S; BLANCHARD, J, S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. **Chemical reviews**, v.9 n.105(2), p.477-98, 2005.

MAKAROVA, K.S.; HAFT, D. H.; BARRANGOU, R., BROUNS, S. J., CHARPENTIER, E., HORVATH, P.; VAN DER OOST, J. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 467, 2011.

MARIA, C. K.; KIPPER M.; ANDRETTA, I.; MACHADO L. R. A. Withdrawal of antibiotic growth promoters from broiler diets: performance indexes and economic impact. **Poultry science**, v. 98(12), p. 6659-67, 2019.

MARKO, M. Science is a war zone: some comments on Brazil, Tapuya: **Latin American Science, Technology and Society**, v. 3, n.1, p. 4-8, 2020.

MARRAFFINI L.A.; SONTHEIMER EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. **Science**, v.322, n.5909, p.1843-5, 2008.

MARTINEZ, J.; LONGDON, B.; BAUER, S.; CHAN, Y.S.; MILLER, W. J.; BOURTZIS, K.; JIGGINS, F.M. Symbionts commonly provide broad spectrum resistance to viruses in insects: a comparative analysis of *Wolbachia* strains. **PLoS pathogens**, v.10(9), e1004369, 2014.

MCINTOSH, D.; CUNNINGHAM, M.; JI, B.; FEKETE, F.A.; PARRY, E.M.; CLARK, S.E.; ZALINGER, Z. B.; GILG, I.C.; DANNER, G.R.; JOHNSON, K. A.; BEATTIE, M. Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an *IncA/C* plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61(6), p. 1221-8, 2008.

MENEGUZZI, M.; PISSETTI, C.; REBELATTO, R.; KUCHIISHI, S. S.; COSTA, A. T. R.; GUEDES, R. M. C.; KICH, J. D. Resistência à colistina em isolados de salmonella de casos clínicos de suínos no Brasil. In: Embrapa Suínos e Aves-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO DA ABRAVES, Goiânia. Suinocultura brasileira na era da tecnologia e da sustentabilidade: **anais. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves**, v. 1, p. 27-28, 2017.

MERRIL, C. R.; BISWAS, B.; CARLTON, R.; JENSEN, N. C.; CREED, G.J.; ZULLO, S.; ADHYA, S. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 8, p. 3188-3192, 1996.

MIRZAEI, M. K.; MAURICE, C. F. Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. **Nature Reviews Microbiology**, v.15(7), p. 397, 2017.

MOHANTY, I.; RATH A.; SWAIN S.P.; PRADHAN, N.; HAZRA, R.K. Wolbachia Population in Vectors and Non-vectors: A Sustainable Approach Towards Dengue Control. **Current microbiology**, v.76(2), p. 133-43, 2019.

MONTEIRO, M. Science is a war zone: some comments on Brazil, Tapuya: Latin American Science, **Technology and Society**, v. 3, p. 4-8, 2020.

MURRELL, A.; DOBSON, S. J.; YANG, X.; LACEY, E.; BARKER, S. C. A survey of bacterial diversity in ticks, lice and fleas from Australia. **Parasitology Research**, v. 89, n. 4, p. 326-334, 2003.

NARASIMHANE, S.; FIKRIG, E. Tick microbiome: the force within. **Trends in parasitology**, v. 31, n. 7, p. 315-323, 2015.

NISBET, A. J.; HUNTLEY, J. F. Progress and opportunities in the development of vaccines against mites, fleas and myiasis-causing flies of veterinary importance. **Parasite immunology**, v.28(4), p. 165-172, 2006.

NOVÁKOVÁ, D.; SEDLÁČEK, I.; PANTŮČEK, R.; ŠTĚTINA, V.; ŠVEC, P.; PETRÁŠ, P. *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens. **Journal of medical microbiology**, v.55, n.5, p. 523-528, 2006.

OSEI SEKYERE, J. Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. **MicrobiologyOpen**, v. 8.4, p. 1-21, 2019.

OSTRIA-HERNÁNDEZ, M.L.; SÁNCHEZ-VALLEJO, C.J.; IBARRA, J.A.; CASTRO-SCARPELLI, G. Survey of clustered regularly interspaced short palindromic repeats and their associated Cas proteins (CRISPR/Cas) systems in multiple sequenced strains of *Klebsiella pneumoniae*. **BMC research notes**, v.8(1), p. 332, 2015.

OVERMANN, J.; GARCIA-PICHEL, F. The Phototrophic Way of Life. **The Prokaryotes**. Springer, Heidelberg, p 203–257, 2013.

PANDYA, S.; RAVI, K.; SRINIVAS, V.; JADHAV, S.; KHAN, A.; ARUN, A.; RILEY, L. W.; MADHIVANAN, P. Comparison of culture-dependent and culture-independent molecular methods for characterization of vaginal microflora. **Journal of medical microbiology**, v. 66, n.2, p.149-153, 2017.

PEREIRA-MAIA, E. C.; SILVA, P. P.; ALMEIDA, W. B. D.; SANTOS, H. F. D.; MARCIAL, B. L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.

PERUZY, M. F.; MURRU, N.; YU, Z.; CNOCKAERT, M.; JOOSSENS, M.; PROROGA Y. T.; HOUF, K. Determination of the microbiological contamination in minced pork by culture dependent and 16S amplicon sequencing analysis. **International journal of food microbiology**, v. 290, p. 27-35, 2019.

PIOVEZAN, G. O argumento analógico de Darwin: a função da retórica entre o artificial e o natural. **Bakhtiniana. Revista de Estudos do Discurso**, v.14(2), p.88-111, 2019.

POLLET, T.; SPRONG, H.; LEJAL, E.; KRAWCZYK, A. I.; MOUTAILLER, S.; COSSON J. F.; VAYSSIER-TAUSSAT, M, Estrada-Peña A. The scale affects our view on the identification and distribution of microbial communities in ticks. **Parasites & Vectors**. v. 13, n.1, p.36, 2020.

POO-MUÑOZ, D. A.; ELIZONDO-PATRONE, C.; ESCOBAR, L. E., ASTORGA, F., BERMÚDEZ, S. E., MARTÍNEZ-VALDEBENITO, C.; MEDINA-VOGEL, G. Fleas and Ticks in Carnivores From a Domestic–Wildlife Interface: Implications for Public Health and Wildlife. **Journal of medical entomology**, v. 53, n. 6, p. 1433-1443, 2016.

POMBA, C.; COUTO, N.; MOODLEY, A. Treatment of a lower urinary tract infection in a cat caused by a multi-drug methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Enterococcus faecalis*. **Journal of feline medicine and surgery**, v.12, n.10, p. 802-806, 2010.

PORNWIROON, W.; KEARNEY, M.T.; HUSSENER, C.; FOIL, L.D.; MACALUSO, K.R. Comparative microbiota of *Rickettsia felis*-uninfected and -infected colonized cat fleas, *Ctenocephalides felis*. **The ISME Journal**, v.1, n.5, p. 394- 402, 2007.

PORNWIROON, W.; POURCIAU, S.S.; FOIL, L.D.; MACALUSO, K.R. *Rickettsia felis* from cat fleas: isolation and culture in a tick-derived cell line. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n.12: 5589–5595, 2006.

RADTKE, A.L.; O'RIORDAN, M.X.D. Intracellular innate resistance to bacterial pathogens. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1720-1729, 2006.

REESE, A.T.; DUNN, R. Drivers of microbiome biodiversity: a review of general rules, feces, and ignorance. **Mbio**, 9.4: e01294-18.2018.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p. 601-616, 2010.

RIGATTI, F.; TIZOTTI, M. K.; HÖRNER, R.; DOMINGUES, V.O.; MARTINI, R.; MAYER, L. E.; COSTA, M.M.D. Oxacillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci*

bacteremia at a teaching hospital in Santa Maria, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 686-690, 2010.

ROBERTS, M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS microbiology letters**, v. 245, n. 2, p. 195-203, 2005.

ROLAIN, J.M, M. FRANC, B. DAVOUST E D. RAOULT. Detecção molecular de *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis* e *Wolbachia pipientis* em pulgas de gatos, França. **Emerg. Infectar. Dis.** V.9 p.338 - 342. 2003

ROSSI, C.C.; DA SILVA D. I.; MUNIZ, I. M.; LILENBAUM, W.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. The oral microbiota of domestic cats harbors a wide variety of *Staphylococcus* species with zoonotic potential. **Veterinary microbiology**, v.201, p.136-140, 2017.

ROSSI, C. C.; FERREIRA, N.C.; COELHO, M.L.; SCHUENCK, R.P.; BASTOS, M.D. C.D.F.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Transfer of mupirocin resistance from *Staphylococcus haemolyticus* clinical strains to *Staphylococcus aureus* through conjugative and mobilizable plasmids. **FEMS microbiology letters**, v.14, p.363, 2016.

ROSSI, C. C.; SOUZA-SILVA T.; ARAÚJO-ALVES A.V.; GIAMBIAGI-DEMARVAL M. CRISPR-cas systems features and the gene-reservoir role of coagulase-negative *Staphylococci*. **Frontiers in microbiology**, v.15; n.8 p.1545, 2017.

RUDOLF, I.; MENDEL, J.; ŠIKUTOVÁ, S.; ŠVEC, P.; MASARÍKOVÁ, J.; NOVÁKOVÁ, RUST, M. The biology and ecology of cat fleas and advancements in their pest management: a review. **Insects**, v.8(4), p.118, 2017.

RUST, M.K.; DRYDEN, M.W. The biology, ecology, and management of the cat flea. **Annual review of entomology**, v. 42, n. 1, p. 451-473, 1997.

SAIMA, S., FIAZ, M., ZAFAR, R., AHMED, I., & ARSHAD, M. Dissemination of antibiotic resistance in the environment. In *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment*. **Elsevier**, p.99-116, 2020.

SALDAÑA, MA.; HEGDE, S.; HUGHES, GL.; Controle microbiano de doenças transmitidas por artrópodes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 2, p. 81-93, 2017.

SANKAR, S. A.; LAGIER, J. C.; PONTAROTTI, P.; RAOULT, D.; FOURNIER, P. E. The human gut microbiome, a taxonomic conundrum. **Systematic and applied microbiology**, v. 38, n. 4, p. 276-286, 2015.

SARIDAKI, A.; BOURTZIS, K. *Wolbachia*: more than just a bug in insect genitals. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 1, p. 67-72, 2010.

SCHOENFELDER, S. M.; LANGE, C.; ECKART, M.; HENNIG, S.; KOZYTSKA, S.; ZIEBUHR, W. Success through diversity—how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. **International Journal of medical microbiology**, v. 300, n. 6, p. 380-386, 2010.

SCOLARI, F, CASIRAGHI M, BONIZZONI M. *Aedes* spp. and their microbiota: a review. **Frontiers in microbiology**, v.10, n.2036, 2019.

SELVA, L.; VIANA, D.; REGEV-YOCHAY, G.; TRZCINSKI, K.; CORPA, J. M.; NOVICK, R.P.; PENADÉS, J.R. Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 4, p. 1234-1238, 2009.

SERIO, A.W.; MAGALHÃES, M.L.; BLANCHARD, J.S.; CONNOLLY, L.E. Aminoglycosides: Mechanisms of action and resistance. **In: Antimicrobial Drug Resistance** p.213-229, 2017.

SHEN, Z.; WANG, Y.; SHEN, Y.; SHEN, J.; WU, C. Early emergence of mcr-1 in *Escherichia coli* from food-producing animals. **The Lancet infectious diseases**, v.16(3), p. 293, 2016.

SILVA, H. V. V. A.; CASTAGNOLLI, K. C.; PRETTE, N.; BORGES, F. D. A.; MIYASAKA, D. D. S.; COSTA, A. J. D. Implantação de colônia de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) e determinação do período de desenvolvimento dos estágios imaturos sob condições controladas. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais** v. 4, n. 3, 2008.

SILVERMAN, J.; RUST, M. K. Extended longevity of the pre-emerged adult cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) and factors stimulating emergence from the pupal cocoon. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 78, n. 6, p. 763-768, 1985.

SIQUEIRA, S. R. R. Otimização e validação de método analítico para a determinação de cloranfenicol em alimentos de origem animal utilizando a técnica LC-ESI-MS-MS, **Dissertação em Ciência de Alimentos**, Campinas – SP, 2007.

SKURNIK, D, RUIMY, R, READY, D, RUPPE E, BERNÈDE-BAUDUIN C, DJOSSOU F, GUILLEMOT D, PIER GB, ANDREMONT A. Is exposure to mercury a driving force for the carriage of antibiotic resistance genes? **Journal of medical microbiology**, v.59(7), p.804-7, 2010.

SOLDERA, J.; NEDEL, W. L.; CARDOSO, P. R. C.; D'AZEVEDO, P. A. Bacteremia due to *Staphylococcus cohnii* ssp. *urealyticus* caused by infected pressure ulcer: case report and review of the literature. **Sao Paulo Medical Journal**, v.131, n.1, p. 59-61, 2013.

SONG, S.J.; LAUBER, C.; COSTELLO, K.E.; LOZUPONE, C.A; B, GREGORY HUMPHREY, B.G. et al. Os membros da família que coabitam compartilham microbiota entre si e com seus cães. **Elife**, v. 2, p. e00458, 2013.

SOUZA-NETO, J. A.; POWELL, J. R.; BONIZZONI, M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infection, Genetics and Evolution*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 67, p. 191-209, 2019.

SUPANEE, H.; CHUTIMA T.; LANE D. F.; KEVIN R. M. Transmissão horizontal de *Rickettsia felis* entre pulgas de gatos, *Ctenocephalides felis*, **Molecular Ecology**, v.20, n. 21 4577-4586, 2011.

TAMAMES, J.; COBO-SIMÓN, M.; PUENTE-SÁNCHEZ, F. Assessing the performance of different approaches for functional and taxonomic annotation of metagenomes. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-16, 2019.

TANG, K.L, C. N. P.; NÓBREGA, D. B.; CORK, S. C.; RONKSLEY, P. E.; BARKEMA H.W.; POLACHEK, A. J.; GANSHORN, H.; SHARMA, N.; KELLNER, J. D.; CHECKLEY S. L. Comparison of different approaches to antibiotic restriction in food-producing animals: stratified results from a systematic review and meta-analysis. **BMJ global health**. v.4(4) e001710, 2019.

TAYLOR, M. MEDIANNIKOV, O.; RAOULT, D.; GREUB, G. Endosymbiotic bacteria associated with nematodes, ticks and amoebae. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 21-31, 2012.

TAYLOR, M.J.; VORONIN, D., JOHNSTON, K.L.; FORD, L. *Wolbachia* filarial interactions. **Cellular microbiology**, v. 15, n. 4, p. 520-526, 2013.

TEIXEIRA, C. F. Estafilococos coagulase-negativa: um risco real para a saúde pública. 2009. 93 f. **Tese Doutorado em Vigilância Sanitária**- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

TIPTON, L.; DARCY, J. L.; HYNSON, N. A. A developing symbiosis: enabling cross-talk between ecologists and microbiome scientists. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 292, 2019.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, Berdell R. Microbiologia-12ª Edição. **Artmed Editora**, p.190, 2016.



TRINGE, S. G.; HUGENHOLTZ, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, n. 5, p. 442-446, 2008.

VALIENTE, M. C.; THIOULOUSE, J.; CHAUVE, C.; NORMAND, P.; ZENNER, L. Táxons bacterianos associados ao ácaro hematófago *Dermanyssus gallinae* detectados por amplificação por PCR 16S rRNA e impressão digital TTGE. **Res. Microbiol.** V. 160, p. 63-70.

VAN BELLEGHEM, J.; DĄBROWSKA, K., VANECHOUTTE, M., BARR, J.; BOLLYKY, P Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system. *Viruses*, v. 11, n. 1, p. 10, 2019.

VASCONCELLOS, E. J.; BILLETER, S. A.; JETT, L. A.; MEINRSMANN, R. J.; BARR, M. C.; DINIZ, P. P.; OAKLEY, B. B. Assessing Cat Flea Microbiomes in Northern and Southern California by 16S rRNA Next-Generation Sequencing. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.18(9), p.491-499, 2018.

VAZ-MOREIRA, I.; FERREIRA, C.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Sources of Antibiotic Resistance: Zoonotic, Human, Environment. **Antibiotic Drug Resistance**, p.211-238, 2019.

VETSMART. Disponível em: < <https://www.vetsmart.com.br/>>. Acesso em: 12/10/2019.

WANG, Y.; QIAN, P-Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS One**, v. 4, n. 10, 2009.

WATERFIELD, N.R.; WREN, B.W. Invertebrates as a source of emerging human pathogens. **Nature Reviews in Microbiology**, v.2, n. 6, p.833-841, 2004.

WEAVER, SC.; COSTA, F.; GARCIA-BLANCO, MA.; KO AI, RIBEIRO GS.; SAADE G. Zika vírus: história, emergência, biologia e perspectivas de controle. **Pesquisa antiviral**. V.130, p. 69-80. 2016.

WEESE, WILLIAM, C.; SMITH, IAN M. A study of 57 cases of actinomycosis over a 36-year period: A diagnostic failure with good prognosis after treatment. *Archives of internal medicine*, v.135, n.12, p.1562-1568, 1975.

WEDINCAMP, J.; FOIL, L. D. *Rickettsia felis* infection in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Entomological Science**, v. 38, n. 2, p.234–239, 2003.

WEISS, S.; KADLEC, K.; FESSLER, A. T.; SCHWARZ, S. Identification and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus pettenkoferi* from a small animal clinic. **Veterinary microbiology**, v. 167, n. 3-4, p. 680-685, 2013.

WEISS, B.; AKSOY, S. Microbiome influences on insect host vector competence. **Trends in Parasitology**, p. 514–522, 2011.

WESTRA, E. R., VAN HOUTE, S., GANDON, S.; WHITAKER, R. The ecology and evolution of microbial CRISPR-Cas adaptive immune systems, **the Royal Society**, p 1-8, 2019.

YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P. Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 135, 2016.

YEHUALAESHET, T.; WIGGINS G. E.; JONES, C.; GRAHAM, M.; Kaylyn DILLARD, k.; AOI, N.; SAMUEL, T. Microbioma bacteriano de zangatoas nasais de cões saudáveis e seus donos: diversidade bacteriana, interface intra e interespecies. *Int J Vet Anim Med*, v. 2, n. 2, p. 120, 2019.

ZILBER-ROSENBERG, Ilana; ROSENBERG, Eugene. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. **FEMS microbiology reviews**, v.32.5, p.723-735, 2008.

ZION MARKET. "Mercado de parasiticidas de animais por tipo de produto (endoparasiticidas, ectoparasiticidas e endectocidas), por tipo de animal (gatos, cães, porcos, Bovinos, caprinos, ovinos e outros) e por usuário final (instalações de P&D, fazendas e clínicas veterinárias): perspectiva global da indústria, análise abrangente e previsão, 2018-2025", Nova York, NY, **Zion Market**, 2019.

ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Bad guys turned nice? A critical assessment of Wolbachia mutualisms in arthropod hosts. **Biological Reviews**, v. 90, n. 1, p. 89-111, 2015.

ZUREK, L.; GHOSH, A. Insects represent a link between food animal farms and the urban environment for antibiotic resistance traits. **Appl. Environ. Microbiol**, v.80, n.12, p. 3562-3567, 2014.

ZUREK, L.; SCHAL, C.; WATSON, D. W. Diversity and contribution of the intestinal bacterial community to the development of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae. **Journal of Medical Entomology**, v.37, n.6, p. 924-928, 2000.

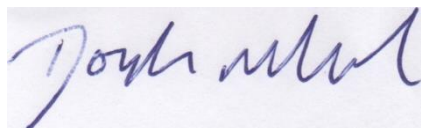
Declaração;

Assunto; Assinaturas na Folha de Aprovação da Dissertação

Este documento serve para afirmar que as assinaturas presentes na Folha de Aprovação da Dissertação, intitulada "Análise da Microbiota Cultivável Associada com uma colônia laboratorial de *Ctenocephalides felis*. Siphonaptera, Pulicidae)" apresentada pela candidata Tatiana Werneck Franco e aprovada no dia 19/02/2020, representam os nomes do Presidente da Banca (Professor Douglas McIntosh) e dos Membros Titulares: Professora Maria Halina Ogrzewalska (FIOCRUZ) e Professora Thais Ribeiro Correia Azevedo (UFRRJ).

A ausência, das assinaturas dos Membros Suplentes da Banca: Professora Irene da Silva Coelho (UFRRJ) e Dr. Stefan Schwab (EMBRAPA), justifica-se pelo fato de não ter sido exigida sua participação na avaliação da Dissertação, e como resultado, nenhum deles estava presente no dia da defesa da Dissertação.

Atenciosamente.



Prof. Douglas McIntosh (Matricula Siape 1354903)

Presidente da Banca e Orientador do Mestrado

Seropédica, Rio de Janeiro

10 novembro de 2020