

**UFRRJ**

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE

Desafios na caracterização e na análise da resistência antimicrobiana de espécies bacterianas oriundas de diferentes ambientes animais com uma abordagem em Saúde Única

Thérèsse Camille Nascimento Holmström

2022



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

Desafios na caracterização e na análise da resistência antimicrobiana de espécies bacterianas na Medicina Veterinária com uma abordagem em Saúde Única

THÉRÈSSE CAMILLE NASCIMENTO HOLMSTRÖM

*Sob a Orientação da Professora*  
**Dr<sup>a</sup> Miliane Moreira Soares de Souza**

*Co-orientação da Professora*  
**Dr<sup>a</sup> Irene da Silva Coelho**

*e Co-orientação da Professora*  
**Dr<sup>a</sup> Dayanne Araújo de Melo**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ  
Abril de 2022

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

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

H747d Holmström, Thérèse Camille Nascimento, 1988-  
Desafios na caracterização e na análise da  
resistência antimicrobiana de espécies bacterianas  
oriundas de diferentes ambientes animais com uma  
abordagem em Saúde Única / Thérèse Camille Nascimento  
Holmström. - Londres, 2022.  
110 f.: il.

Orientadora: Miliane Moreira Soares de Souza.  
Coorientadora: Irene da Silva Coelho.  
Coorientadora: Dayanne Araújo de Melo.  
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Ciências Veterinárias, 2022.

1. genes de resistência. 2. patógenos bacterianos.  
3. Saúde Única. I. Moreira Soares de Souza, Miliane ,  
1970-, orient. II. da Silva Coelho, Irene, 1979-,  
coorient. III. Araújo de Melo, Dayanne , 1987-,  
coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Ciências Veterinárias. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 855 / 2022 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.018061/2022-70

Seropédica-RJ, 22 de março de 2022.

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

**THERESSE CAMILLE NASCIMENTO HOLMSTROM**

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 23/03/2022

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese.

*(Assinado digitalmente em 23/03/2022 23:29 )*  
LIDIANE DE CASTRO SOARES  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)  
Matrícula: 1609810

*(Assinado digitalmente em 25/03/2022 16:58 )*  
MILIANE MOREIRA SOARES DE SOUZA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)  
Matrícula: 1212438

*(Assinado digitalmente em 25/03/2022 14:51 )*  
GRAZIELI MABONI  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 015.156.720-42

*(Assinado digitalmente em 23/03/2022 21:26 )*  
ELEINE KUROKI ANZAI  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 294.872.878-92

*(Assinado digitalmente em 24/03/2022 12:44 )*  
CLAUDIO MARCOS ROCHA DE SOUZA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 012.086.307-33

Para verificar a autenticidade deste documento entre em  
<https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **855**, ano:  
**2022**, tipo: **ATA**, data de emissão: **22/03/2022** e o código de verificação: **24013e9010**

“O que prevemos raramente ocorre, o que menos esperamos geralmente acontece”  
**Benjamin Disraeli**

Dedico  
este trabalho à Deus  
pela oportunidade diária de estar  
viva; à minha mãe, que não está  
mais entre nós, à minha  
orientadora, ao meu namorado e  
aos amigos pelo amor e apoio  
recebidos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, por ter me guiado até este caminho e colocado as pessoas certas na minha vida, me mantendo forte, focada a não desistir e me ajudando a me reinventar em todas as diversidades.

À minha família, principalmente minha mãe que me deu a vida e me criou, infelizmente não está mais viva para ver essa realização, porém, é para ela todo o meu esforço.

À minha orientadora, Professora Doutora Miliane Moreira Soares de Souza, por ter aceitado me orientar sem nem me conhecer e ter sido minha orientadora não apenas profissionalmente, mas espiritual, pessoal e mentora em muitos momentos. Não poderia desejar melhor orientadora, foi sempre presente e atenciosa, tornando possível a conclusão deste trabalho. Obrigada de coração por ter me ajudado e estado ao meu lado nesses 4 anos, e por ser meu exemplo para vida. Que você seja parte da minha vida para sempre!

À professora Doutora Irene da Silva Coelho, minha co-orientadora, por todo auxílio, principalmente na parte de Biologia Molecular e pelo carinho em toda essa jornada.

À amiga e co-orientadora Dayanne Araújo de Melo, por sua amizade, companheirismo, parceria e profissionalismo. Por estar ao meu lado tanto pra me orientar, quanto para me fazer rir. Obrigada por todo o processo neste período, que tudo se estenda para a vida. Muito Obrigada!

À amiga, Bruna Franzan, por ter me incentivado a tentar o doutorado e ter me obrigado a fazer a prova mesmo com conjuntivite nos dois olhos. À amiga Naiara Rodrigues pelo incentivo e indicação da orientadora. Muito obrigada!

À amiga Lúria, que sempre foi uma companheira de atividades no laboratório e de confidências fora dele. À amiga Letícia Pinto, que desde que entrou no laboratório sempre foi parceira e dedicada, deixando as atividades e convivências mais leves. As duas foram meu alicerce em muitos momentos, deixando esse processo mais fácil.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ pela convivência, amizade, compreensão e incentivo: Professora Shana Coelho, Soraya Stephanie, Mário Makita, Marcela Barlete e Paulo Azevedo.

Ao meu amor, Kairos Resende, por todo o apoio, companheirismo e carinho desde que entrou em minha vida, permitindo dar leveza e felicidade mesmo em momentos muito difíceis. Que a gente seja para sempre! Te amo!

À Cássia da Motta por ter essa parceria com o LabacVet e selecionar isolados importantes. Ao Ramon Pimenta e ao Túlio Reis por abrirem espaço para a busca de novas amostras. Muito obrigada!

À Grazieli Maboni por toda paciência e auxílio no encaminhamento desta tese. Ao Claudio Marcos Rocha de Souza pelo auxílio, comprometimento e ajuda em várias análises da tese na Fundação Oswaldo Cruz.

À todas a equipes da FIOCRUZ, pela paciência em me receber e explicar as metodologias: Eleine, Bianca, Thamirys, Camila, Thiago e Natali.

À técnica Larissa Botelho pela oportunidade de utilização do equipamento de MALDI-TOF MS na Universidade Federal do Rio de Janeiro. À professora Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Juliano e Raphaella Grenfell de Carvalho pela utilização do equipamento na Universidade Federal de São Paulo.

Ao Curso de PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da UFRRJ, e aos funcionários, pelo apoio em materiais e pelas condições que recebemos para trabalhar e estudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos e pelo patrocínio concedido a diversos projetos, possibilitando desta forma, a aquisição de material e equipamentos e a realização dos experimentos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)-Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelos amigos que fiz e pela formação que recebi.

À todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a execução desta dissertação.

## **BIOGRAFIA**

Thérèsse Camille Nascimento Holmström é Mestra em Ciências Animais com ênfase em Produção Animal pela UFRRJ, com estudos concentrados em produção de leite orgânico. Formada em Zootecnia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ em dezembro de 2013.

Desde o primeiro ano de graduação (2008) foi estagiária auxiliando na condução de experimento na área de Bovinocultura de Leite na PESAGRO/CEPAO até 2012. Em paralelo, no período de 2010 a 2011 foi membra do Diretório Acadêmico de Zootecnia. Foi orientada pelo professor Ednaldo Bezerra com projetos de extensão na área de Bovinocultura de Leite e estagiária no Sindicato das Indústrias de Laticínios e Produtos Derivados do Estado do Rio de Janeiro-SINDLAT-RJ em 2012. Foi bolsista de iniciação pelo CNPq na área de estatística orientada pelo professor Wagner Tassinari de 2012 a 2013. Foi monitora da disciplina Nutrição Animal e integrante da Empresa Júnior de Zootecnia da UFRRJ – Vital Jr em 2013.

Em 2018, foi aprovada no processo de seleção do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, nível Doutorado, sob a orientação da professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza.

Em 2022 terminou a graduação de Licenciatura Plena em Pedagogia e atualmente é Professora substituta no Departamento de Produção Animal do Instituto de Zootecnia da UFRRJ.



## RESUMO

HOLMSTROM, Thérèse Camille Nascimento. **Desafios na caracterização e na análise da resistência antimicrobiana de espécies bacterianas na Medicina Veterinária com uma abordagem em Saúde Única.** 2022. 109p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2022.

Ao longo das últimas décadas, múltiplos fatores como o estreitamento da relação entre humanos e animais de estimação, as mudanças ambientais decorrentes da urbanização de áreas periurbanas e rurais, a significativa intensificação da produção animal, acarretaram uma significativa mudança na dinâmica homem-animal com consequente aumento da circulação de patógenos bacterianos entre humanos e animais e a emergência e reemergência de doenças. A identificação de bactérias emergentes na rotina do diagnóstico veterinário tem se apresentado como um grande desafio, uma vez que, geralmente, estes patógenos não possuem estudos de referência a partir das amostras oriundas do ambiente animal, e por vezes, metodologias desenvolvidas para amostras de origem humana não se mostram efetivas para sua identificação. Outro aspecto associado a tal emergência é a circulação de genes de resistência apontando para a importância de caracterizar a resistência antimicrobiana de espécies bacterianas oriundas de diferentes ambientes animais. Neste trabalho foram caracterizadas espécies bacterianas e seu respectivo perfil de resistência oriundas de animais silvestres, produção avícola e amostras laboratoriais clínicas de diferentes espécies. Amostras oriundas de diferentes espécies de animais selvagens, como maritacas, jabutis, cachorro do mato e mão pelada, forneceram 103 cepas da família Enterobacterales, 28 *Staphylococcus* spp., 2 *Streptococcus* spp. e 1 *Enterococcus* spp. Uma cepa de *Pantoea dispersa* isolada de maritaca foi detectada albergando o gene de resistência à colistina *mcr-9*. A partir das amostras de jabuti, foram detectadas 2 amostras apresentando o gene de resistência *bla<sub>TEM</sub>*, 1 apresentou o gene *bla<sub>CTX</sub>* e 1 apresentou ambos os genes. Dentre as amostras da produção avícola os isolados de Enterobacterales revelaram 45,45% (20/44) de cepas produtoras de ESBL, sendo 35% (9/20) *bla<sub>SHV</sub>*, 20% (4/20) *bla<sub>CTX-M</sub>*, 15% (3/20) *bla<sub>TEM</sub>*, 10% (2/20) apresentando os genes *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>CTX</sub>*, e 10% (2/20) apresentando *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>*, simultaneamente. Dentre as 51 cepas de *Enterococcus* spp, 1 cepa de *E. faecium* oriunda de cloaca de pinto foi identificado o gene *vanB* e em 1 cepa de *E. faecalis* de frango adulto foram identificados *vanA* e *vanB*, simultaneamente. Destas mesmas 51 cepas 23,53% (12/51) apresentaram resistência a estreptomicina. Dentre as 25 cepas de *Staphylococcus* spp. foi detectado 1 isolado com o gene *mecA*. A cama de maravalha utilizada pelos animais da avicultura também foi avaliada e foi detectado 1 amostra positiva para o gene *bla<sub>VIM</sub>*. As 35 cepas de *Acinetobacter* spp. foram identificadas por análise proteômica, genotípica e sequenciamento. Para avaliar a diferença entre as técnicas foi utilizado o teste de Kappa entre MALDI-TOF e PCR, MALDI-TOF e *rpoB*, PCR e *rpoB*, e entre as três técnicas. O perfil de resistência dessas amostras também foi avaliado, sendo 54,28% (19/35) classificadas como MDR, 51,42% (18/35) apresentaram 1 ou mais genes de ESBL, sendo 4 cepas com gene *bla<sub>CTX</sub>*, 1 cepa com *bla<sub>SHV</sub>*, 9 cepas com *bla<sub>TEM</sub>*, 3 cepas com *bla<sub>CTX</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>* e 1 cepa com *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>*. O presente trabalho buscou identificar bactérias e detectar genes de resistência em diferentes ambientes veterinários. Este é um grande desafio principalmente porque há poucos trabalhos e ausência de padrões de análise fenotípica sobre isolados de origem animal. O papel do animal silvestre, de produção ou de companhia tem relevante participação na disseminação de genes de resistência no ambiente, enfatizando a Saúde Única e gerando um alerta quanto ao foco de novos estudos para entender e avaliar ambientes veterinários.

**Palavras-chave:** genes de resistência, patógenos bacterianos e Saúde Única.

## ABSTRACT

HOLMSTROM, Thérèse Camille Nascimento. **Desafios na caracterização e na análise da resistência antimicrobiana de espécies bacterianas na Medicina Veterinária com uma abordagem em Saúde Única.** 2022. 109p. Thesis (Doctor in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2022.

Over the last decades, multiple factors such as the strengthening of the relationship between humans and pets, environmental changes resulting from the urbanization of peri-urban and rural areas, the significant intensification of animal production have led to a significant change in the human-animal dynamics with consequently increased circulation of bacterial pathogens between humans and animals and the emergence and re-emergence of diseases. Identifying emerging bacteria in the routine of veterinary diagnosis has been presented as a great challenge. Generally, these pathogens do not have reference studies from samples from the animal environment, and sometimes methodologies developed for samples of human origin are not effective for its identification. Another aspect associated with this emergence is the circulation of resistance genes, pointing to the importance of characterizing the antimicrobial resistance of bacterial species from different animal environments. This work characterized bacterial species and their respective resistance profile from wild animals, poultry production, and clinical laboratory samples of different species. Samples from different wild animal species, such as maritacas, jabutism, cachorro do mato and mão pelada, provided 103 isolates of the Enterobacterales family, 28 *Staphylococcus* spp, 2 *Streptococcus* spp and 1 *Enterococcus* spp. A strain of *Pantoea dispersa* isolated from maritaca was detected harboring the colistin resistance gene *mcr-9*. From the tortoise samples, 2 samples were detected presenting the *bla*<sub>TEM</sub> resistance gene, 1 presented the *bla*<sub>CTX</sub> gene and 1 presented both genes. Among the samples of poultry production, Enterobacterales strains revealed 45.45% (20/44) of ESBL-producing strains, with 35% (9/20) *bla*<sub>SHV</sub>, 20% (4/20) *bla*<sub>CTX-M</sub>, 15% (3/20) *bla*<sub>TEM</sub>, 10% (2/20) showing the *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX</sub> genes, and 10% (2/20) showing *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>TEM</sub>, simultaneously. Among the 51 strains of *Enterococcus* spp (51 strains), 1 strain of *E. faecium* from chick cloaca was identified with the *vanB* gene and in 1 strain of *E. faecalis* from adult chicken, *vanA* and *vanB* were identified simultaneously. Of these same 51 strains, 23.53% (12/51) showed resistance to streptomycin. Among the 25 strains of *Staphylococcus* spp. 1 isolate with the *mecA* gene was detected. The poultry litter was also evaluated and 01 positive sample for the *bla*<sub>VIM</sub> gene was detected. The 35 strains of *Acinetobacter* spp. were identified by proteomic, genotypic and sequencing analysis, to assess the difference between the techniques, the Kappa test was used to compare MALDI-TOF and PCR, MALDI-TOF and *rpoB*, PCR and *rpoB*, and between the three techniques. The resistance profile of these samples was also evaluated, with 54.28% (19/35) classified as MDR, 51.42% (18/35) had 01 or more ESBL genes, with 04 strains with the *bla*<sub>CTX</sub> gene, 01 strain with *bla*<sub>SHV</sub>, 09 strains with *bla*<sub>TEM</sub>, 03 strains with *bla*<sub>CTX</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> and 01 strain with *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>TEM</sub>. The present work sought to identify bacteria and detect resistance genes in different veterinary environments. This is a big challenge mainly because there are still few works and phenotypic analysis standards on animal themes. The role of wild, production, or companion animal has great participation in disseminating resistance gene in the environment, emphasizing One Health and generating an alert as to the focus of new studies to understand and evaluate veterinary environments.

**Keywords:** bacterial pathogens, resistance genes, One Health

## LISTA DE ABREVIACÕES, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

°C = graus Celsius  
β = beta  
μL = Microlitro  
μM = Micromolar  
A = adenina  
Acb = *Acinetobacter calcoaceticus*- *Acinetobacter baumannii*  
AMC = amoxicilina + ácido clavulânico  
AMC = Ágar MacConkey  
AMI = amicacina  
AMP = ampicilina  
ASB = ampicilina com sulbactam  
ATM = aztreonam  
AZI = azitromicina  
AZT = aztreonam  
*A. baumannii* = *Acinetobacter baumannii*  
*A. pittii* = *Acinetobacter pittii*  
*A. baumannii* = *Acinetobacter baumannii*  
*A. nosocomialis* = *Acinetobacter nosocomialis*  
*A. venetianus* = *Acinetobacter venetianus*  
*A. ursinguii* = *Acinetobacter ursinguii*  
BHI = brain heart infusion (infusão de cérebro e coração)  
C = citosina  
carO = carbapenem-associated outer membrane protein (proteína da membrana externa associada com carbapenemase)  
CAZ = ceftazidima  
CCA = ceftazifima com clavulanato  
CCT = cefotaxima com clavulanato  
CFO = cefoxitina  
CIP = ciprofloxacina  
CLO = cloranfenicol  
CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto Clínico e Laboratório de padronização)  
COVID 19 = Doença de Coronavírus 2019  
CPM = cefepime  
CRO = ceftriaxona brometo de cetilmetilamonio  
CTAb=  
CTX = β lactamase contra cefotaxima  
CTX = cefotaxima  
DNA = desorribunucleic acid (ácido desoxirribonucleico)  
dNTP = Desoxirribonucleotídeos Fosfatados  
DOX = doxaciolina  
EDTA = Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido tetraacético etilenodiamina)  
ENR = enrofloxacina  
ESKAPE = *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp  
ERT = ertapenem  
ESBL = extensive spectrum β-lactamases (β-lactamases de espectro estendido)  
FAO = Organização para Alimentação e Agricultura

FIOCRUZ = Fundação Oswaldo Cruz  
FOS = fosfomicina  
G = guanina  
GEN = gentamicina  
*gyrB* = gyrase B  
HCL = ácido clorídrico  
IMP = imipinem  
IMP = imipenemase (gene)  
ITS = Internal Transcribed Spacer  
KCL = cloreto de potássio  
KPC = *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase  
LabacVet = Laboratório de Bacteriologia Veterinária  
LAPIH = Laboratório de Pesquisa de Infecções Hospitalares  
LEV = levofloxacina  
LIMM = Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica  
M = molar  
MALDI-TOF MS = Espectrometria de Massa por tempo de Voo de Ionização / Dessorção por Laser Assistida por Matriz  
min = minuto  
MAPA = Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
mcr = plasmid mediated polymyxin resistance (Resistência do plasmídeo mediado por polimixina)  
MDR = multidroga-resistente  
MER = meropenem  
MIC = minimum inhibitory concentration (concentração inibitória mínima)  
mL = mililitro  
MLST = Multilocus Sequence typing (Tipagem Multilocus Sequence)  
mm = milímetro  
mM = microMol  
NaCL = cloreto de sódio  
NDM = New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase  
ng = nanograma  
omp = outer membrane protein (proteína de membrana externa)  
OIE = Organização Mundial para Saúde Animal  
OMS = Organização Mundial da Saúde  
OXA = oxacilinase  
pb = pares de base  
pBP = bond penicilina bond protein (proteínas ligadoras de penicilinas)  
PCR = Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia de polimerase)  
PEG8000 = polietileno glicol  
PFGE = Pulsed-field Gel electrophoresis (gel de eletroforese em campo pulsado)  
pH = potencial de hidrogênio  
*ptk* = protein tyrosine kinases (proteína tirosina quinase)  
RA = Resistência à antimicrobiano  
*recA* = recombinase A  
RNA = ácido ribonucléico  
rpm = rotação por minuto  
*rpoB* = RNA polymerase subunit B gene (gene do RNA polimerase subunidade B)  
seg = segundo  
U = unidade

SUT = sulfatomexazol com trimetoprim

T = timina

Taq = *Thermus aquaticus*

TE = Tris-EDTA

TEM = temoneira

TET = tetraciclina

TRI = trimetoprim

TOF= tempo de vôo

UFC = unidade formadora de colônia

UFRJ = Universidade Federal do Rio de Janeiro

UFRRJ = Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

UV= Ultravioleta

VIM = Verona imipenemase

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Páginas
<b>Figura 1</b>	Avaliação e coleta de amostra de Jabuti em 2019. Período anterior a pandemia	18
<b>Figura 2</b>	<b>A:</b> Coleta das aves; <b>B:</b> coleta dos pintinhos e <b>C:</b> coleta da cama do setor de Avicultura da UFRRJ	19
<b>Figura 3</b>	Esquema de isolamento e identificação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	20
<b>Figura 4</b>	<b>A:</b> Morfologia da colônia de bactéria do complexo <i>Acb</i> em placa contendo ágar Macconckey, que não é fermentadora; <b>B:</b> Análise de motilidade e oxidase negativos	21
<b>Figura 5</b>	<b>A:</b> Bateria de IMViC + TSI para análise bioquímica de Enterobacterales; <b>B:</b> Citrato positivo negativo e TSI fermentativo com produção de gás respectivamente.	21
<b>Figura 6</b>	<b>A:</b> Leitura e interpretação dos dados com uso de softwares; <b>B:</b> Equipamento.	23
<b>Figura 7</b>	<b>A:</b> Banho maria; <b>B:</b> Centrífuga.	24
<b>Figura 8</b>	<b>A:</b> Homogeneização da cama com tampão de extração; <b>B:</b> Sobrenadante da amostra; <b>C:</b> Ressuspensão com TE e acetato de amônio; <b>D:</b> Material extraído da cama com TE; <b>E:</b> Sobrenadante do material após centrifugação e adição de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1); <b>F:</b> DNA total final	25
<b>Figura 9</b>	<b>A:</b> Preparação de placa para sequenciamento; <b>B:</b> Placa pronta.	27
<b>Figura 10</b>	<b>A:</b> Escala 0,5 de McFarland vista de cima; <b>B:</b> Equivalência corresponde a uma concentração de, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL	28
<b>Figura 11</b>	<b>A:</b> Borda da zona bem demarcado indicando produtor de $\beta$ -lactamase; <b>B:</b> Borda da zona sem demarcação indicando não produtor de $\beta$ -lactamase.	29
<b>Figura 12</b>	Disposição de discos de antimicrobianos para avaliação de resistência em <i>Enterococcus</i> spp.	30
<b>Figura 13</b>	<b>A:</b> Resistência aos antimicrobianos selecionados e surgimento de zona fantasma entre AMC e CTX, sendo indicativo de ESBL; <b>B:</b> Resistência aos antimicrobianos selecionados e surgimento de zona fantasma entre AMC e CTX e deformação de halo entre AMC e CAZ e AMC e ATM.	31
<b>Figura 14</b>	Disposição de discos de antimicrobianos para avaliação de resistência em <i>Enterococcus</i> spp.	32
<b>Figura 15</b>	Diferença de 5mm entre halos dos discos CAZ e CTX com e sem inibidor	32
<b>Figura 16</b>	<b>A:</b> Placa apresentando resistência a diferentes classes de antimicrobianos; <b>B:</b> Placa apresentando resistência a diferentes classes e possível produtora de ESBL (presença de zona fantasma).	33
<b>Figura 17</b>	<b>A:</b> Preparo do plug; <b>B:</b> Corte de plug; <b>C:</b> Colocação do plug em digestão enzimática; <b>D:</b> Plug nos dentes do pente; <b>E:</b> Gel pronto com plug. Procedimento realizado no LAPIH- FIOCRUZ.	37
<b>Figura 18</b>	Cepas oriundas de cachorro do mato confirmados pela identificação proteômica de acordo com o respectivo sítio de coleta.	43

<b>Figura 19</b>	Cepas oriundas de Mão-pelada confirmados pela identificação proteômica de acordo com o respectivo sítio de coleta.	44
<b>Figura 20</b>	Caracterização da resistência fenotípica com os antimicrobianos aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), ampicilina (AMP), cefotaxima (CTX), amoxicilina+ácido clavulânico (AMC) e cefepima (CPM) para avaliar produção de ESBL pelas cepas de maritaca.	45
<b>Figura 21</b>	Caracterização da resistência fenotípica de produção de ESBL pelo número de cepas de jabuti.	47
<b>Figura 22</b>	Caracterização e frequência da resistência fenotípica de produção de ESBL pelas cepas de cachorro-do-mato.	48
<b>Figura 23</b>	Resultados obtidos na utilização das diferentes técnicas: MALDI TOF, multiplex PCR e sequenciamento do gene <i>rpoB</i> .	59
<b>Figura 24</b>	Resultado de tipagem por técnica de PFGE dos <i>A. baumannii</i> .	70
<b>Figura 25</b>	Resultado de tipagem por técnica de PFGE dos <i>A. pittii</i> .	71

## ÍNDICE DE TABELAS

	Páginas
<b>Tabela 1</b>	Diferenciação dos gêneros de <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp. 23
<b>Tabela 2</b>	Determinação de resistência fenotípica mediada pelo gene <i>mecA</i> , 29
<b>Tabela 3</b>	Determinação de resistência fenotípica mediada pelo gene <i>blaZ</i> . 30
<b>Tabela 4</b>	Determinação de resistência fenotípica <i>HLAR</i> , 31
<b>Tabela 5</b>	Determinação de resistência fenotípica mediada pelo gene <i>vanA</i> e <i>vanB</i> , 31
<b>Tabela 6</b>	Determinação de resistência fenotípica de susceptibilidade à penicilina 32
<b>Tabela 7</b>	Identificação proteômica e frequência das cepas identificadas nas maritacas, jabuti, cachorro-do-mato e mão-pelada. 42
<b>Tabela 8</b>	Perfil de resistência fenotípica das cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo em maritacas. 47
<b>Tabela 9</b>	Identificação bacteriana, sítio de coleta, caracterização do perfil fenotípico de resistência e frequência de ESBL em cepas de avicultura. 52
<b>Tabela 10</b>	Característica dos isolados <i>Escherichia coli</i> de acordo com sua origem e fator de virulência. 56
<b>Tabela 11</b>	Caracterização dos isolados do complexo <i>Acb</i> quanto a origem e processo infeccioso. 57
<b>Tabela 12</b>	Identificação pelas diferentes técnicas das espécies do complexo <i>Acb</i> . 60
<b>Tabela 13</b>	Avaliação utilizando teste Kappa entre os métodos de identificação MALDI-TOF, multiplex PCR e <i>rpoB</i> das espécies do complexo <i>Acb</i> . 62
<b>Tabela 14</b>	Indicação dos processos infecciosos classificados como MDR 64
<b>Tabela 15</b>	Perfil fenogenotípico de resistência antimicrobiana das espécies do complexo <i>Acb</i> . 68



## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
<b>2.1 O conceito <i>One Health</i></b>	3
<b>2.2 Ambientes Animais e o Desafio da Resistência Antimicrobiana</b>	4
2.2.1 Animais selvagens	4
2.2.2 Avicultura	5
2.2.3 Animais domésticos	7
<b>2.3 Principais agentes de importância em Saúde Única</b>	7
2.3.1 <i>Staphylococcus</i> spp. meticilina resistentes e produtores de $\beta$ -lactamases	8
2.3.2 <i>Enterococcus</i> spp. resistentes à vancomicina	9
2.3.3 <i>Streptococcus</i> spp. não suscetíveis à penicilina	10
2.3.4 Bactérias produtoras de ESBL (B-lactamases de Espectro Estendido)	11
2.3.5 Bactérias produtoras de Carbapenemases	12
2.3.6 Bactérias resistentes à colistina	13
<b>2.4 Fatores de Virulência em cepas de <i>Escherichia coli</i> aviária patogênica (APEC)</b>	15
<b>2.5 Tipagem Molecular pela técnica de Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) de cepas de pertencentes ao Complexo <i>Acinetobacter-calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter-baumanni</i></b>	16
<b>3. OBJETIVOS</b>	18
3.1 Objetivos Gerais	18
3.2 Objetivos Específicos	18
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	19
<b>4.1 Amostragem</b>	19
4.1.2 Animais selvagens	19
4.1.2 Avicultura da UFRRJ	19
4.1.3 Processos infecciosos em animais domésticos e amostra de resíduos de cama	20
4.2 Identificação fenotípica	20
4.2.1 Isolamento e identificação primária das amostras de animais selvagens	20
4.2.2 Isolamento e identificação primária das amostras da avicultura	21
4.2.3 Isolamento e identificação primária das cepas oriundas de processos infecciosos em animais domésticos e amostra de resíduos de cama	21
<b>4.3 Identificação fenotípica de isolados Gram-negativos Fermentadores</b>	22
<b>4.4 Identificação fenotípica das cepas Gram-positivas</b>	23
4.4.1 <i>Staphylococcus</i> spp.	23
4.4.2 <i>Enterococcus</i> spp e <i>Streptococcus</i> spp.	23
<b>4.5 Identificação proteômica por MALDI TOF MS</b>	23
<b>4.6 Identificação genotípica</b>	24
4.6.1 Extração do DNA bacteriano pela técnica de lise térmica	25
4.6.2 Extração do DNA total da cama aviária pela técnica de extração enzimática	25
4.6.3 Extração de DNA bacteriano por sonicação para detectar genes de resistência	27
4.6.4 Extração de DNA bacteriano por kit das cepas de <i>Acb</i>	27
<b>4.7 Identificação genotípica das Espécies Bacterianas</b>	27
4.7.1 <i>Staphylococcus</i> spp.	27
<b>4.7.2 Amplificação do gene 16S rDNA por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)</b>	27

<b>4.7.3 Identificação genotípica das espécies pertencentes ao complexo <i>Acb</i> por multiplex PCR</b>	28
<b>4.7.4 Identificação genotípica das espécies pertencentes ao complexo <i>Acb</i> por sequenciamento do gene <i>rpoB</i></b>	28
<b>4.8 Análise fenotípica da resistência aos antimicrobianos</b>	29
4.8.1 Preparo do inóculo	29
<b>4.8.2 Triagem fenotípica da resistência aos antimicrobianos</b>	29
4.8.2.1 Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> spp. meticilina resistentes	29
4.8.2.2 Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> spp. produtores de $\beta$ -lactamases.	30
4.8.2.3 Pesquisa de HLAR em <i>Enterococcus</i> spp.	30
4.8.2.4 Pesquisa de <i>Enterococcus</i> spp. resistentes à vancomicina	31
4.8.2.5 Pesquisa de <i>Streptococcus</i> spp. resistentes à penicilina	32
4.8.2.6 Pesquisa de bactérias produtoras de ESBL ( $\beta$ -lactamases de Espectro Estendido) em cepas da Ordem Enterobacterales	32
4.8.2.7 Teste confirmatório para produção de ESBL	33
4.8.2.8 Pesquisa de cepas do complexo <i>Acb</i> multidroga-resistentes (MDR)	34
<b>4.9 Análise Genotípica da Resistência aos Antimicrobianos</b>	34
<b>4.9 Análise Genotípica da Resistência aos Antimicrobianos</b>	34
4.9.1 Pesquisa genotípica da resistência aos $\beta$ -lactâmicos em <i>Staphylococcus</i> spp.	34
4.9.2 Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> spp e <i>Enterococcus</i> spp. resistentes à vancomicina	34
4.9.3 Pesquisa dos genes codificadores de ESBL	35
4.9.4 Pesquisa dos genes codificadores de carbapenemases - (Oxacilinas)	35
4.9.5 Pesquisa dos genes codificadores de carbapenemases	35
4.9.6 Pesquisa dos genes codificadores de resistência à polimixina E ou colistina	35
<b>4.10 Fatores de virulência em <i>Escherichia coli</i> aviária patogênica</b>	36
<b>4.11 Tipificação das espécies pertencentes ao complexo <i>Acb</i> pela técnica de Pulsed-field Gel electrophoresis (PFGE)</b>	36
<b>4.12 Análise Estatística das técnicas avaliadas para a caracterização das espécies pertencentes ao complexo <i>Acb</i></b>	37
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	38
<b>5.1 Identificação de cepas oriundas de animais selvagens</b>	38
<b>5.2 Perfil de resistência de cepas oriundas de animais selvagens</b>	44
<b>5.3 Coleta e identificação de bactérias coletadas de avicultura</b>	49
<b>5.4 Resistência das cepas bacterianas oriundas da avicultura</b>	51
<b>5.5 Fatores de virulência de <i>Escherichia coli</i></b>	55
<b>5.6 Identificação de cepas bacterianas do complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii</i></b>	56
<b>5.7 Resistência das cepas do complexo <i>Acb</i></b>	63
<b>5.8 PFGE das cepas do complexo <i>Acb</i></b>	70
<b>6 CONCLUSÃO</b>	73
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	75
<b>8 ANEXOS</b>	89

## 1. INTRODUÇÃO

O conceito de Saúde Única é uma estratégia mundial que reconhece a interrelação entre saúde humana, animal e ambiental. Foi enfatizada a necessidade de ter abordagens transdisciplinares na gestão de questões complexas de Saúde (BORDIER *et al.*, 2020), incluindo medidas para prevenção e controle da resistência antimicrobiana.

O relatório elaborado por James O'Neill (2015) estimou que, até 2050, as atuais 700.000 mortes anuais provocadas pelas superbactérias, microrganismos que apresentam mecanismos de resistência para todas as classes de antimicrobianos disponíveis, poderão atingir 10 milhões ao ano em nível mundial, e o custo global acarretado pela resistência a antimicrobianos poderá chegar a ordem de 100 trilhões de dólares, caso não sejam adotadas medidas preventivas de modo sistemático. Esse número é superior ao total de óbitos causados atualmente pelo câncer, que é de 8,2 milhões ao ano.

Ao avaliar esta perspectiva dentro do atual cenário pandêmico, fica mais evidente a importância da emergência de infecções causadas por microrganismos para os quais não existam tratamentos disponíveis. Um século atrás, a descoberta de antimicrobianos gerou uma mudança significativa na expectativa de vida das pessoas, atualmente, porém, existe a perspectiva de que infecções bacterianas não-tratáveis podem vir a ser a próxima pandemia do século XXI. Embora o desenvolvimento de novos fármacos esteja entre as 10 principais estratégias de controle, a emergência e disseminação de mecanismos de resistência tem ocorrido em velocidade superior a descoberta de novas abordagens terapêuticas que se mostrem realmente eficazes.

A dinâmica da emergência da resistência bacteriana pode ocorrer naturalmente, constituindo uma adaptação genética às mudanças decorrentes da competição dentro de microbiomas específicos e subsequente evolução dos microrganismos. Desse modo, alguns mecanismos de resistência baseados em hidrólise enzimática, alterações de permeabilidade e modificações na afinidade pelo sítio ativo são extremamente antigos, e amplamente disseminados por todo o mundo, uma vez que, os genes de resistência são móveis e circulam com facilidade em todos esses ambientes (PIFFARETTI, 2016). Entretanto, a ampla utilização dos antimicrobianos seleciona cepas patogênicas com algum mecanismo intrínseco ou adquirido (PENESYAN, GILLINGS, PAULSEN, 2015). O uso indiscriminado e, por vezes, desnecessário de antimicrobianos nos hospitais, na agropecuária e na comunidade intensifica essa pressão de seleção para emergência e disseminação de cepas resistentes (DA SILVA *et al.*, 2021; COLLIGNON *et al.*, 2019).

Nesse contexto, o estudo do ambiente animal como propício à aceleração da evolução da resistência é uma área emergente e crítica para a compreensão do desenvolvimento de resistência em patógenos bacterianos e como modelo de disseminação dos genes de resistência entre as bactérias ali circulantes. Ao longo das últimas décadas, múltiplos fatores como o estreitamento da relação entre humanos e animais de estimação, as mudanças ambientais decorrentes da urbanização de áreas periurbanas e rurais, a significativa intensificação da produção animal, acarretaram uma significativa mudança na dinâmica homem-animal com consequente aumento da circulação de patógenos bacterianos entre humanos e animais e a emergência e reemergência de doenças (SOUZA *et al.*, 2020; OVERGAAUW *et al.*, 2020).

Entretanto, a identificação de bactérias emergentes na rotina do diagnóstico veterinário tem se apresentado como um grande desafio, uma vez que, geralmente, estes patógenos não possuem estudos de referência a partir das amostras oriundas do ambiente animal, e por vezes, metodologias desenvolvidas para amostras de origem humana não se mostram efetivas para sua identificação.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O conceito *One Health*

Aristóteles (384-322 a.C) introduziu o conceito de medicina comparada nos estudos de várias doenças epizooticas de humanos e outras espécies animais, mantendo uma integridade com o ecossistema, escrita em uma série de livros (TAFFAREL, 2015), porém o conceito de Saúde Única (*One Health*), proposto já na década de 90, remete a estratégias interdisciplinares e integrativas de promoção à saúde, em que a saúde humana, saúde animal (animais domésticos e de vida selvagem) são interdependentes e vinculadas à saúde dos ecossistemas (MENIN, 2018). O conceito de Saúde Única é uma estratégia mundial que reconhece a interrelação entre saúde humana, animal e ambiental.

A partir de documentos elaborados por órgãos como Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO), Organização Mundial para Saúde Animal (OIE) e Organização Mundial de Saúde (OMS), foi enfatizada a necessidade de substituir as abordagens isoladas, setoriais e lineares por abordagens sistêmicas e transdisciplinares na gestão de questões complexas de Saúde (BORDIER *et al.*, 2020).

Considerando o atual desenvolvimento global acelerado, obviamente que esforços colaborativos e parcerias sustentáveis em uma área específica devem contribuir com forças consistentes para resultados relevantes com aplicações diretamente nas áreas estudadas e nas comunidades. Esse senso comum ocorreu em diversos campos da saúde global e populacional, mas tem sido dada importância à pesquisa científica na temática médica (TAFFAREL, 2015).

A interação entre seres vivos, incluindo homens, animais e patógenos, que compartilham o mesmo ambiente, deve ser vista como um sistema único (CALISTRINI *et al.*, 2013), entre as quais destacam-se as medidas para prevenção e controle da resistência antimicrobiana.

Uma abordagem colaborativa e multidisciplinar, ultrapassando as fronteiras da saúde animal, humana e ambiental, é necessária para entender a ecologia de cada doença zoonótica emergente, a fim de realizar uma avaliação de risco e desenvolver planos de resposta e controle (MACKENZIE & JEGGO, 2019). É justamente por isso que qualquer ameaça à saúde ambiental constitui, simultaneamente, uma ameaça à saúde humana e animal; qualquer ameaça à saúde humana constitui, simultaneamente, uma ameaça à saúde ambiental e animal; qualquer ameaça à saúde animal constitui, simultaneamente, uma ameaça à saúde ambiental e humana.

Os problemas de saúde de hoje são frequentemente complexos, transfronteiriços, multifatoriais e entre espécies, e se abordados de um ponto de vista puramente médico,

veterinário ou ecológico, é improvável que sejam produzidas estratégias de mitigação sustentáveis (MACKENZIE & JEGGO, 2019).

Instituições de relevância mundial como a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, a Organização Mundial da Saúde Animal e o Banco Mundial reconhecem o caráter interdisciplinar da abordagem em Saúde Única e o papel determinante de áreas como a psicologia, a sociologia, a antropologia, a ecologia, a microbiologia e a biologia molecular, as ciências do solo, as ciências da nutrição, a economia da saúde, a toxicologia para a constituição desta intrincada rede de ações e estratégias colaborativas (BUSS *et al.*, 2021).

Assim, assumindo-se esta forte interligação, qualquer alteração positiva no sistema terá repercussões positivas nos outros domínios. Uma abordagem *One Health*, portanto, foi reivindicada para melhor enfrentar esses desafios (CALISTRINI *et al.*, 2013).

## **2.2 Ambientes Animais e o Desafio da Resistência Antimicrobiana**

### **2.2.1 Animais Selvagens**

Muitas questões estão implicadas no aumento do contato humano com os animais selvagens, sejam questões legais que concernem à posse, compra e venda de animais silvestres, sejam hábitos alimentares/culturais exóticos (TIWARI *et al.*, 2020), hábitos de caça e domesticação (MALOV & MALEYEV, 2018), a livre circulação de algumas espécies nos centros urbanos (FRANTZ *et al.*, 2020), desmatamento (DE MAGALHAES *et al.*, 2021) e o deslocamento humano para área periurbanas e rurais (DE ANDRADE FRANCO *et al.*, 2021).

O fato de que a maioria das doenças infecciosas emergentes tem potencial zoonótico e, em torno de 70% têm origem em animais selvagens (RIBEIRO & MEDEIROS, 2017; DA SILVA & COELHO, 2020), aponta para a contribuição da convivência, direta ou indireta, para a disseminação de agentes etiológicos e de genes de resistência, e para a preservação da biodiversidade como forma de preservação também da saúde humana (ELLIFF, 2020).

Considerando o exposto, podemos destacar as maritacas (*Aratinga leucophthalmus*), que são frequentemente observadas em bandos de 5 a 40 indivíduos em florestas úmidas, planícies e também ambientes urbanos onde constroem seus ninhos em telhados e edifícios (TUCUNDUVA *et al.*, 2018).

Outras espécies a serem destacadas são os mão-peladas (*Procyon cancrivorus*) que habitam áreas florestais e abertas, devido ao seu comportamento noturno e discreto, é considerado um dos carnívoros neotropicais menos estudados (CERON *et al.*, 2020). Os cachorros-do-mato são animais vulneráveis pela destruição de seu ambiente natural, seja pelo

desmatamento para as fronteiras agrícolas ou espalhando as comunidades urbanas o ambiente natural, bem como a fragmentação do habitat causada pelas estradas. São animais tolerantes à perturbação humana e são frequentemente vistos em áreas rurais e perto de regiões urbanas (WEBER *et al.*, 2020).

Os jabutis têm sido cada vez mais considerados como animais de estimação e o aumento na criação dessa espécie selvagem como animal de companhia, tornou-se motivo de preocupação para autoridades em vigilância em saúde, devido aos riscos de contaminação por zoonoses interespecíficas, estas decorrentes da crescente proximidade desses animais com o ambiente domiciliar (NUNES *et al.*, 2010).

Essas e outras espécies de animais selvagens, têm em comum o alto contato com os ambientes urbanos, humanos e outros animais domésticos. O risco potencial de transmissão de cepas resistentes a antimicrobianos de animais de companhia para humanos e vice-versa está associado ao estreito contato entre eles, a falta de conhecimento das espécies, falta de higiene, manejo e ao uso inadequado de antimicrobianos na clínica veterinária (MOREIRA *et al.*, 2020) e, também, ao íntimo contato com crianças.

Entretanto, a literatura da destaque principalmente a cepas de *Salmonella* spp. em répteis (DA SILVEIRA ROSINA *et al.*, 2021; SILVEIRA *et al.* 2018), porém ainda é incipiente quanto ao potencial de emergência e disseminação de cepas bacterianas resistentes entre humanos e animais selvagens, especialmente, no estudo em tela, animais cujos microbiomas vem sendo impactados e modificados pela ação humana, levando-os a situações de cativeiro irregular, ou perda do habitat natural.

### 2.2.2 Avicultura

A atividade agropecuária no Brasil representou, no primeiro trimestre de 2021, 9,81% do PIB (Produto Interno Bruto), com geração de empregos para, em torno de, 10% da população economicamente ativa do país segundo o Centro de Estudos Avancados em Economia Aplicada (CEPEA ESALQ/USP, 2021). A atividade agropecuária brasileira se destaca no cenário mundial, sendo considerado um dos países mais fortes na pecuária, com relevância do abastecimento do mercado interno e produção para exportação.

A avicultura brasileira tem apresentado altos índices de crescimento há 30 anos. O frango produzido no Brasil conquistou o exigente mercado asiático, e atualmente chega a 142 países. No início do ano de 2021, foram produzidas 14.120 mil toneladas de frango de corte, sendo 69% para o mercado interno, e atingindo a primeira posição do *ranking* mundial de exportação do produto (EMBRAPA, 2021).

O uso de antimicrobianos como aditivos zotécnicos como promotores de crescimento tornou-se uma prática rotineira na produção avícola, especialmente frangos de corte, com a Revolução Verde no pós-guerra. Tal medida objetiva a redução da carga de agentes deletérios ao sistema digestivo, melhorando a absorção dos nutrientes da dieta, auxiliando na melhora do desempenho animal em conversão alimentar. Estes aditivos são usados em dosagem inferior às concentrações inibitórias mínimas durante o período de criação (até 42 dias), sendo retirados anterior ao abate, dependendo da meia vida do produto utilizado (GARCIA *et al.*, 2019).

A utilização desses promotores de crescimento em rações foi abolida na Comunidade Europeia a fim de prevenir a evolução da resistência a alguns antimicrobianos de uso humano (McMULLIN, 2004). Pesquisadores observaram, na década de 80, que determinadas cepas bacterianas de importância clínica desenvolveram resistência a classes de antimicrobianos utilizadas na produção avícola, e que o uso continuado destes promotores de crescimento favoreceu a disseminação de genes de resistência no ambiente, com a possibilidade de que estas bactérias resistentes oriundas dos animais de produção pudessem se disseminar e atingir os humanos (SADER, 2004) e seus genes de resistência serem transmitidos e incorporados ao microbioma humano, reduzindo assim a eficácia dos antimicrobianos nessa população (BEZERRA *et al.*, 2017).

Dentro desse processo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) proibiu a fabricação, a comercialização e o uso de aditivos zotécnicos melhoradores de desempenho que contenham o antimicrobiano Avorpacina em 1998 e Colistina (Poliximina E) em 2016 de todo o território nacional, que eram amplamente utilizados em avicultura. Esta medida foi de extrema relevância em função dos riscos à saúde humana do eventual uso do aditivo como suplemento adicionado à ração para acelerar o crescimento de animais para abate, sobretudo suínos e aves. Porém, a Instrução Normativa 45 autorizou o uso da substância existentes em estoque até novembro de 2018 (BRASIL, 2016). Além disso, em 2018, o MAPA reavaliou a legislação de outros antimicrobianos (tilosina, loncomicina, virginiamicina, bacitracina e tiamulina) que também tiveram seus usos proibidos como suplemento alimentar animal (BRASIL, 2018).

A construção de um sistema ideal de vigilância de resistência antimicrobiana deve integrar dados de estudos clínicos humanos, veterinários e ambientais. Essas análises devem gerar dados disponíveis no domínio público de livre acesso e exportá-los em um formato de intercâmbio de dados padronizados. Esses sistemas de vigilância de resistência antimicrobiana



devem ser escalonáveis e extensíveis, e relatórios devem estar disponíveis para que as medidas de controle efetivas sejam realizadas (DIALLO *et al.*, 2020)

### 2.2.3 Animais Domésticos – *Acinetobacter calcoaceticus*- *Acinetobacter baumannii*

Na última década, as espécies de *Acinetobacter* emergiram como um dos agentes clinicamente mais importantes (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2019) pelo seu potencial nosocomial, sua resistência intrínseca a vários antimicrobianos de rotina tanto na medicina veterinária, quanto na humana e tem aumentado cada vez mais os casos de multidroga resistência, tornando-o muito infeccioso e de difícil controle. Bactérias do gênero *Acinetobacter* são cocobacilos Gram-negativos, aeróbicos estritos, não móveis, não fermentadores de glicose, oxidase negativos (D'SOUZA *et al.*, 2019) e estão ligados a muitas condições patológicas como pneumonia (NOWAK *et al.*, 2017), meningite (ALVAREZ-VEGA *et al.*, 2020), infecções no trato urinário (JIMÉNEZ-GUERRA *et al.*, 2018), infecções de pele e feridas (MUNIER *et al.*, 2019), endocardite (IOANNOU *et al.*, 2021) e até sepse (MAHICH *et al.*, 2021) em humanos e diversas espécies animais.

*Acinetobacter baumannii* é considerado uma das espécies mais importante em infecções humanas (VAN DER KOLK *et al.*, 2019). Além disso, *A. baumannii* multirresistente a antimicrobianos é classificado como um microrganismo ESKAPE, que é um grupo de seis patógenos (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.) com uma alta taxa de resistência antimicrobiana implicada em infecções nosocomiais humanas (TUTTOBENE *et al.*, 2020).

*A. baumannii* faz parte do complexo *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* (*Acb*) juntamente com *A. calcoaceticus*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* e as recentemente adicionadas *A. seifertii* e *A. dijksboorniae* (também conhecido como *A. Lactucae*) (DUNLA & ROONEY, 2018). Todas estão intimamente relacionados e exibem características fenotípicas e bioquímicas semelhantes. Portanto, é difícil distingui-los em nível de espécie individualmente (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2019). A precisão na identificação desses agentes clinicamente importantes só é possível com métodos moleculares, e a detecção e sequenciamento do gene *rpoB* é considerada padrão ouro (LaSCOLA *et al.*, 2006).

Os carbapenêmicos são uma opção para o tratamento de infecções por esses patógenos, portanto as cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos são consideradas superbactérias críticas, nível 1 de prioridade, pela OMS (2017), representando um dos grandes desafios no sistema de saúde (RODRÍGUEZ *et al.*, 2018). Dado sua semelhança com todas as espécies do complexo *Acb*, todas as espécies com resistência aos carbapenêmicos geram um

alerta. Como os procedimentos de identificação de amostras humanas já estão estabelecidos, é fundamental desenvolver métodos fenotípicos e genotípicos de identificação de amostras de animais para obter dados comparáveis e resultados confiáveis (MABONI *et al.*, 2020).

Por várias décadas, inúmeras pesquisas foram realizadas para compreender os mecanismos de resistência e controlar sua disseminação em ambientes clínicos (D'SOUZA *et al.*, 2019). Alguns estudos já apontam para genes de resistência em animais como suínos e bovinos (HAMOUDA *et al.*, 2011, WARETH *et al.*, 2019), cachorro, gatos, cavalos (WARETH *et al.*, 2019, MABONI *et al.*, 2020). Portanto, a busca por genes de resistência deve ser realizada em todas as espécies do complexo *Acb* para melhor compreender seu impacto e contribuir para a redução do uso indiscriminado de antimicrobianos na clínica e na produção animal (WONG *et al.*, 2017).

## **2.3 Principais Agentes de importância em Saúde Única**

### **2.3.1 *Staphylococcus* spp. meticilina resistentes e produtores de $\beta$ -lactamases**

*Staphylococcus* spp. são cocos Gram-positivos de grande importância, principalmente por ser uma das principais causas de endocardite (PEREIRA *et al.*, 2018), bacteremia (GARCIA *et al.*, 2021), osteomielite (DE FREITAS *et al.*, 2019) e infecções de pele e tecidos moles (OLDER *et al.*, 2020) em animais. Uma variedade de espécies coagulase negativas e coagulase positivas são identificadas em animais ao longo dos anos.

Identificado pela primeira vez em fluido purulento de um abscesso na perna por Ogston na década de 1880 (NEWSOM, 2008), o *Staphylococcus aureus* está bem adaptado ao seu hospedeiro humano e ao ambiente de assistência à saúde. Entretanto, em 1985 foi observado pela primeira vez em mamite ovina (FERNANDES & CARDOSO, 1985) mostrando adaptação a diferentes ambientes e espécies animais.

Após a descoberta da penicilina por Fleming em 1928 essas infecções tiveram tratamento, porém a resistência surgiu na década de 1940, mediada pelo gene *blaZ* codificador da enzima  $\beta$ -lactamase (HARKINS *et al.*, 2017). A meticilina (Celbenin), um  $\beta$ -lactâmico semi-sintético, considerado penicilinas anti-estafilocócicas foi introduzida no Reino Unido em 1959 para contornar a crescente resistência à penicilina em *S. aureus* (WATKINS *et al.*, 2019), porém, foi observado dentro de 1 ano de seu primeiro uso clínico *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (TURNER *et al.*, 2019), ou seja, em 1961 foi documentado o primeiro caso de *S. aureus* resistente à meticilina, um  $\beta$ -lactâmico sensível à ação das  $\beta$ -lactamases e, a partir daí essa cepa se tornou um problema clínico e epidemiológico mundial (BARBER, 1961). Em

animais domésticos, o primeiro caso em animais foi documentado em 1972 (DEVRIESE *et al.*, 1972).

A infecção por MRSA ocorre globalmente, mas não há uma única cepa pandêmica. Em vez disso, o MRSA tende a ocorrer em ondas de infecção, muitas vezes caracterizadas pelo surgimento em série de cepas predominantes (HARKINS *et al.*, 2017). *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi identificado como um dos principais patógenos de risco associados ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana (WATKINS *et al.*, 2019).

A resistência à meticilina é mediada por *mecA* e adquirida por transferência horizontal de um elemento genético móvel denominado staphylococcal cassette cromossomo *mec* (SCC*mec*) (TURLEJ *et al.*, 2011). O gene *mecA* codifica a proteína de ligação à penicilina 2a (PBP2a), uma enzima responsável pela reticulação dos peptidoglicanos na parede celular bacteriana. A PBP2a tem baixa afinidade por  $\beta$ -lactâmicos, resultando em resistência a toda essa classe dos  $\beta$ -lactâmicos (LIM *et al.*, 2002).

O surgimento de resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* está bem documentado e a espécie provou ser particularmente hábil na evolução da resistência em face de novos desafios antimicrobianos (WATKINS *et al.*, 2019). A OMS (2017) identificou *Staphylococcus aureus* meticilina resistente como uma superbactéria de prioridade de nível alto, gerando um alerta para as outras espécies em animais (HOLMSTROM *et al.*, 2020). *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS) são importantes patógenos humanos que também são uma preocupação na medicina veterinária e na pecuária (MELO *et al.*, 2019).

### 2.3.2 *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina

*Enterococcus* spp são cocos Gram-positivas, facultativas quanto a utilização ou não de oxigênio, comuns na microbiota do trato gastrointestinal, podendo ser encontradas também nas mucosas e na pele de animais e humanos, além de habitar o solo e alguns alimentos (DOS SANTOS *et al.*, 2021). São bactérias de grande importância, principalmente por ser uma das principais causas de endocardite (GAGGINI *et al.*, 2018), infecção urinária (MENIN *et al.*, 2008) e sepse (SILVA-MARIANO *et al.*, 2021) em animais.

Desde 1988, enterococos resistentes à vancomicina (VRE) têm sido encontrados em pacientes com doenças críticas devido ao uso extensivo de antimicrobianos, internações hospitalares prolongadas e internação em unidade de terapia intensiva (PREMATUNGE *et al.*, 2016). A OMS identificou *Enterococcus faecium* vancomicina resistente como uma

superbactéria de prioridade de nível alto, gerando um alerta para as outras espécies em animais (AARESTRUP *et al.*, 1996).

Os genes envolvidos na resistência à vancomicina são chamados de *van* e permitem modificações no dipeptídeo D-Ala-D-Ala (do peptidoglicano) que é o alvo do antimicrobiano, levando à redução de afinidade de ligação à vancomicina e fazendo com que o efeito do antimicrobiano seja perdido (LEE *et al.*, 2018). O primeiro caso de *Enterococcus* vancomicina resistente no Brasil foi identificado em 1996 em um hospital no estado do Paraná, posteriormente amostras foram encontradas em São Paulo e no Rio de Janeiro (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

Até o momento, os operons relacionados à resistência à vancomicina para enterococos são descritos como *vanA*, -B, -C, -D, -E, -G, -L, -M e N. A maioria dos surtos de *Enterococcus* resistente à vancomicina em populações é atribuída aos agrupamentos de genes *vanA* e *vanB* ambos também identificados em vários animais colonizados e materiais ambientais (AHMED & BAPTISTE, 2018), então, os fenótipos *vanA* e *vanB* são os mais relevantes clinicamente e geralmente associados com cepas de *E. faecium* e *E. faecalis*, enquanto que o fenótipo *vanC* confere uma característica intrínseca de baixo nível e intransferível, e tem sido observado principalmente em *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

As bases genéticas e moleculares da resistência à vancomicina foram descritas com evidências de que os *Enterococcus* vancomicina resistentes podem atuar como reservatórios e fontes de outros genes resistentes a antimicrobianos (AHMED & BAPTISTE, 2018).

### 2.3.3 *Streptococcus* spp. não suscetíveis à penicilina

O gênero *Streptococcus* é um grupo heterogêneo de bactérias cocos Gram-positivas. São classificados com base na hemólise em meio de cultura ágar sangue, reações bioquímicas e especificidade sorológica. As infecções por *Streptococcus* spp. comumente são graves e caracterizam-se por sepse toxemia ou choque séptico (SILVA-MARIANO *et al.*, 2021) em animais de todas as idades. *Streptococcus* spp. pode ser considerada uma bactéria ambiental muito contagiosa (KACZOREK *et al.*, 2017). *S. pneumoniae* foi isolado pela primeira vez por Louis Pasteur em 1881 (VAISSAIRE *et al.*, 1988).

*Streptococcus* spp. são únicos entre os principais patógenos no sentido de que são incapazes de adquirir quaisquer genes de resistência a  $\beta$ -lactâmicos exógenos. No entanto, eles podem progressivamente mutar suas próprias PBPs *in vitro* (HAENNI *et al.*, 2018).

A expressão fenotípica da resistência à penicilina é resultado de uma modificação estrutural genética em uma ou mais proteínas de ligação à penicilina (PBPs), reduzindo assim a síntese de peptidoglicano. Essa diminuição na afinidade de ligação enfraquece a integridade da parede celular bacteriana, o que pode levar à lise celular e à morte. Seis PBPs foram descritas em *S. pneumoniae*. A maioria da resistência aos beta-lactâmicos parece estar associada às alterações em PBP: PBP1a, 2x e 2b. A PBP2a tem sido associada à diminuição da suscetibilidade e MICs mais altas, em contraste com a PBP2b e PBP2x, que conferem resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (CHERAZARD *et al.*, 2017). De fato, nenhum isolado carregando uma  $\beta$ -lactamase (como bactérias Gram-negativas) ou uma nova PBP (como *Staphylococcus* spp.) foi descrito até o momento, e algumas espécies, incluindo *S. pyogenes*, são incapazes de desenvolver diminuição da suscetibilidade à  $\beta$ -lactâmicos *in vitro* (HAENNI *et al.*, 2018).

A OMS (2017) considera *Streptococcus pneumoniae* não susceptível à penicilina como uma bactéria de média prioridade. Existe uma extensa variação nos níveis de não suscetibilidade à penicilina dos isolados, o que reflete a complexidade genética dos mecanismos de resistência do *S. pneumoniae* aos  $\beta$ -lactâmicos. Os primeiros isolados de *Streptococcus pneumoniae* não susceptível à penicilina relatados, foram em Massachusetts (EUA) na década de 1960 (KISLAK, 1965). A sensibilidade dos *Streptococcus* dos grupos A, B, C e G às penicilinas é inferida a partir da sensibilidade à benzilpenicilina, com exceção da fenoximetilpenicilina e isoxazolilpenicilinas para *Streptococcus* do grupo B (BrCAST, 2022).

Os mecanismos de resistência intrínseca do gênero *Streptococcus* estão relacionados a ausência de nitro-redutases necessárias para converter o metronidazole nos seus metabólitos ativos conferindo, portanto, resistência a este fármaco.

### 2.3.4 Bactérias produtoras de ESBL ( $\beta$ -lactamases de Espectro Estendido)

As ESBL são enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira e quarta gerações e aztreonam (monobactâmicos), e são inativadas por inibidores como clavulanato, sulbactam e tazobactam. As primeiras cepas produtoras de ESBL foram identificadas em 1983, e desde então têm sido detectadas em todo o mundo. Essa distribuição é um resultado da expansão clonal de organismos produtores de ESBL, da transferência horizontal de genes codificadores de ESBL em plasmídeos e, menos comumente, surgimento de novas enzimas (BRCAST, 2021; BUSH-JACOBY-MEDEIROS, 1995).

A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, mediada por enzimas  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL), é um problema crescente em todo o mundo (CORMICAN *et al.*, 1996). Na década de

1980 as cefalosporinas de espectro estendido (cefalosporinas de terceira geração, como ceftriaxona e cefotaxima) ganharam amplo uso clínico e foram desenvolvidos por causa do aumento da prevalência de hidrolisante de ampicilina  $\beta$ -lactamases (TEM-1, TEM-2 e SHV-1) em Enterobacteriaceae, bacilos Gram-Negativos não fermentadores de glicose e alguns patógenos respiratórios como *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhal* (RUPP & FEY, 2003).

Existem vários genes codificadores de ESBL, sendo que as enzimas com tais características pertencem ao grupo 2be (tipo TEM, SHV e CTX-M) e se destacam por estarem mais dispersas. As  $\beta$ -lactamases do grupo CTX-M são um grupo de ESBLs que são distintos das ESBLs TEM e SHV. Essas enzimas foram cada vez mais relatadas na década de 1990 e, no início dos anos 2000 como o grupo de ESBLs mais frequentemente identificado (IOVLEVA *et al.*, 2017).

No laboratório de microbiologia clínica, a produção de uma ESBL por bactérias Gram-negativas é definida por suscetibilidade reduzida a um ou mais dos seguintes agentes (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, cefpodoxima ou aztreonam) e potencialização da atividade desses agentes na presença de ácido clavulânico (IOVLEVA *et al.*, 2017).

A OMS (2017) considera bactérias da Ordem Enterobacterales produtoras de ESBL como patógenos de nível crítico.

### 2.3.5 Bactérias produtoras de carbapenemases

Os carbapenêmicos correspondem à classe de antimicrobianos de escolha no tratamento de infecções provocadas por cepas resistentes às penicilinas e às cefalosporinas de última geração, ou seja, agente utilizado para tratar organismos produtores de ESBL (RUPP & FEY, 2003). Entretanto, a utilização destes antimicrobianos deve ser seletivo e controlado, uma vez que esses agentes induzem a produção de *AmpC*, que é um gene que codifica mecanismos de resistência associados à perda ou à expressão reduzida de proteínas relativas às porinas ou à superprodução de bombas de efluxo e à produção de carbapenemases. Infecções oriundas de cepas resistentes a carbapenêmicos são reportadas em diversos países de diferentes continentes e vários são os mecanismos envolvidos na resistência de patógenos a esta classe de fármacos, podendo destacar a produção de enzimas (DE CARVALHO *et al.*, 2021).

A enzima de maior destaque é a produção de  $\beta$ -lactamases, formando o principal mecanismo relacionado à resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, como penicilinas, cefamicinas,

cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. A enzima associa-se não covalentemente ao anel  $\beta$ -lactâmico (AZEVEDO *et al.*, 2020).

Segundo a OMS, bactérias da Ordem Enterobacterales carbapenemase resistente e produtoras de ESBL, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosas*, ambas resistentes ao carbapenêmicos são caracterizadas como superbactérias de nível crítico de importância mundial. A principal preocupação em relação ao desenvolvimento da resistência aos carbapenêmicos está relacionada a utilização desses antimicrobianos no tratamento de infecções multirresistentes.

Essas enzimas pertencem a diferentes classes moleculares, nas quais as serinas  $\beta$ -lactamases pertencem a classe A (penicilinases), as metallo  $\beta$ -lactamases pertencem a classe B (metaloenzimas) e a classe D é formada pelas oxacilinases que partilham a capacidade de hidrolisar uma classe específica de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (BrCAST, 2021). Os principais tipos de carbapenemases descritos são IMP, VIM, GES/IBC, KPC, NDM e OXA do grupo BLA (DA SILVA *et al.*, 2018).

As carbapenemases de classe A podem ser codificadas por plasmídeos ou podem ser cromossômicas, e são parcialmente inibidas pelo ácido clavulânico (KOPOTSA *et al.*, 2019.). As KPCs são as carbapenemases de classe A mais frequentemente identificadas. As metallo- $\beta$ -lactamases de classe B são capazes de hidrolisar todos os  $\beta$ -lactâmicos, exceto o aztreonam, e sua atividade hidrolítica é reduzida ou inibida pelo EDTA, mas não pelo ácido clavulânico (BrCAST, 2021). As enzimas de classe D, podem ser subdivididas em cinco famílias, nomeadamente as carbapenemases OXA-23, -24/40, -48 e -58, que são principalmente codificadas por plasmídeo, e a carbapenemase OXA-51 que é codificada cromossomicamente e constitui um mecanismo intrínseco de resistência em *Acinetobacter baumannii* (TAKEBAYASHI *et al.*, 2021).

### 2.3.6 Bactérias resistentes à colistina

A polimixina E ou colistina surge no século XXI como uma das últimas alternativas terapêuticas para tratar infecções causadas por bacilos Gram-negativos extremamente resistentes (XDR) (DA SILVA *et al.*, 2018; BARON *et al.*, 2016). Contudo, o recente aparecimento de resistência à colistina preocupa a comunidade médica e científica (AGHAPOUR *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2010).

De acordo com a Nota Técnica 01/2013 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), a terapia empírica apropriada para infecções por enterobactérias multirresistentes é a

utilização de polimixina B ou polimixina E (colistina), em associação com um ou mais antimicrobianos, como aminoglicosídeos (gentamicina ou amicacina), carbapenêmicos (meropenem ou doripenem) e tigeciclina, evitando-se a utilização de monoterapia, devido ao risco de desenvolvimento de resistência.

Até 2015, os mecanismos de resistência da colistina relacionavam-se a ocorrência de mutações cromossômicas, ou seja, apenas se observava uma transmissão vertical, incapaz de se disseminar para outras bactérias. O principal mecanismo de resistência cromossômica inclui a modificação do lipopolissacarídeo, através da substituição dos grupos fosfato do lípideo A, carregados negativamente, por grupos de 4-amino-4-desoxi--L-arabinose (L-Ara4N) e fosfoetanolamina (PEtN), carregados positivamente. A síntese de L-Ara4N e PEtN é mediada por meio dos sistemas reguladores *PmrA-PmrB* e *PhoP-PhoQ*, cuja ativação é desencadeada por mutações específicas nos próprios sistemas ou perante a exposição a estímulos ambientais adversos, nomeadamente, a exposição a polipéptidos catiónicos antimicrobianos, como a colistina (AGHAPOUR *et al.*, 2019).

Apenas os genes *mcr* mediados por plasmídeo foram identificados como mecanismo de resistência transferível (AGHAPOUR *et al.*, 2019). Várias evidências sugerem que o principal reservatório do gene *mcr-1* é de origem animal (LIU *et al.*, 2016). Rabelo e colaboradores (2018) realizou uma revisão de literatura mostrando que os *mcr-2*, 3, 4 e 5 também foram descritos pela primeira vez em amostras animais. Borowiak e colaboradores (2020) realizaram uma revisão e descreveram os genes *mcr-6*, 7 e 8 em amostras animais e ambientais.

Recentemente, o gene *mcr-9* induzível foi adicionado ao número crescente de genes *mcr* (CARROLL *et al.*, 2019). Esses resultados aumentaram ainda mais as preocupações de saúde pública relacionadas ao surgimento, persistência e disseminação da resistência à colistina móvel e reforçaram a necessidade de exames extensivos contínuos em Enterobacteriaceae. Os genes *mcr-1*, 4 e 5 são descritos como os mais circulantes (BOROWIAK *et al.*, 2020).

A excessiva utilização da colistina em produção animal é apontada como a principal causa da amplificação e disseminação da resistência à colistina, que atua como uma pressão seletiva do plasmídeo portador do gene. Além disso, poucos casos relataram a identificação de genes *mcr* (como *mcr-1*, -2, -3 e -5) em cromossomos bacterianos, o que representou a possível transferência para o cromossomo de plasmídeos pelos transposons ao redor do gene *mcr* (LUO *et al.*, 2020). Em 2020, Wang e colaboradores detectaram a primeira cepa de Enterobacteriales apresentando *mcr-10*.



O gene *mcr* possui uma diversidade de vetores de transmissão, sendo passível ser transportado em diversos tipos de plasmídeos (KEMPF *et al.*, 2016). A co-ocorrência de genes *mcr* com carbapenemases no mesmo plasmídeo conjugativo pode anunciar a possibilidade de infecções bacterianas incuráveis, bem como a possibilidade de transmissão horizontal de ambos os tipos de genes de resistência a antimicrobianos para outras bactérias Gram-negativas (LUO *et al.*, 2020).

#### **2.4 Fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli* aviária patogênica (APEC)**

A *Escherichia coli* é considerada um habitante normal do trato gastrointestinal do homem e dos animais (SUBEDI *et al.*, 2018). O grupo das cepas de *Escherichia coli* que causam infecções extraintestinais são designadas como ExPEC (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Pertencem a esse grupo de *Escherichia coli* extraintestinal (ExPEC): a *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC), *Escherichia coli* causadora de meningite neonatal (NMEC) e a *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) (CUNHA *et al.*, 2015).

Infecções por *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) causam colibacilose, uma doença aguda caracterizada por lesões de múltiplos órgãos como saculite aérea, pericardite, peritonite, salpingite, sinovite, osteomielite ou infecção do saco vitelino (MAIORKI & FUKUMOTO, 2021). A colibacilose é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em aves em todo o mundo, resultando em perdas econômicas significativas na indústria avícola (MAIORKI & FUKUMOTO, 2021; EWERS *et al.*, 2003). As aves domésticas são reconhecidas como importante fonte de disseminação de resistência antimicrobiana em amostras de *Escherichia coli* (HUSSAIN *et al.*, 2017). O conhecimento sobre a epidemiologia da APEC é escasso (IEVY *et al.*, 2020).

A variedade de fatores de virulência têm sido implicados na promoção dessas doenças extraintestinais em espécies aviárias, incluindo adesinas (F1-, P-, AC/I- e F17-fímbrias, curli fibras e adesinas afimbriais), aquisição de ferro (aerobactina e yersiniabactina), hemolisinas (hemolisina E e um hemaglutinina), fatores antibactericidas (membrana externa proteína A, proteína para aumento da sobrevivência sérica, lipopolissacarídeo, cápsula K1 e produção de colicinação) e toxinas (toxina estável ao calor, cito/verotoxina, toxina flagelar e toxina autotransportadora vacuolizante) (IEVY *et al.*, 2020). A capacidade patogênica da cepa de *E. coli* é facilitada por uma ampla gama de fatores de virulência que são codificados por genes associados à virulência (*iutA*, *iss*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *irp-2*, *ompT*, *hlyF*, ferro, *cva/cvi* e *astA*) (SUBEDI *et al.*, 2018).

Quando há mais de três genes de virulência, são considerados APEC e quando tem um ou dois genes são considerados AFEC (*Avian fecal comensal*). Alguns genes de virulência são considerados mais importantes nas cepas APEC, como é o caso do gene receptor de siderófilo Samochelin (*iroN*), gene codificador de protease de membrana externa epissomal (*ompT*), gene codificador de hemolisina putativa de *E. coli* aviária (*hlyF*), gene de sobrevivência ao soro (*iss*), e gene receptor de siderófilo aerobactina (*iutA*) (JOHNSON *et al.*, 2008).

Há vários sorogrupos diferentes de isolados de *Escherichia coli* de galinhas septicêmicas, os sorogrupos O1:K1, O2:K1 e O78:K80 ainda são reconhecidos como os mais prevalentes (IEVY *et al.*, 2020).

## **2.5 Tipagem molecular pela técnica de *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE) de cepas de pertencentes ao Complexo *Acinetobacter-calcoaceticus Acinetobacter-baumannii***

Os métodos de tipagem molecular fornecem dados muito úteis sobre a fonte e a taxa de disseminação de infecções nas populações estudadas. A realização da tipagem bacteriana é usada para discriminar diferenças e similaridades entre cepas, sendo uma ferramenta importante para investigação de surtos, vigilância e estudos filogenéticos (NEOH *et al.*, 2019).

Os primeiros experimentos de tipagem foram realizados por meio de experimentos bioquímicos cujos resultados foram baseados no fenótipo da bactéria testada, como resistência a antimicrobianos, suscetibilidade a fagos (tipagem de fagos) e transporte de antígenos de superfície (sorotipagem) (FOXMAN *et al.*, 2005). Com o advento da biologia molecular, os métodos de tipagem baseados em DNA ganharam popularidade, pois os resultados desses protocolos são geralmente reprodutíveis devido à natureza estável do DNA, e geralmente são mais rápidos e menos trabalhosos (ADZITEY *et al.*, 2013).

A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é considerada a “abordagem molecular de terceira geração” para tipagem de bactérias (GOERING, 2010). Devido à sua maior eficácia superior continua a ser o “padrão ouro” para subtipagem de muitas bactérias (NEOH *et al.*, 2019; DURMAZ *et al.*, 2009). A PFGE tem várias aplicações. Por ser uma ferramenta para produzir impressões digitais de DNA para isolados bacterianos, a técnica tem sido utilizada para estabelecer bancos de dados de bactérias com base nos padrões de bandas PFGE de cada cepa. As informações deste banco de dados são usadas para identificar bactérias no monitoramento de segurança alimentar e também para estudos filogenéticos de bactérias (NEOH *et al.*, 2019).

A eletroforese em gel de agarose é a técnica mais difundida para separação de moléculas de DNA com relação ao tamanho. A matriz formada pela agarose atua como filtro molecular, cuja porosidade é inversamente proporcional à concentração do gel de agarose. Durante a eletroforese, as moléculas de DNA se posicionam em paralelo ao campo elétrico; a dificuldade de transpor a matriz de agarose em direção ao pólo positivo é inversamente proporcional ao tamanho de cada molécula. As menores migram mais rapidamente possibilitando a separação por tamanho ou peso molecular. Assim, quanto maior a molécula, maior o tempo de migração, possibilitando a separação dos fragmentos, qualquer que seja o tamanho. A qualidade do DNA preparado para a corrida eletroforética é de fundamental importância. Como o objetivo é a separação de fragmentos de alto peso molecular, é imprescindível assegurar sua integridade (NEOH *et al.*, 2019; MAGALHÃES *et al.*, 2005).

Para facilitar a análise quando muitas amostras são executadas em um gel ou quando amostras de diferentes géis são comparadas, algoritmos foram desenvolvidos para atribuir representação numérica de um padrão PFGE específico. Para isso, os padrões de banda que estão sendo comparados devem ser produzidos usando o mesmo protocolo e padrão de referência (NEOH *et al.*, 2019). É uma técnica que possui vantagens e desvantagens, tem sido a abordagem padrão-ouro para tipagem de cepas bacterianas em investigações de surtos hospitalares, mas foram descritas algumas desvantagens, incluindo que é um ensaio demorado, trabalhoso e tecnicamente exigente. Por essas razões, o sequenciamento de próxima geração (NGS) surgiu como um método de epidemiologia molecular promissor em investigações de surtos associados à assistência à saúde (KANAMORI *et al.*, 2015).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Ampliar o conhecimento a respeito da diversidade de espécies bacterianas circulantes em ambientes de produção, manutenção e cuidados hospitalares de animais, bem como seu perfil de resistência, visando estabelecer, dentro de uma perspectiva da Saúde Única, o papel do ambiente animal na emergência e disseminação de clones bacterianos resistentes.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar, por métodos fenotípicos, proteômicos e genotípicos, as espécies bacterianas de importância em Saúde Única circulantes em ambientes de produção, manutenção e cuidados hospitalares de animais;
- Comparar a eficácia das técnicas fenotípica, proteômica e genotípica para a identificação de espécies do complexo *Acinetobacter calcoaceticus*- *Acinetobacter baumannii* (*Acb*) oriundas de amostras de animais;
- Avaliar a resistência fenogenotípica a classe dos  $\beta$ -lactâmicos, em isolados de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- Detectar os genes de resistência à Polimixina E ou colistina, *mcr* de 1 a 9 em isolados de bactérias Gram-negativas;
- Detectar os genes relacionados a resistência a vancomicina, *vanA* e *vanB*, em *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp.;
- Detectar genes de virulência em cepas de *Escherichia coli*;
- Tipificar as espécies do complexo *Acb* pela técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostragem

#### 4.1.1 Animais Selvagens

Foram coletados amostras com suabes com meio de transporte de 24 maritacas (coana e cloaca), 1 jabuti (cloaca), 2 mãos peladas (conduto auditivo e reto) e 1 cachorro do mato (conduto auditivo, nasal e reto), totalizando 56 amostras de animais oriundos do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS-RJ, Ibama, Seropédica) no ano de 2021 (número de CEUA 8969230919). A **Figura 1** ilustra a coleta realizada em jabuti.



**Figura 1:** Avaliação e coleta de amostra de Jabuti em 2019.  
Período anterior à pandemia (Acervo pessoal).

#### 4.1.2 Avicultura UFRRJ

Foram coletadas amostras com suabes com meio de transporte de traqueia de 5 frangos, cloaca de 30 frangos e cloaca de 25 pintinhos de 1 dia, totalizando 60 amostras de animais oriundos do setor de Avicultura da UFRRJ (Seropédica, Rio de Janeiro). Além das amostras oriundas dos animais, foram coletadas amostras biológicas randomizadas da cama em três momentos distintos (primeiro lote, no momento de enleiramento e segundo lote), como mostra a **Figura 2**, no ano de 2021.



**Figura 2:** A Coleta das aves; B coleta dos pintinhos e C coleta da cama do setor de Avicultura da UFRRJ (Acervo pessoal).

#### **4.1.3 Processos infecciosos em animais domésticos e amostra de resíduos de cama**

Foram avaliadas 190 cepas de cocobacilos Gram-negativos não fermentadores oriundos de distintos processos infecciosos em cães, gatos e cavalo durante os anos de 2018 a 2020 de laboratório particular do Rio de Janeiro. Essas amostras foram selecionadas para a pesquisa de cepas pertencentes ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus*- *Acinetobacter baumannii*. Foram incluídas nesta caracterização duas cepas oriundas de amostras de resíduos de cama de avicultura de sistema orgânico e convencional. Totalizando 35 cepas pertencentes a este complexo.

#### **4.2 Identificação Fenotípica**

##### **4.2.1 Isolamento e identificação primária das amostras de animais selvagens**

As amostras foram inoculadas em meio enriquecido e não seletivo Ágar Sangue de Carneiro a 5% (ASC- HiMedia®) e em meios seletivo e diferenciais como mostra o esquema da **Figura 3**. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 horas, e após este período foi realizada a identificação presuntiva por coloração de Gram, catalase e KOH 3% das colônias isoladas (KONEMAN *et al.*,2018).

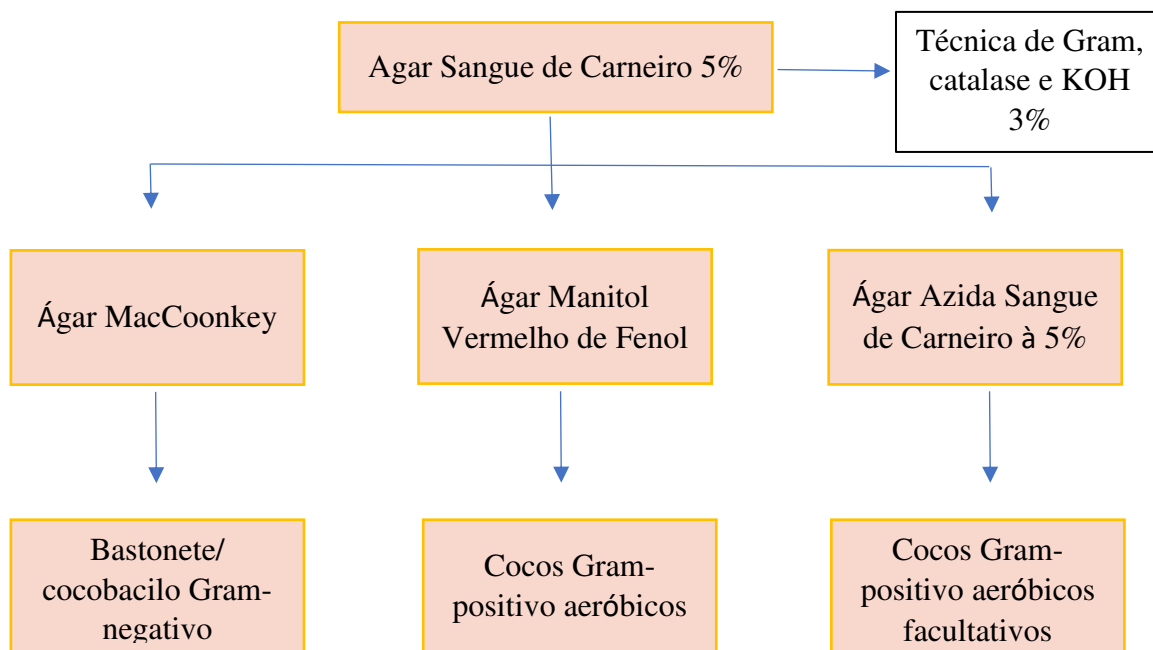


Figura 3: Esquema de isolamento e identificação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (compilação da autora).

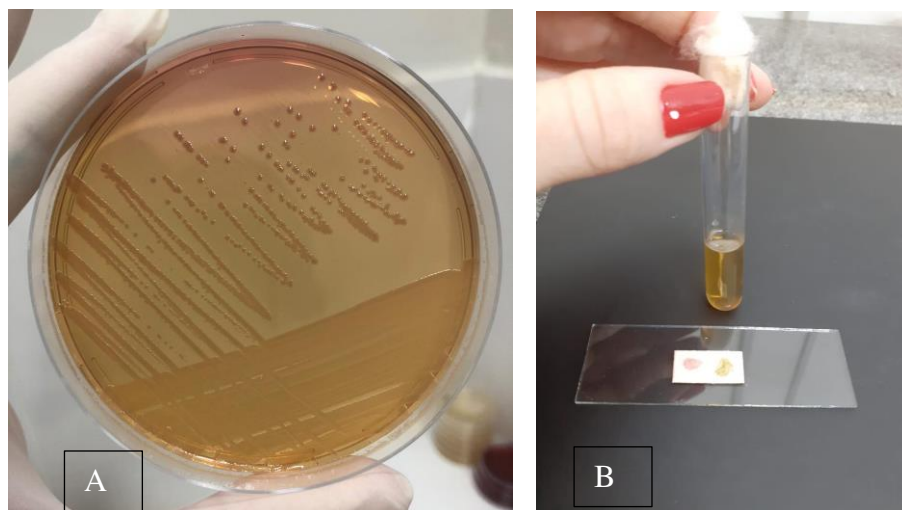
#### 4.2.2 Isolamento e identificação primária das amostras da avicultura

Os isolamentos primários das aves foram realizados em meio não seletivo Ágar Sangue de Carneiro a 5% (ASC- HiMedia®) seguindo o esquema apresentado na **Figura 3** (KONEMAN *et al.*, 2018).

#### 4.2.3 Isolamento e identificação primária das cepas oriundas de processos infecciosos em animais domésticos e amostra de resíduos de cama

As cepas foram repicadas em ágar seletivo MacConkey (AMC) (microMED, ISOFAR®) incubados  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas para obtenção de culturas de *Acinetobacter* spp. Após incubação, verificou-se as características das colônias, fermentação ou não, da lactose (KONEMAN *et al.*, 2018), sendo selecionadas as colônias não fermentadoras.

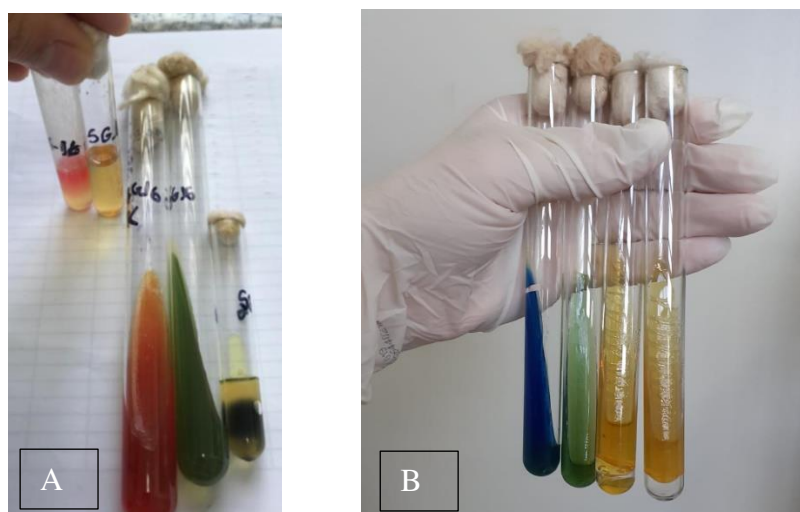
Em seguida foi realizada as técnicas de Gram, catalase, oxidase e motilidade das cepas (KONEMAN *et al.*, 2018), selecionando àquelas que fossem Gram-negativos não fermentadores, catalase, oxidase e motilidade negativas, conforme ilustrado na **Figura 4 (A e B)**.



**Figura 4:** A A morfologia da colônia de bactéria do complexo *Acb* em placa contendo ágar Macconkey, que é não fermentadora; B Análise de motilidade e oxidase negativos (Acervo pessoal).

### 4.3 Identificação fenotípica de isolados Gram-negativos fermentadores

Para aqueles isolados identificados como bastonetes e/ou cocobacilos Gram-negativos em animais selvagens e avicultura, foi realizada a bateria bioquímica IMViC e TSI, nos quais foram avaliadas a produção de Indol,, a análise da via fermentativa dos ácidos mistos (Vermelho de Metila-VM), da via do butilenoglicol (Voges-Proskauer-VP), a utilização do Citrato de Simmons e a fermentação dos açúcares glicose, lactose e sacarose e avaliação de produção de gás (Três Açúcares Ferro-TSI), (KONEMAN *et al.*, 2018), conforme ilustrado na **Figura 5** (A e B).



**Figura 5:** A Bateria de IMViC + TSI para análise bioquímica de Enterobacterales; B Citrato positivo negativo e TSI fermentativo com produção de gás respectivamente. (Acervo pessoal).



#### 4.4 Identificação fenotípica das cepas Gram-positivas

##### 4.4.1 *Staphylococcus* spp.

Para aqueles isolados identificados como cocos Gram-positivos catalase positivos, foi realizada a prova da coagulase e resistência à bacitracina (0,04 UI) (SENSIFAR-CEFARR). Os estafilococos são resistentes à bacitracina e crescem até a borda do disco, enquanto que os micrococos são sensíveis e apresentam halo de, no mínimo, 10 mm. A prova da coagulase para a caracterização dos grupos de estafilococos coagulase-positivos e coagulase negativos. Os isolados coagulase-positivos foram submetidos posteriormente à prova de fermentação dos carboidratos: maltose e manose, resistência a polimixina B e prova de Voges-Proskauer (VP) para identificação das espécies (KONEMAN *et al.*, 2018).

##### 4.4.2 *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Para aqueles isolados identificados como cocos Gram-positivos catalase negativos, hemolíticos ou não, foi realizada análise da suscetibilidade à bacitracina (0,04UI) e sulfametoxazol + trimetoprim (25ug) (SENSIFAR-CEFARR). Após esta etapa os isolados foram submetidos à prova de bile-esculina, crescimento em caldo BHI (Brain Heart Infusion-HIMEDIA) hipertônico (6,5% de NaCl) e açúcares para diferenciação de espécies de *Enterococcus* spp. (KONEMAN *et al.*, 2018), como mostra a **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Diferenciação dos gêneros de *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Identificação	Crescimento em Caldo BHI com 6,5% de NaCl	Bile-esculina	arabinose	sorbitol	Espécies
<i>Streptococcus</i> spp.	-	v	n.a.	n.a	Não determina
<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	-	+	<i>E. faecalis</i>
	+	+	+	-	<i>E. faecium</i>

\*n.a- não avaliado.

#### 4.5 Identificação proteômica por MALDI-TOF MS

A identificação proteômica pela técnica do Tempo de Vôo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS) foi realizada como análise confirmatória do fenotípico para todas as bactérias de interesse. A avaliação foi realizada no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) do Instituto de Microbiologia Paulo Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os isolados foram cultivados em ágar BHI (KASVI®) a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas. Cada cultura bacteriana foi transferida, em duplicata, para

a microplaca (96 MSP, Bruker - Billerica, EUA) e, ao sedimento bacteriano, foi adicionada uma solução de lise (ácido fórmico 70%, Sigma-Aldrich®) em quantidade suficiente para cobri-lo. Em seguida, 1 µl de solução da matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 2,5%, Sigma-Aldrich®) foi utilizado para cobrir o extrato bacteriano, para finalmente ser processado. Os espectros de cada amostra foram gerados em um espectrômetro de massa (MALDITOF LT Microflex Bruker, Bruker®) equipado com laser de 337 nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa FlexControl 3.3 (Bruker®). Os espectros foram coletados na faixa de massas entre 2.000-20.000 m/s e posteriormente, analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker®), com as configurações padronizadas para identificação bacteriana. O programa confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência em um banco de dados. Os resultados obtidos variam em uma escala que vai de zero a três, sendo que a confiança de espécie se dá com resultado acima de 2.3.



**Figura 6:** A Leitura e interpretação dos dados com uso de softwares; B Equipamento (Acervo pessoal).

#### **4.6 Identificação Genotípica**

Neste trabalho foram utilizados diferentes materiais como amostras animais e amostras ambientais, e para diferentes objetivos como detecção de genes de resistência, identificação e sequenciamento. Para isto, a lise térmica e sonificação foi realizada para avaliar alguns genes de resistência e identificação, a técnica de extração enzimática foi utilizada para detectar genes de resistência na cama aviária e a extração por kit foi realizada para posterior sequenciamento.

#### 4.6.1 Extração do DNA bacteriano pela técnica de lise térmica

A extração do DNA foi realizada pelo método de lise térmica segundo Buyukcangaz e colaboradores (2013) com modificações estabelecidas pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (LABAC-VET). Os isolados foram ressuspensos em 500  $\mu$ L de água ultrapura e agitada em vórtex, sendo então incubadas a 100°C por 10 minutos. Após o tempo estipulado, os microtubos foram esfriados em temperatura ambiente e centrifugados por 2 minutos a 13.500 rpm. Aproximadamente 400  $\mu$ L do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos de (600  $\mu$ L). Depois disso, os microtubos foram armazenados a temperatura de -20°C. A **Figura 7** ilustra os equipamentos utilizados no processo. Esta técnica de extração do DNA foi realizada nas cepas oriundas das amostras biológicas dos animais selvagens e avicultura.

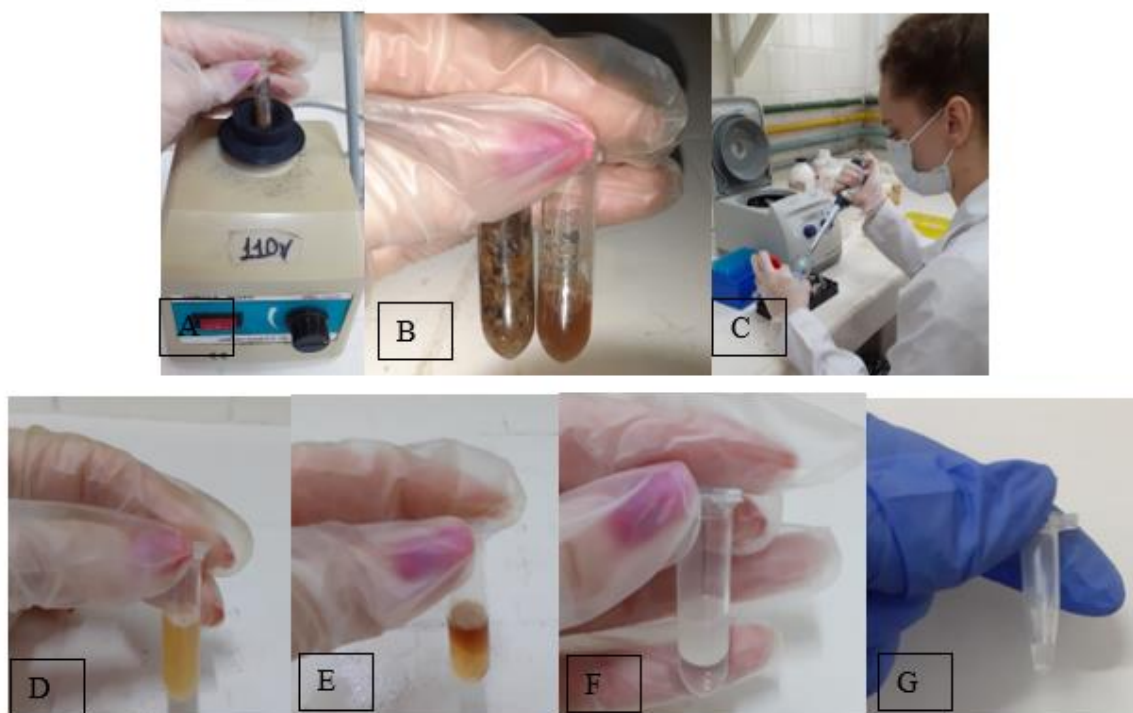


**Figura 7.** A Banho maria; B Centrífuga (Acervo pessoal).

#### 4.6.2 Extração do DNA total da cama aviária pela técnica de extração enzimática

A extração do DNA foi realizada pelo método enzimático Yeates e colaboradores (1998) com modificações estabelecidas pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (LABAC-VET). Foram coletados 0,50g de cama e foram ressuspensos em 1000  $\mu$ L de tampão de extração (1% de CTAB, 1,5 M de NaCl, 0,1 M de EDTA, 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 M Tris-HCl pH 8,0), com 0,4 g de *glass beads* e agitada em vórtex por 5 minutos. Após isso, foram adicionados 500  $\mu$ L de SDS (doecil sulfato de sódio à 20%) e misturadas suavemente, foram incubados a 65° C por 1 hora com leve agitação a cada 15 min. Após o tempo estipulado, os microtubos foram esfriados em temperatura ambiente e centrifugados por 10 minutos a 8.349 rpm. O sobrenadante foi coletado e adicionado 500  $\mu$ L de

tampão de extração. Incubado, novamente, a 65° C por 10 min e centrifugado a 6000g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e acrescido de 330µL de PEG8000 (polietileno glicol à 30%) e NaCl para concentração final de 1,6 M. Misturar levemente e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Após, centrifugado a 10000g por 20 minutos e o precipitado foi ressuscitado em 400 uL de TE (10mM Tris HCl,1mM EDTA pH8,0), adicionando acetato de amônio para concentração final de 2,5M. Colocar no gelo por 5 minutos e centrifugar a 16000g por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido e ressuscitado com o mesmo volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após, centrifugado a 16000g por 5 minutos. A fase superior foi retirada e transferida para um tubo novo (repetido duas vezes). Foi adicionado 1 volume de isopropanol 100 %. Incubado a noite toda em temperatura ambiente e centrifugado a 16000g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e lavado com 500 µL de etanol 70% gelado (duas vezes). O pellet foi ressuscitado em 50 µL de água ultrapura e passado pelo vortex levemente, para homogeneizar bem. A **Figura 8 (A, B, C, D, E, F e G)** ilustra o processo.



**Figura 8.** A Homogeneização da cama com tampão de extração; B Sobrenadante da amostra; C Ressuspensão com TE e acetato de amônio; D Material extraído da cama com TE; E Sobrenadante do material após centrifugação e adição de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1); F DNA total final (Acervo pessoal).

#### **4.6.3 Extração de DNA bacteriano por sonicação para detectar genes de resistência**

A extração do DNA foi realizada pelo método de sonicação pela metodologia estabelecida pelo Laboratório de Pesquisa em Infecções Hospitalares da Fundação Oswaldo Cruz (LAPIH-FIOCRUZ). Os isolados foram ressuspensos em 500 µL de água ultrapura e agitada em vórtex, sendo então incubadas por três vezes por 30 segundos. Após o tempo estipulado, os microbutos foram esfriados em temperatura ambiente e centrifugados por 3 minutos a 13.000 rpm. Aproximadamente 400 µL do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos de (600 µL). Depois disso, os microtubos foram armazenados a temperatura de -20°C.

#### **4.6.4 Extração de DNA bacteriano por kit das cepas de *Acb***

A extração foi realizada por kit eQiagen (QIAamp DNA Mini Kit) e a purificação foi realizada por kit eQiagen (PCR DNA and Gel Band Purification Kit) seguindo manual com algumas modificações estabelecidas pelo Laboratório de Pesquisa em Infecções Hospitalares da Fundação Oswaldo Cruz (LAPIH-FIOCRUZ), local de realização do processo. Esse método de extração foi realizado nas cepas destinadas a identificação das espécies pertencentes ao complexo *Acb*.

#### **4.7 Identificação genotípica das espécies bacterianas**

As seqüências dos *primers* e as condições de amplificação de todos os genes utilizados na identificação das espécies de *Staphylococcus* spp., 16S rDNA e complexo *Acb* estão dispostas no **anexo 1**.

##### **4.7.1 *Staphylococcus* spp.**

Para confirmação de *Staphylococcus* spp foi utilizado o *primer* para pesquisa do gene 16S rRNA de *Staphylococcus* spp., conforme preconizado por Zhang e colaboradores (2004).

##### **4.7.2 Amplificação do gene 16S rDNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

Após a extração do DNA genômico bacteriano, foi realizada a amplificação do gene 16S do rDNA (menor porção do DNA) (27F e 1512R) (SUZUKI & GIOVANNONI, 1996), para checar a qualidade do DNA e sua capacidade de amplificação em cepas não estafilocólicas oriundas de animais selvagens e avicultura.

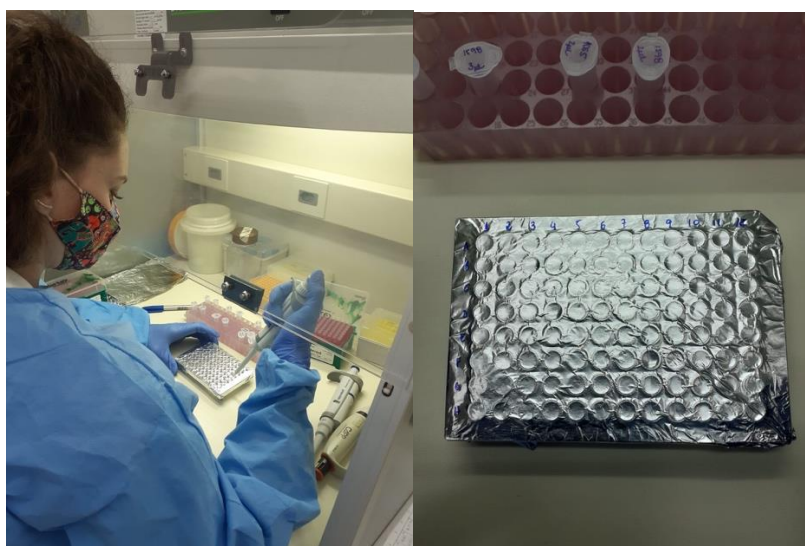
#### 4.7.3 Identificação genotípica das espécies pertencentes ao complexo *Acb* por multiplex PCR

Para confirmação das espécies do complexo *Acb* identificadas foram utilizados os *primers* para a pesquisa dos seguintes genes: *recA* (*Acinetobacter* spp.), *gyrB* (*A. baumannii* e *A. nosocomialis*), região ITS (*A. baumannii*) e região ITS (*A. pittii*) por meio de uma reação multiplex, como preconizado por Chen e colaboradores (2014).

#### 4.7.4 Identificação genotípica das espécies pertencentes ao complexo *Acb* por sequenciamento do gene *rpoB*

Para realizar a técnica padrão ouro baseada na detecção e análise do gene *rpoB* foram realizadas quatro PCRs simplex cobrindo regiões específicas do gene: Zona 1 (Ac696F / Ac1093R ) e 2 (Ac1055f / 1598R) e regiões flanqueadas (AcintLBF / AcintLBR e AcintBCF / AcintBCR), seguido de purificação de produtos de PCR por PCR DNA and Gel Band Purification Kit, quantificação por Quantus fluorometer (Promega) do Laboratório de Pesquisa de Doenças Infecciosas Hospitalares (LAPIH, FIOCRUZ) e, finalmente, sequenciamento (SANGER) conforme recomendado por LaScola *et al.* (2006) (**Figura 9**).

As sequências foram editadas utilizando o programa Bioedit e posteriormente foram comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).



**Figura 9.** A Preparação de placa para sequenciamento; B Placa pronta. (Acervo pessoal).

## 4.8 Análise fenotípica da resistência aos antimicrobianos

### 4.8.1 Preparo do inóculo

Após 18 a 24 horas de incubação a 35°C, as colônias de todas as bactérias de interesse foram ressuspensas em solução salina até se obter uma turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland, o que corresponde a uma concentração de, aproximadamente,  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (CLSI VET, 2020). A **Figura 10 (A e B)** o processo para concentração e padronização do inóculo bacteriano.

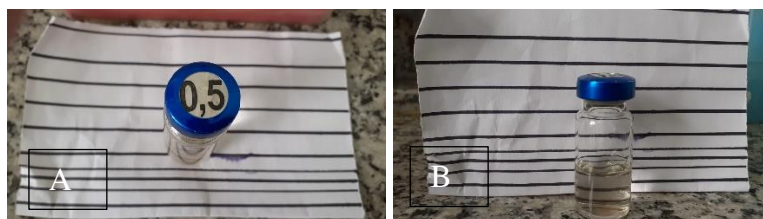


Figura 10: **A** Escala 0,5 de McFarland vista de cima; **B** Equivalência corresponde a uma concentração de, aproximadamente,  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (Acervo pessoal).

### 4.8.2 Triagem fenotípica da resistência aos antimicrobianos

#### 4.8.2.1. Pesquisa de *Staphylococcus* spp. meticilina resistentes

Os testes de difusão em disco para predição de resistência à oxacilina mediada pelo gene *mecA* através da semeadura dos isolados provenientes de suspensões diretas das colônias equivalentes à escala 0,5 de McFarland sobre a superfície de placas contendo ágar Müeller-Hinton, seguido da deposição dos discos de cefoxitina (30 µg) e oxacilina (1µg). Após incubação a 35°C ± 2°C por 18 horas, os diâmetros formados ao redor dos discos foram observados, medidos em milímetros e interpretados (CLSI VET 2020). A tabela 2 demonstra os parâmetros avaliados para a pesquisa da resistência a meticilina.

**Tabela 2.** Determinação de resistência fenotípica mediada pelo gene *mecA*.

Espécies	Antimicrobianos	Halo de inibição (mm)	
		Sensível (≥)	Resistente (≤)
<i>S. aureus</i>	CFO 30µg	21	20
<i>S. lugdunensis</i>	CFO 30µg	21	20
<i>S. pseudintermedius</i>	OXA 1µg	18	17
Outros <i>Staphylococcus</i> spp.	CFO 30µg	25	24

\*CFO-Cefoxitina; OXA- oxacilina.



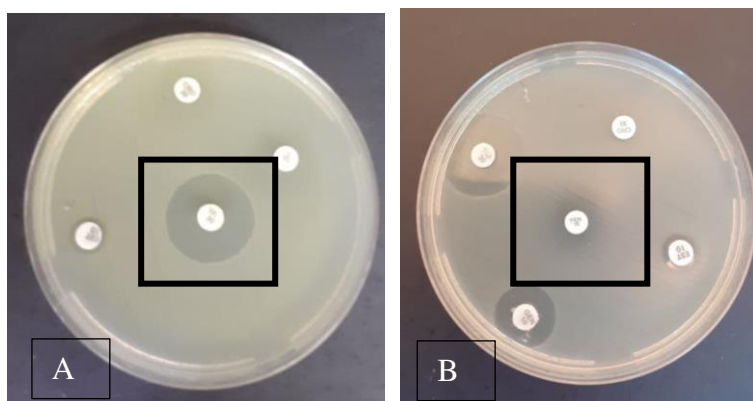
#### 4.8.2.2 Pesquisa de *Staphylococcus* spp. produtores de $\beta$ -lactamases

Foi realizado o teste de difusão em disco para predição de resistência à penicilina mediada pelo gene *blaZ*, sensibilidade à penicilina e avaliação da zona da borda para detecção da produção de  $\beta$ -lactamases, teste da Zona Edge (Tabela 3; Figura 11). Após incubação a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18 horas, os diâmetros formados ao redor dos discos foram observados, medidos em milímetros e interpretados. O objetivo desta avaliação foi detectar resistência e prever o possível mecanismo envolvido, a partir de uma leitura interpretativa dos resultados (CLSI VET, 2020).

**Tabela 3.** Determinação de resistência fenotípica mediada pelo gene *blaZ*.

Espécie	Antimicrobiano	Halo de inibição (mm)	
		Sensível ( $\geq$ )	Resistente ( $\leq$ )
<i>Staphylococcus</i> spp.	PEN 10 $\mu\text{g}$	29	28

\*PEN-Penicilina



**Figura 11.** A Borda da zona bem demarcado indica que o isolado é produtor de  $\beta$ -lactamase; B Borda da zona sem demarcação indicando não produtor de  $\beta$ -lactamase (Acervo pessoal).

#### 4.8.2.3 Pesquisa de HLAR em *Enterococcus* spp.

Foi realizado o teste de difusão em disco utilizando gentamicina e estreptomicina para detectar *high-level aminoglycoside resistance* (HLAR-altos níveis de resistência à aminoglicosídeos). Após incubação a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18 horas, os diâmetros formados ao redor dos discos foram observados, medidos em milímetros e interpretados (Tabela 4). Na mesma placa de petri foi avaliado o disco de ceftriaxona (CRO 30 $\mu\text{g}$ ) ou cefotaxima (CTX 30 $\mu\text{g}$ ), ambas de terceira geração, para confirmação de resistência às cefalosporinas. O objetivo desta



avaliação foi detectar resistência intrínseca a partir de uma leitura interpretativa dos resultados (CLSI VET 2021).

**Tabela 4.** Determinação de resistência fenotípica *HLAR*.

Antimicrobiano	Sensível ( $\geq$ )	Halo de inibição (mm)	
		Inconclusivo	Resistente (=)
GEN 10 $\mu$ g	10	9-7	6
EST 10 $\mu$ g	10	9-7	6

\*GEN – Gentamicina; EST – Estreptomicina

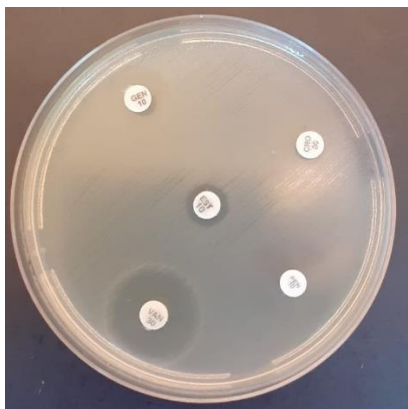
#### 4.8.2.4 Pesquisa de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina

Foi realizado o teste de difusão em disco para predição de resistência à vancomicina (Figura 12) mediada pelo gene *vanA* em isolados de *Enterococcus* spp.. Após incubação a 35°C  $\pm$  2°C por 18 horas, os diâmetros formados ao redor dos discos foram observados, medidos em milímetros e interpretados. O objetivo desta avaliação foi detectar resistência e prever o possível mecanismo envolvido, a partir de uma leitura interpretativa dos resultados (CLSI VET, 2020) (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Determinação de resistência fenotípica mediada pelo gene *vanA* e *vanB*.

Antimicrobiano	Sensível ( $\geq$ )	Halo de inibição (mm)	
		I	Resistente ( $\leq$ )
VAN 30 $\mu$ g	17	16-15	14

\*VAN – Vancomicina, I – Sensível aumentando a exposição



**Figura 12:** Disposição de discos de antimicrobianos para avaliação de resistência em *Enterococcus* spp. (Acervo pessoal).

#### 4.8.2.5 Pesquisa de *Streptococcus* spp. resistentes à penicilina

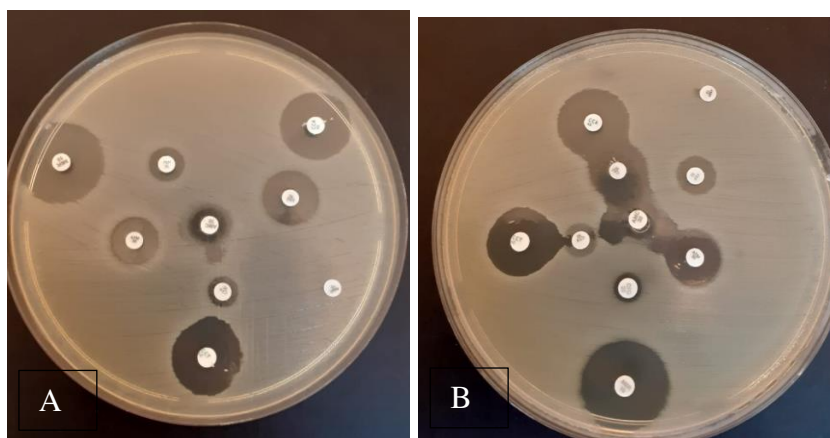
Foi realizado o teste de difusão em disco para predição e susceptibilidade à penicilina. Após incubação a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18 horas, os diâmetros formados ao redor dos discos foram observados, medidos em milímetros e interpretados (**Tabela 6**) (CLSI VET, 2020).

**Tabela 6.** Determinação de resistência fenotípica de susceptibilidade à penicilina.

Espécie	Antimicrobiano	Halo de inibição (mm) Sensível (>)
<i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolítico	PEN 10 $\mu\text{g}$	24

#### 4.8.2.6 Pesquisa de bactérias produtoras de ESBL ( $\beta$ -lactamases de Espectro Estendido) em cepas da Ordem Enterobacterales

Foi realizado o antibiograma utilizando os seguintes discos de antimicrobianos: ampicilina (AMP 10 $\mu\text{g}$ ), ceftazidima (CAZ 30 $\mu\text{g}$ ), cefoxitina (CFO 30 $\mu\text{g}$ ), cefotaxima (CTX 30 $\mu\text{g}$ ), aztreonam (ATM 30 $\mu\text{g}$ ), imipenem (IMP 10 $\mu\text{g}$ ), cefepime (CPM 30 $\mu\text{g}$ ), e amoxicilina + ácido clavulânico (AMC 30 $\mu\text{g}$ ). Neste teste também foi realizada leitura interpretativa que indicou os suspeitos da produção de ESBL. O disco de amoxicilina com ácido clavulânico foi colocado no centro da placa para analisar o sinergismo com cefalosporinas de terceira geração quando produtoras de ESBL (**Figura 13**).

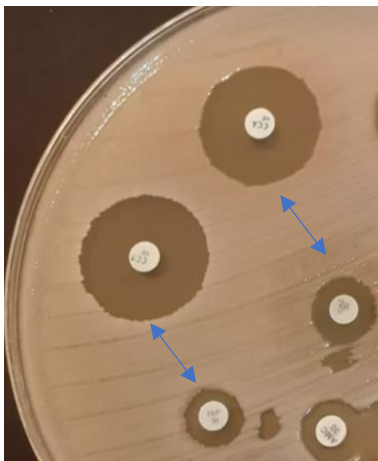


**Figura 13.** A Resistência aos antimicrobianos selecionados e surgimento de zona fantasma entre AMC e CTX, sendo indicativo de ESBL; B Resistência aos antimicrobianos selecionados e surgimento de zona fantasma entre AMC e CTX e deformação de halo entre AMC e CAZ e AMC e ATM (Acervo pessoal).

#### 4.8.2.7 Teste confirmatório para produção de ESBL

Os isolados que apresentaram alguma resistência no teste de triagem foram submetidos a avaliação confirmatória no qual foi realizado um antibiograma utilizando os discos dos

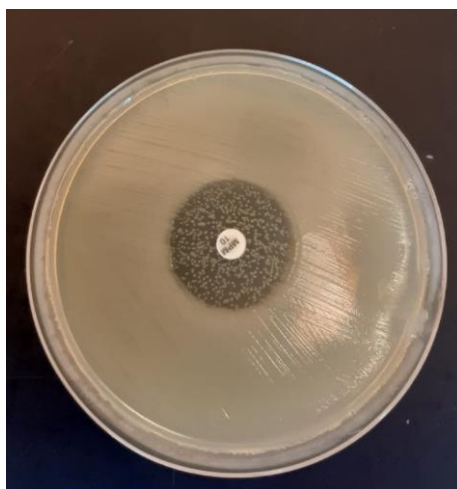
seguintes antimicrobianos: ceftazifima com clavulanato (CCA 30 $\mu$ g) e cefotaxima com clavulanato (CCT 30 $\mu$ g) avaliando uma diferença de 5mm com os discos sem clavulanato (BrCAST 2021; (CLSI VET 2020), conforme ilustrado abaixo (**Figura 14**). Os isolados que confirmaram a produção foram avaliados genotipicamente.



**Figura 14.** Diferença de 5mm entre halos dos discos CAZ e CTX com e sem inibidor (Acervo pessoal).

#### **4.8.2.7 Pesquisa de bactérias produtoras de carbapenemases em cepas da Ordem Enterobacterales e pertencentes ao complexo *Acb***

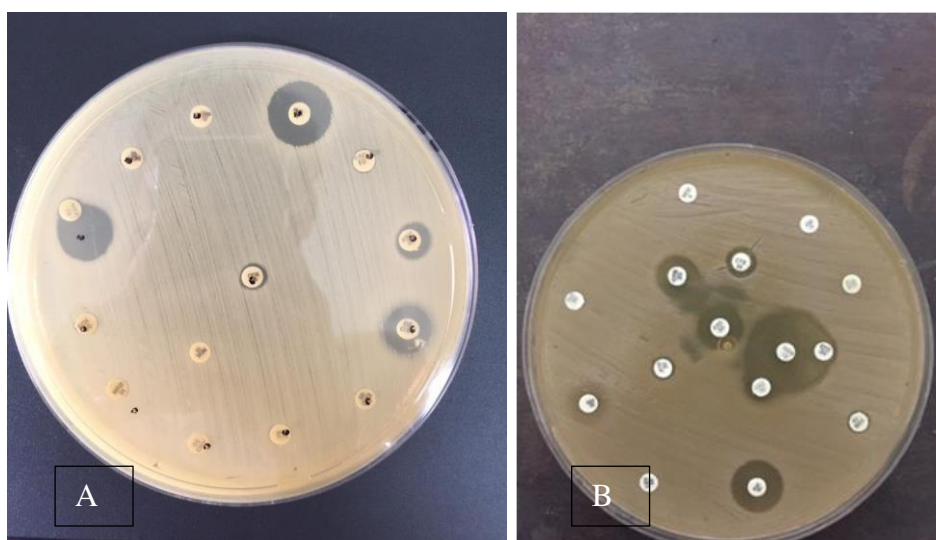
Foi realizado o antibiograma utilizando o antimicrobiano da classe dos carbapenêmicos meropenem (MPM 10 $\mu$ g) que possui alta especificidade (CLSI VET, 2020), como ilustra a **Figura 15**.



**Figura 15.** Disposição do disco de meropenem (Acervo pessoal).

#### 4.8.2.8 Pesquisa de cepas do complexo *Acb* multidroga-resistentes (MDR)

Foi realizado antibiograma de triagem com diferentes antimicrobianos bacterianos: ampicilina (AMP 30 µg), aztreonam (ATM 30 µg), ampicilina com sulbactam (ASB 20µg), amicacina (AMI), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP 5µg), cefepime (CPM), gentamicina (GEN 10µg), imipenem (IMP 10µg), levofloxacina (LEV), doxiciclina (DOX 30µg), tetraciclina (TET 30µg), azitromicina (AZI 15µg), sulfatomexazol com trimetoprim (SUT 25µg), juntamente com os antimicrobianos utilizados para avaliar a produção de ESBL e carbapenemases (**Figura 16**).



**Figura 16:** A Placa apresentando resistência a diferentes classes de antimicrobianos; B Placa apresentando resistência a diferentes classes e possível produtora de ESBL (presença de zona fantasma) (Acervo pessoal.).

#### 4.9 Análise genotípica da resistência aos antimicrobianos

As sequências dos *primers* e as condições de amplificação dos genes utilizados na pesquisa da resistência antimicrobiana estão dispostas no anexo 2.

##### 4.9.1 Pesquisa genotípica da resistência aos $\beta$ -lactâmicos em *Staphylococcus* spp.

Foi realizada a pesquisa dos genes *mecA* (MELO *et al.*, 2019) e *blaZ* (ROSATO *et al.*, 2003).

##### 4.9.2 Pesquisa de *Staphylococcus* spp e *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina

Para confirmação de resistência à vancomicina foi utilizado o *primer vanA* e *vanB* (CLARK *et al.*, 1993).

#### 4.9.3 Pesquisa dos genes codificadores de ESBL

Foi realizada a pesquisa dos genes *bla*<sub>TEM</sub> (MINARINI *et al.*, 2007), *bla*<sub>CTX-M</sub> (GESER *et al.*, 2012) e *bla*<sub>SHV</sub> (SHAHID *et al.*, 2010).

#### 4.9.4 Pesquisa dos genes codificadores de carbapenemases - (oxacilinas)

A pesquisa genotípica de carbapenemases do tipo oxacilinas (*bla*<sub>OXA</sub>) em cepas do complexo *Acb* foi realizada por meio da detecção dos genes de carbapenemase em multiplex: *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub> (HIGGINS *et al.*, 2010; WOODFORD *et al.*, 2006) e *bla*<sub>OXA-24</sub> e *bla*<sub>OXA-58</sub> (HIGGINS *et al.*, 2010).

#### 4.9.5 Pesquisa dos genes codificadores de carbapenemases

A pesquisa genotípica de carbapenemases do tipo metallo-β-lactamase foi realizada por meio da detecção dos seguintes genes de carbapenemase em multiplex: *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>VIM</sub> (FALLAH *et al.*, 2014) e *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>oxa-48</sub> (MONTEIRO *et al.*, 2012). Considerando que *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>NDM</sub> são metallo-β-lactamase, *bla*<sub>KPC</sub> é serina-β-lactamase e *bla*<sub>oxa-48</sub> é de carbapenemases do tipo oxacilinas.

#### 4.9.6 Pesquisa dos genes codificadores de resistência à polimixina E ou colistina

Para confirmação de resistência às colistinas foram utilizados os *primers* para a pesquisa dos seguintes genes plasmidiais em multiplex: *mcr*-1, 2, 3, 4, 5 (REBELO *et al.*, 2018) e *mcr*-6, 7, 8, 9 (BOROWIAK *et al.*, 2020).

#### 4.10 Fatores de virulência em *Escherichia coli* aviária patogênica

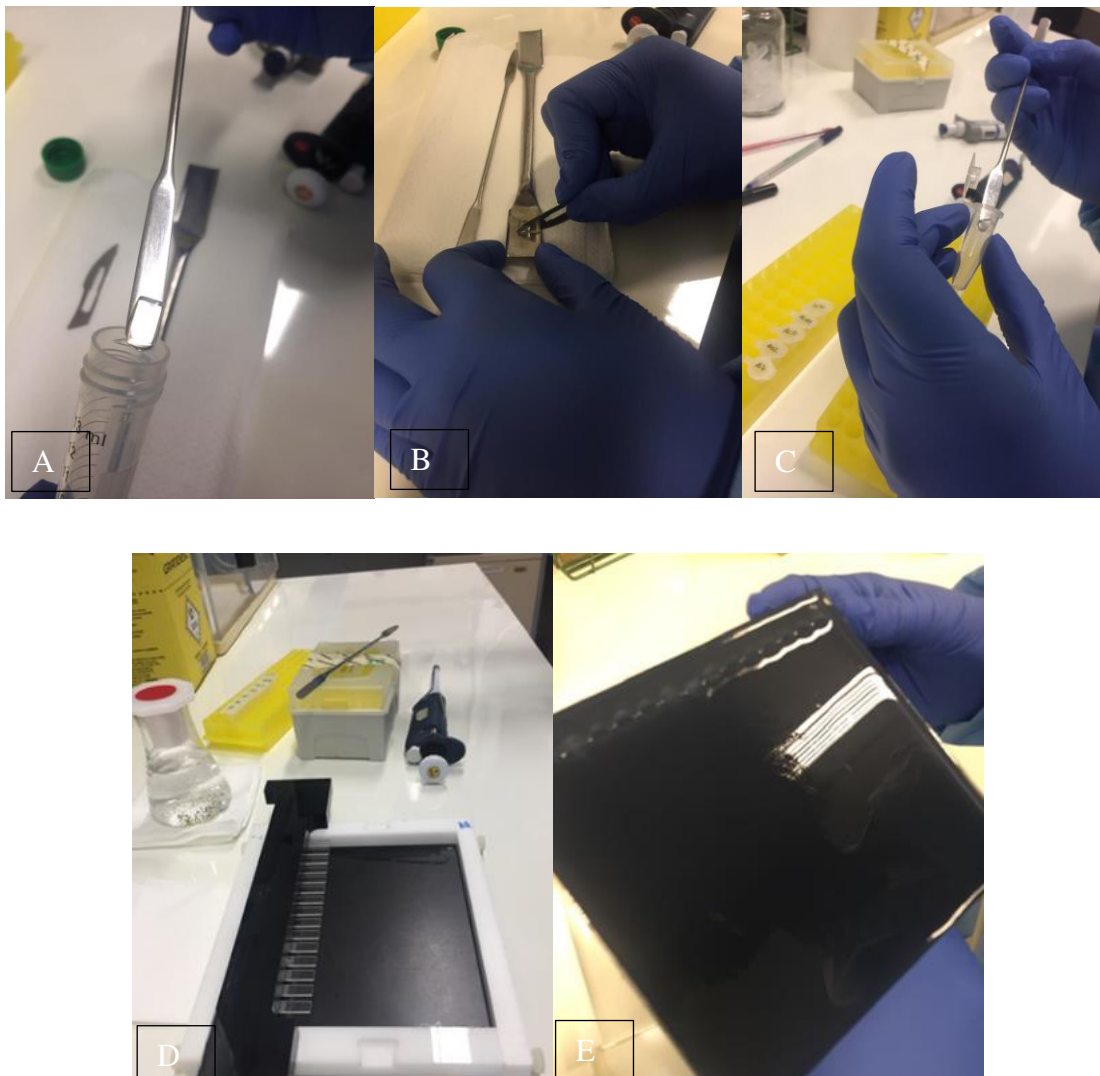
As sequências dos *primers* e as condições de amplificação dos genes utilizados na pesquisa dos fatores de virulência estão dispostas no anexo 3.

Foi utilizada a técnica de PCR multiplex para identificação presuntiva das cepas APECs (*E. coli* aviária patogênica) buscando os genes: receptor de siderofilo (*iroN*) (JOHNSON *et al.*, 2008), codificador de proteína de membrana externa epissomal (*ompT*) (JOHNSON *et al.*, 2008), codificador de hemolisina putativa de *E. coli* aviária (*hlyF*) (JOHNSON *et al.*, 2008), codificador de proteínas de resistência do sistema complemento (*iss*) (JOHNSON *et al.*, 2008), receptor de siderofilo aerobactina (*iutA*) (JOHNSON *et al.*, 2008).

#### 4.11 Tipificação das espécies pertencentes ao complexo *Acb* pela técnica de Pulsed-field Gel electrophoresis (PFGE)

O protocolo utilizado para a tipificação das amostras foi o utilizado por Ribot e colaboradores (2006) com alterações. A técnica foi desenvolvida na Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. As cepas foram isoladas em placas de ágar nutriente e incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas. Com o auxílio de um swab, as colônias dos isolados e controles foram coletadas e ressuspensas em 1 mL de BSC (caldo tampão para suspensão celular) (1M Tris pH 8,0; 0,5M EDTA e água ultrapura) ajustados em turvação 3 ( $9 \times 10^8$  UFC) na escala de Mac Farland. Em seguida, 200µl da suspensão de células ajustadas foi transferida para um no eppendorf contendo 5µl de Proteínase K e 200µL de agarose a 1%. Após homogeneização, a mesma foi depositada nos moldes de plugs. Para cada isolado, foram preparados dois plugs. Para preparar a agarose 1% foi acrescido de 1% de SDS. Após a solidificação, os plugs dos isolados de *Acinetobacter* spp. foram depositados em tubos Falcon contendo 2ml de tampão de Lise (1M Tris HCl pH 8,0; 0,5M EDTA; sarcosil 10% e água ultrapura) e incubados a 37 °C por 4 horas. Para a lavagem dos plugs dos isolados *Acinetobacter* spp. foram realizadas três lavagens utilizando em cada uma 6 ml de água ultrapura autoclavada a 50°C, num intervalo de 15 minutos entre cada. Após as lavagens, os plugs foram lavados com 10 mL de TE por 10 minutos e foram refrigerados a 4 °C. Para a digestão enzimática, uma porção de aproximadamente 2 mm de cada plug foi cortada com o auxílio de bisturi estéril e placa de Petri. Cada porção foi depositada posteriormente em microtubo contendo 50 µl da mistura para a digestão enzimática (*Acinetobacter* spp.: 5µl de enzima Anza 32 Apal, 5µl de tampão enzima e 45µl de água MiliQ). Os isolados de *Acinetobacter* spp. e o controle foram incubados a 37 °C por 3 horas. Após o período de digestão, os plugs foram lavados com TE e armazenados para a eletroforese em gel de campo pulsado. Para a eletroforese em gel de Campo pulsado os plugs foram acomodados na superfície dos dentes do pente e deixados alguns minutos à temperatura ambiente para secar. Foi preparado o tampão de corrida 0,4X TE (100mL de TBE 10X, 2,5L de água miliq), e esta concentração do tampão foi utilizada para o preparo do gel, 1,1% SeaKem®Gold agarose. Após a mistura do gel ter chegado a temperatura de 55° a 60°C, o mesmo foi depositado lentamente na cama contendo o pente com plugs aderidos aos dentes. Desta forma, o gel solidifica com os plugs já inseridos nos poços. Em seguida é realizada a eletroforese em gel de campo pulsado, seguindo os parâmetros para CHEF DR-II, DR-III, e CHEF Mapper (Volts = 200 (6v/cm; Temp. 14 °C, transferência inicial = 0,5 segundos; Transferência final 15 segundos; tempo de corrida 19 horas). Após a corrida, o gel foi corado

com solução de Brometo de etídio por 20 minutos e uma fotografia do mesmo foi tirada, esta foi avaliada pelo programa Bionumerics para a análise dos perfis obtidos (**Figura 17**).



**Figura 17.** A Preparo do plug; B Corte de plug; C Colocação do plug em digestão enzimática; D Plug nos dentes do pente; E Gel pronto com plug. Procedimento realizado no LAPIH- FIOCRUZ (Acervo pessoal).

#### **4.12 Análise estatística das técnicas avaliadas para a caracterização das espécies pertencentes ao complexo *Acb***

O teste Kappa de Fleiss foi utilizado para avaliar a confiabilidade dos métodos escolhidos para identificação das espécies do complexo *Acb*, através do uso do software RStudio®, pelo comando de `kappam.fleiss`. Também foram avaliados o intervalo de confiança e a concordância entre os métodos utilizando o mesmo software.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação de cepas oriundas de animais selvagens

Das 24 maritacas estudadas, foram avaliadas 48 amostras de coana e cloaca, totalizando 130 cepas. Destas, 63,84% (83/130) foram obtidas de coana e 36,16% (47/130) foram obtidas de cloaca. Todas as cepas passaram pela identificação fenotípica e proteômica.

Das 63,84% amostras oriundas de coana identificadas fenotipicamente por análises presuntivas e bioquímicas, 27,71% (23/83) foram *Staphylococcus* coagulase-negativa; 20,48% (17/83) foram *Escherichia coli*; 10,84% (9/83) foram *Serratia marcenscens*; 8,43% (7/83) foram *Klebsiella pneumoniae*; 4,82% (4/83) foram *Citrobacter diversus* e *Klebsiella aerogenes*, 3,61% (3/83) foram *Shigella* spp.; 2,41% (2/83) *Salmonella* spp., *Serratia rubidea*, bastonetes Gram negativos não fermentadores, *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp., e 1,20% (1/83) foram *Morganella morgani*, *Enterobacter* spp. e *Yersinia pestis*. Entretanto, 3,61% (3/83) dos isolados não puderam ser identificados pela análise fenotípica.

A identificação proteômica identificou e confirmou 26,50% (22/83) como *Staphylococcus* coagulase-negativa (10 *Staphylococcus sciuri*, 3 *Staphylococcus kloseei*, 3 *Staphylococcus pasteurii*, 3 *Staphylococcus xylosum*, 2 *Staphylococcus warneri* e 1 *Staphylococcus haemolyticus*), 4,35% (1/23) como *Staphylococcus pseudintermedius*, 21,68% (18/83) *Escherichia coli*, 10,84% (9/83) *Enterobacter cloacae*, 8,43% (7/83) *Klebsiella variicola*, 6,02% (5/83) *Serratia marcenscens*, 3,61% (3/83) *Enterococcus fecalis*, 2,4% (2/83) *Citrobacter freundii* e *Enterobacter asburiae*, e 1,2% (1/83) *Ochrobactrum intermedium*, *Pantoea dispersa*, *Pseudomonas otitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Kluyvera cryocescens*, *Kluyvera ascorbatai*, *Comamonas aquática*, *Lecercia adecarboxylata*, *Aeromonas hydrophyla*, *Klebsiella oxytoca*, *Aeromonas* spp., *Kocuria kristinae*, *Acinetobacter soli* e *Enterococcus cecorum*, como mostra a **Tabela 7**.

Das 36,16% amostras oriundas de cloaca identificadas fenotipicamente por análises presuntivas e bioquímicas 55,32% (26/47) foram *Escherichia coli*, 10,64% (5/47) foram *Salmonella* spp., 6,38% (3/47) foram *Edwardsiella* spp., *Shigella* spp. e bastonetes Gram-negativos não fermentadores, e 2,13% (1/47) foram *Citrobacter koserii* e *Citrobacter diversus*. Entretanto, 10,63% (5/47) não puderam ser identificados fenotipicamente.

A identificação proteômica identificou e confirmou 72,34% (34/47) *Escherichia coli*, 10,63% (5/47) *Enterococcus hirae*, 4,25% (2/47) *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas*



*aeruginosa*, e 2,12% (1/47) *Edwardisiella tarda*, *Citrobacter freundii*, *Ochrobactrum intermedium* e *Pantoea dispersa*, como mostra a **Tabela 7**.

As maritacas são animais de comportamento gregários e formam grupos de aproximadamente 10 indivíduos (PIZO, 2002) e a interação intraespecífica é bastante importante na formação do bando e determinação hierárquica (SEIBERT, 2006), o que favorece a troca de patógenos entre grupos.

De Sant'ana e colaboradores (2012) avaliaram as bactérias presentes em aves silvestres, estas aves foram divididas em três grupos: a Ordem Psittaciformes (araras, papagaios, maritacas e periquitos), a Ordem Piciformes e a Ordem Passeriformes (pássaros-pretos, sabiás e canários-da-terra, dentre outros). O maior índice de microrganismos encontrados foi no grupo dos Psittaciformes, com destaque para as araras e com predominância de *E. coli*. No grupo das maritacas a ocorrência dos agentes microbianos foi baixa, com exceção da *E. coli* (90%; 9/10 maritacas). Os Passeriformes apresentaram percentagens baixas de bactérias e os Piciformes possuíram quantidades intermediárias de bactérias em relação aos outros grupos, apresentando maior quantidade de *Escherichia coli*. Cepa de *Salmonella* spp. foram detectada apenas nas araras (Psittaciformes).

No atual trabalho, apenas a maritaca foi avaliada e demonstrou ter uma microbiota mais diversa em espécies bacterianas, uma vez que na coana foram identificadas 22 espécies distintas e na cloaca foram 8 espécies distintas, considerando a identificação pela técnica MALDI-TOF.

Além disso, esses dados corroboram para a necessidade de mais estudos em diferentes aves selvagens, principalmente da mesma Ordem e que ocupem o mesmo habitat natural das maritacas, para a obtenção de dados comparativos e uma melhor caracterização das espécies que compõe a microbiota destas aves.

A partir da amostra de cloaca de jabuti, foram obtidas 4 cepas, sendo 3 cepas da Ordem Enterobacterales (75%), distribuídas em 66,67% (2/3) cepas distintas de *Proteus mirabilis* e 33,33% (1/3) de *Proteus vulgaris*. A outra cepa foi identificada como *Pseudomonas aeruginosa*. Todas as identificações foram confirmadas pela técnica de MALDI-TOF (**Tabela 7**). Dickinson e colaboradores (2001), ao analisar amostras de cloaca de jabuti, também encontraram estas espécies dentro de uma ampla diversidade, como *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Campylobacter* spp., *Citrobacter amolonaticus*, *Citrobacter* spp., *Corynebacterium* spp., *Diphtheroids*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* spp., *Pasteurella testudinis*, *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.. Golawska e colaboradores (2019) consideraram os jabutis um grande

desafio quanto a composição e estrutura de sua microbiota bacteriana. Galosi e colaboradores (2021) identificaram trinta e quatro espécies bacterianas diferentes, entre elas, *Bacillus cereus*, *Mycoplasma* spp., *Salmonella enterica* subsp. *salamae* sorovar 6,7:a:z42 foram comumente detectados em suabes de cloaca e cavidade oral.

Weitzman e colaboradores (2018) avaliaram a identificação por sequenciamento genético de diferentes Ordens, tais como: Xanthomonadales, Caulobacterales, Sphingomonadales, Sphingobacterales, Saprospirales, Rodhobacterales, Deinococcales, Lactobacillales, Clostridiales, Pseudomonales, Neisseriales, Flavobacterales, Rhizobiales, Bacillales, Actinomycetales, Pasteurellales, Burkholderiales e Enterobacterales. O uso de métodos fenotípicos e moleculares ampliou o espectro e a acurácia da identificação bacteriana em amostras provenientes de animais selvagens, permitindo um aprofundamento na análise da importância desses animais como reservatórios.

Considerando as amostras provenientes de cachorro-do-mato, foram isolados um total de 18 cepas, sendo 27,78% (5/18) oriundas da cavidade nasal, 50% (9/18) do conduto auditivo e 22,22% (4/18) do reto. Entre as cepas isoladas da cavidade nasal, 60% (3/5) foram identificadas como *Staphylococcus* coagulase-negativa, 20% (1/5) como *Escherichia coli* e 20% (1/5) *Enterococcus* spp.. Quanto ao conduto auditivo, 44,44% (4/9) foram identificadas como *Staphylococcus* coagulase-negativa, 11,11% (1/9) como bastonete Gram-negativo não fermentador e como *Enterococcus* sp., sendo que 33,33% (3/9) não puderam ser identificados. A partir do reto, foram identificados 25% (1/4) como cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, sendo que 50% (2/4) não foram identificados fenotipicamente (**Tabela 7**).

Através da identificação proteômica foi possível confirmar 72,22% (13/18) do total das cepas identificadas fenotipicamente. As cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa (3/5) foram identificadas como *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus kloosii* e *Staphylococcus xylosus*, também foi confirmada as cepas de *Escherichia coli* (1/5) e *Enterococcus faecium* (1/5). Do conduto auditivo foram identificadas as 3 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa, como 2 *Staphylococcus sciuri* e 1 *Staphylococcus kloosii*, porém o score da identificação por MALDI-TOF foi abaixo de 2,3, podendo confiar apenas no gênero, as demais 5 amostras analisadas não puderam ser identificadas em nível de gênero ou espécie. Por fim, as cepas oriundas do reto foram identificadas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecium*.

Gomes e colaboradores (2011) avaliaram fezes de cachorro-do-mato mantido em cativeiro e encontraram *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp.

e *Salmonella* spp. Já Lima e colaboradores (2012) a partir de amostras oculares e retais identificaram *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. Em todos os estudos existem algumas espécies bacterianas semelhantes e outras não, estas diferenças podem ser justificadas por fatores, como alimentação, ambiente, manejo, contato com outros animais, estresse. Porém, são poucos os dados desta espécie animal encontrados na literatura, mostrando a importância de realizar estudos complementares para avaliarmos os riscos inerentes a transmissão de patógenos resistentes, uma vez que estes animais aceitam a presença dos humanos.

A partir da análise dos isolados oriundos dos mãos-peladas, foram avaliados fenotipicamente com testes presuntivos e bioquímicos um total de 17 cepas, sendo 58,82% (10/17) cepas provenientes da cavidade nasal, 70% (7/10) foi identificado como *Staphylococcus* coagulase negativa, 20% (2/10) como *Escherichia coli* e 10% (1/10) como *Enterococcus faecium*. 17,65% (3/17) cepas oriundas do conduto auditivo, 33,33% (1/3) foram identificadas como bastonetes Gram-negativos não fermentadores (BGNNF), SCN e *Enterococcus* spp.. Das cepas oriundas do reto, 23,53% (4/17) foram identificadas, sendo 50% (2/4) *Escherichia coli*, 25% (1/4) *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus* spp..

Dos 17 isolados identificados fenotipicamente, foi possível realizar a identificação proteômica de todas as cepas. Dentre estas, 60% (6/10) das cepas foram identificadas como *Staphylococcus* coagulase negativa, sem confirmar as espécies, 20% (2/10) como *Escherichia coli*, 10% (1/10) como *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium* oriundos de cavidade nasal. Das amostras do conduto auditivo o resultado do teste fenotípico foi confirmado como 33,33% (1/3) *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Enterococcus faecium*. Das amostras de reto, 50% (2/4) confirmaram-se como *Escherichia coli*, 25% (1/4) como *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecium*. Como descrito na **Tabela 7** e no **Figura 18**.

**Tabela 7.** Identificação proteômica e frequência das cepas identificadas nas maritacas, jabuti, cachorro-do-mato e mão-pelada.

<b>Amostra</b>	<b>Sítio</b>	<b>Espécies</b>	<b>n</b>
Maritaca	Coana	SCN	23
Maritaca	Coana	<i>Escherichia coli</i>	18
Maritaca	Coana	<i>Enterobacter cloacae</i>	9
Maritaca	Coana	<i>Klebsiella variicola</i>	7
Maritaca	Coana	<i>Serratia marcescens</i>	5
Maritaca	Coana	<i>Enterococcus faecalis</i>	3
Maritaca	Coana	<i>Enterobacter asburiae</i>	2

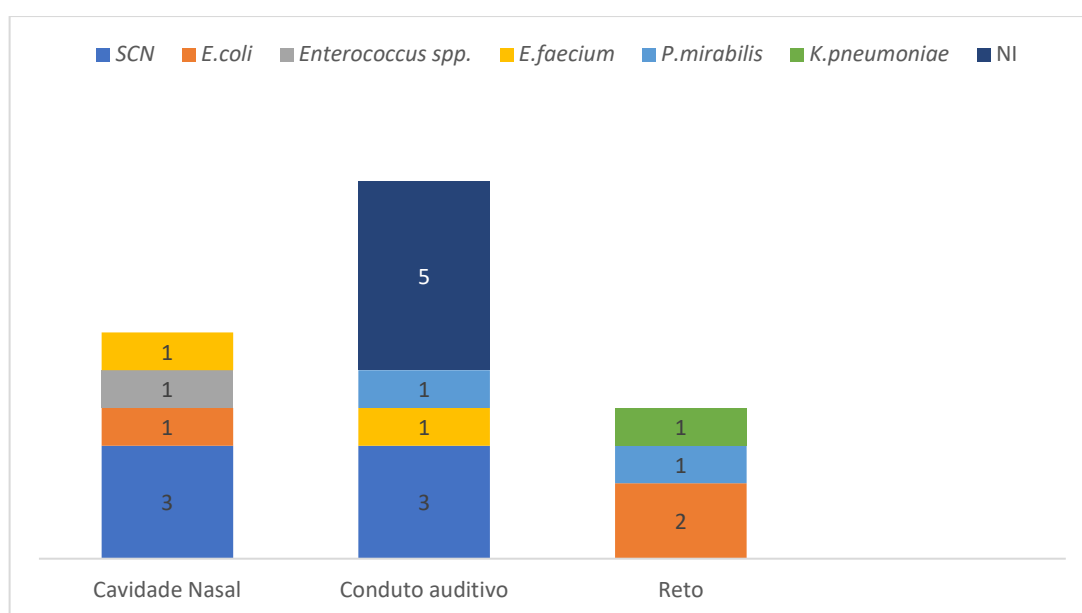
**Tabela 7.** Continuação

Maritaca	Coana	<i>Citrobacter freundii</i>	2
Maritaca	Coana	<i>Ochrobacthrum intermedium</i>	1
Maritaca	Coana	<i>Pantoea dispersa</i>	1
Maritaca	Coana	<i>Pseudomonas otitidis</i>	1
Maritaca	Coana	<i>Pseudomona aeruginosas</i>	1
Maritaca	Coana	<i>Klyvera cryocrienscens</i>	1
Maritaca	Coana	<i>Klyvera ascorbatai</i>	1
Maritaca	Coana	<i>Comamonas aquatical</i>	1
Maritaca	Coana	<i>Lecercia adecarboxylata</i>	1
Maritaca	Coana	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	1
Maritaca	Coana	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
Maritaca	Coana	<i>Aeromonas spp.</i>	1
Maritaca	Coana	<i>Kocuria kristinae</i>	1
Maritaca	Coana	<i>Acinetobacter soli</i>	1
Maritaca	Coana	<i>Enterococcus cecorum</i>	1
Maritaca	Cloaca	<i>Escherichia coli</i>	34
Maritaca	Cloaca	<i>Enterococcus hirae</i>	5
Maritaca	Cloaca	<i>Enterobacter cloacae</i>	2
Maritaca	Cloaca	<i>Pseudomona aeruginosas</i>	2
Maritaca	Cloaca	<i>Edwaedisiella tarda</i>	1
Maritaca	Cloaca	<i>Citrobacter freundii</i>	1
Maritaca	Cloaca	<i>Ochrobacthrum intermedium</i>	1
Maritaca	Cloaca	<i>Pantoea dispersa</i>	1
Jabuti	Cloaca	<i>Proteus mirabilis</i>	2
Jabuti	Cloaca	<i>Proteus vulgaris</i>	1
Jabuti	Cloaca	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Cachorro do mato	Nasal	SCN	3
Cachorro do mato	Nasal	<i>Escherichia coli</i>	1
Cachorro do mato	Nasal	<i>Enterococcus spp.</i>	1
Cachorro do mato	Auditivo	SCN	3
Cachorro do mato	Auditivo	<i>Enterococcus faecium</i>	1
Cachorro do mato	Auditivo	NI	5
Cachorro do mato	Reto	<i>Escherichia coli</i>	2
Cachorro do mato	Reto	<i>Klebsiella aerogenes</i>	1
Cachorro do mato	Reto	<i>Proteus mirabilis</i>	1
Mão-pelada	Nasal	SCN	6
Mão-pelada	Nasal	<i>Escherichia coli</i>	2

**Tabela 7.** Continuação

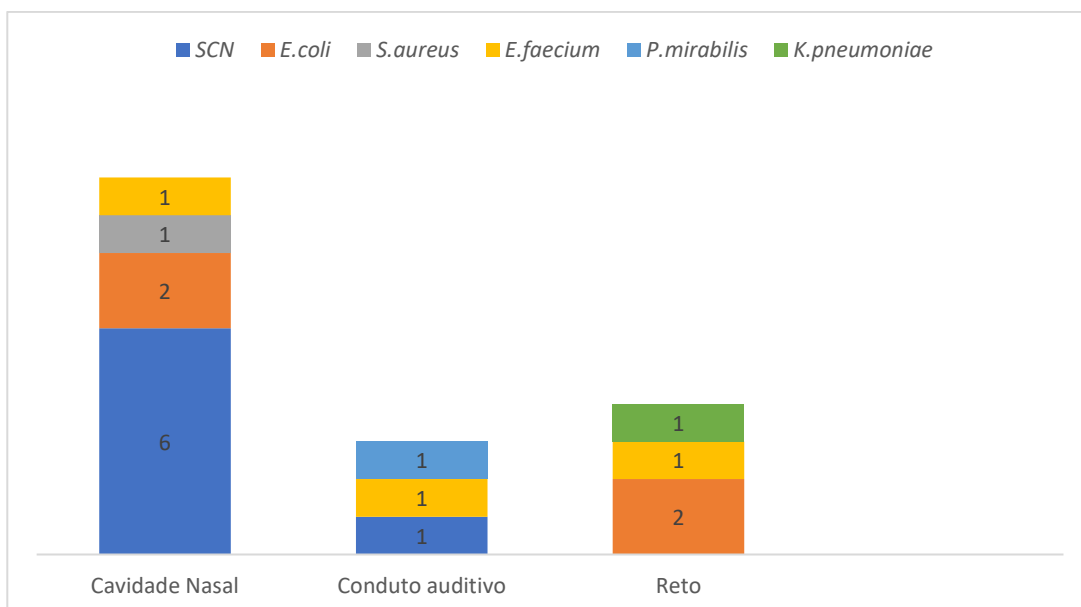
Mão-pelada	Nasal	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
Mão-pelada	Nasal	<i>Enterococcus faecium</i>	1
Mão-pelada	Auditivo	<i>Proteus mirabilis</i>	1
Mão-pelada	Auditivo	SCN	1
Mão-pelada	Auditivo	<i>Enterococcus faecium</i>	1
Mão-pelada	Reto	<i>Escherichia coli</i>	2
Mão-pelada	Reto	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
Mão-pelada	Reto	<i>Enterococcus faecium</i>	1

\*SCN: *Staphylococcus coagulase-negativa*.



**Figura 18.** Cepas oriundas de cachorro do mato confirmados pela identificação proteômica de acordo com o respectivo sítio de coleta.

Spinelli e colaboradores (2010) não encontraram bactérias da Ordem Enterobacterales, mas identificaram *Staphylococcus* spp, *Corynebacterium* spp, *Shigella* spp e *Bacillus* spp., porém estes dados foram analisados de conjuntiva de mão-pelada sadios, assim como no presente trabalho. Em outro estudo onde animais selvagens foram avaliados, 10 *Nasua nasua* (quati), 2 *Procyon cancrivorus* (mão-pelada) e outras 19 espécies de animais carnívoros, nas amostras avaliadas do mão-pelada foram identificadas 46 cepas diferentes, sendo 65,22% (30/46) *Staphylococcus* spp. e 39,78% (16/46) *Bacillus* spp. (LIMA *et al.*, 2012), corroborando com os achados do presente trabalho.



**Figura 19.** Cepas oriundas de Mão-pelada confirmados pela identificação proteômica de acordo com o respectivo sítio de coleta.

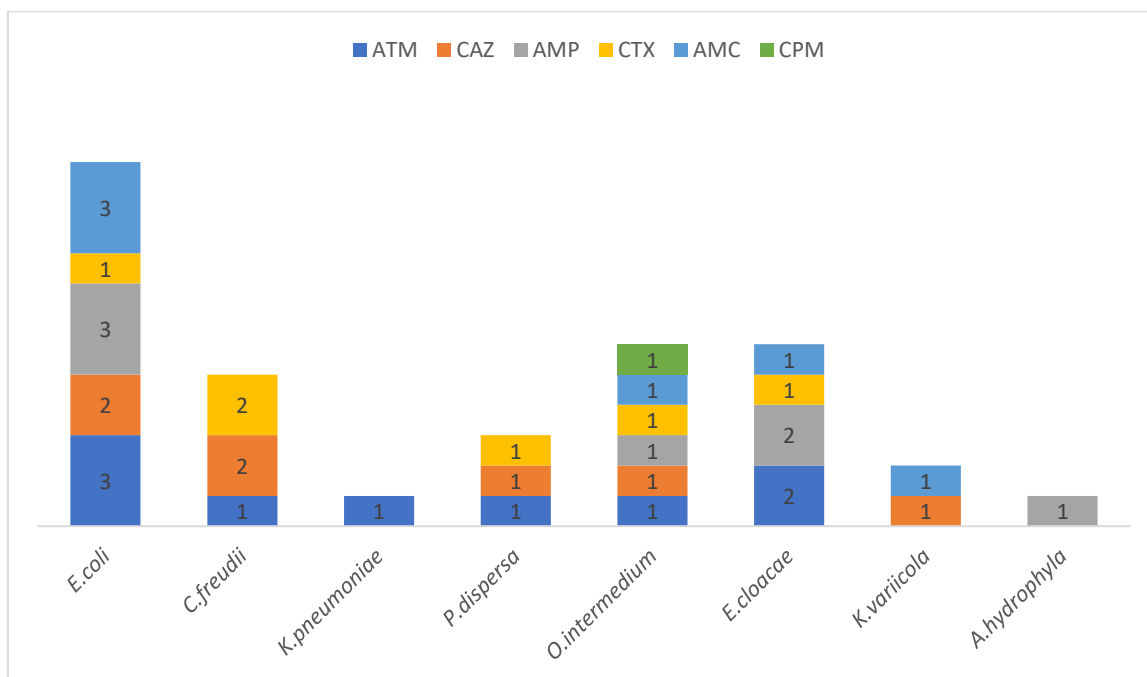
Grande número de espécies selvagens depende da fauna para dispersão de suas sementes e manutenção da cadeia alimentar, as aves e animais onívoros têm enorme importância neste papel. Desta forma o desenvolvimento de estudos de caracterização de cepas da microbiota destes animais permitirá identificar os impactos da presença e da dispersão destes agentes numa ótica de Saúde Única.

## 5.2 Perfil de resistência de cepas oriundas de animais selvagens

Das 83 cepas bacterianas caracterizadas com bastonetes Gram-negativos isoladas a partir das amostras de maritacas, 20,48% (17/83) apresentaram fenótipo de produção de ESBL e 4,81% (4/83) apresentaram fenótipo de produção de carbapenemase pelo método de disco-difusão indicado pelo BrCAST (2021), utilizando os antimicrobianos indicados. Destas 17 cepas, 76,47% (13/17) apresentaram fenótipo de produção exclusivamente de ESBL e 23,53% (4/17) apresentaram fenótipo tanto para ESBL quanto para carbapenemase, simultaneamente.

Da prevalência de ESBL seguindo a resistência aos antimicrobianos, 52,94% (9/17) foram resistentes ao aztreonam (3 *Escherichia coli*, 2 *Enterobacter cloacae*, 1 *Citrobacter freundii*, 1 *Acinetobacter soli*, 1 *Pantoea dispersa* e 1 *Ochrobactrum intermedium*); 41,17% (7/17) foram resistentes à ceftazidima (2 *Escherichia coli*, 2 *Citrobacter freundii*, 1 *Klebsiella variicola*, 1 *Pantoea dispersa* e 1 *Ochrobactrum intermedium*) e à ampicilina (3 *Escherichia coli*, 2 *Enterobacter cloacae*, 1 *Aeromonas hydrophyla* e 1 *Ochrobactrum intermedium*);

35,29% (6/17) foram resistentes à cefotaxima (2 *Citrobacter freundii*, 1 *Escherichia coli*, 1 *Enterobacter cloacae*, 1 *Pantoea dispersa* e 1 *Ochrobactrum intermedium*) e à amoxicilina+ácido clavulânico (3 *Escherichia coli*, 1 *Enterobacter cloacae*, 1 *Klebsiella variicola* e 1 *Ochrobactrum intermedium*) e 5,88% (1/17) à cefepima (1 *Ochrobactrum intermedium*), como demonstrado no **Figura 20**.



**Figura 20.** Caracterização da resistência fenotípica com os antimicrobianos aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), ampicilina (AMP), cefotaxima (CTX), amoxicilina+ácido clavulânico (AMC) e cefepima (CPM) para avaliar produção de ESBL pelas cepas de maritaca.

As cepas resistentes aos carbapenêmicos e produtoras de ESBL simultaneamente foram 1 *Pantoea dispersa*, 1 *Escherichia coli*, 1 *Citrobacter freundii* e 1 *Enterobacter cloacae*. 2 *Pseudomonas aeruginosa*, 2 *Escherichia coli* e 1 *Ochrobactrum intermedium* foram caracterizadas como sensíveis aumentando a exposição ao Meropenem.

Apesar do perfil de resistência fenotípica ter sido identificado e caracterizado, nenhum gene pesquisado para identificação e confirmação de ESBL e produção de carbapenemase foi detectado. Entretanto, essas cepas podem possuir outros genes que não os avaliados neste estudo.

O gene *mcr-9* de resistência à colistina foi detectado em um isolado de *Pantoea dispersa*. Considerando que todas as aves estavam clinicamente saudáveis e foram submetidas

a monitoramento para posterior soltura em ambiente de Mata Atlântica (CEPEA, 2021), tal achado se reveste de importância, visto os hábitos gregários dessas aves, que estão cada vez mais presentes em espaços urbanos como quintais e parques arborizados, com grande possibilidade de dispersão destes genes em espaços frequentados por crianças e adultos. Uma vez que a colistina é utilizada como última opção terapêutica na clínica humana e veterinária, a dispersão de genes que conferem resistência a esse antimicrobiano tem significativo impacto em Saúde Única (DA SILVA *et al.*, 2018).

A avaliação da concentração inibitória mínima de colistina pela técnica da microdiluição em caldo foi realizada e não foi detectada resistência fenotípica apesar da presença do gene *mcr-9*. A existência de DNA conservado no promotor *mcr-9* aponta para a hipótese de que seja uma sequência de reconhecimento para um regulador de transcrição, sugerindo que fatores adicionais ou condições de indução/desrepressão podem ser necessários para a expressão completa de *mcr-9* de tipo selvagem (CARROL *et al.*, 2019).

A cepa de *Pantoea dispersa* identificada nesse estudo apresentou resistência fenotípica por produção de ESBL e carbapenemase simultaneamente, e ainda o gene *mcr-9*, de algum modo envolvido na resistência à colistina. Estes achados a partir de uma amostra de origem animal somam-se aos relatos desta espécie bacteriana como sendo de importância em agricultura (GHOSH *et al.*, 2021; JIANG *et al.*, 2019; SELVAKUMAR *et al.*, 2008) e em saúde humana (ASAI *et al.*, 2019.; PANDITRAO & PANDITRAO, 2018), inclusive apontando resistência antimicrobiana nesses estudos, mostrando a importância deste tipo de estudo numa abordagem multifatorial voltada ao conceito de Saúde Única..

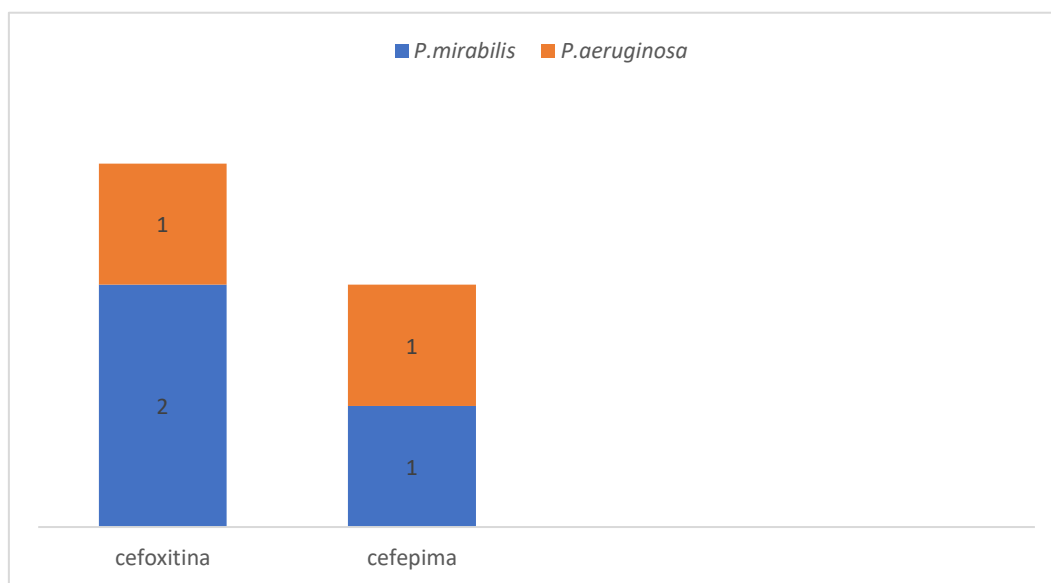
Das 23 cepas identificados como *Staphylococcus coagulase negativa*, 21,74% (5/23) foram resistentes à oxacilina e 8,70% (2/23) foram resistentes à penicilina e à cefoxitina. Entretanto, não foram detectados os genes de resistência *blaZ* e *mecA* em nenhum das cepas (**Tabela 8**). Pelos manuais padronizados de detecção de resistência, como CLSI não há pontos de corte para as diferentes cepas de SCN, isto poderia gerar dúvidas de avaliação. Outros estudos mostram a dificuldade de correlação entre esses testes fenotípicos e a detecção de genes de resistência (ARGUDÍN *et al.*, 2018). Também foram pesquisados os genes *vanA* e *vanB*, porém não foram detectados em nenhuma cepa, podendo significar que outros genes que não os pesquisados, como *vanC*, -D, -E, -G, -L, -M e N (AHMED & BAPTISTE, 2018), neste caso, não foram realizados testes fenotípicos de resistência a vancomicina.



**Tabela 8.** Perfil de resistência fenotípica das cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo em maritacas.

Amostra	Sítio	SCN	n	Resistência fenotípica
Maritaca	Coana	<i>S. sciuri</i>	5	OXA
Maritaca	Coana	<i>S. xylosus</i>	2	PEN e CFO

Das 4 cepas isoladas a partir de amostras de jabuti, 75% (3/4) foram resistentes à cefotaxima (2 *Proteus mirabilis* e 1 *Pseudomonas aeruginosa*) e 50% (2/4) à cefepima (1 *Proteus mirabilis* e 1 *Pseudomonas aeruginosa*), resultado sugestivo de produção de ESBL, como descrito na **Figura 21**.



**Figura 21.** Caracterização da resistência fenotípica com os antimicrobianos de produção de ESBL pelo número de cepas de jabuti.

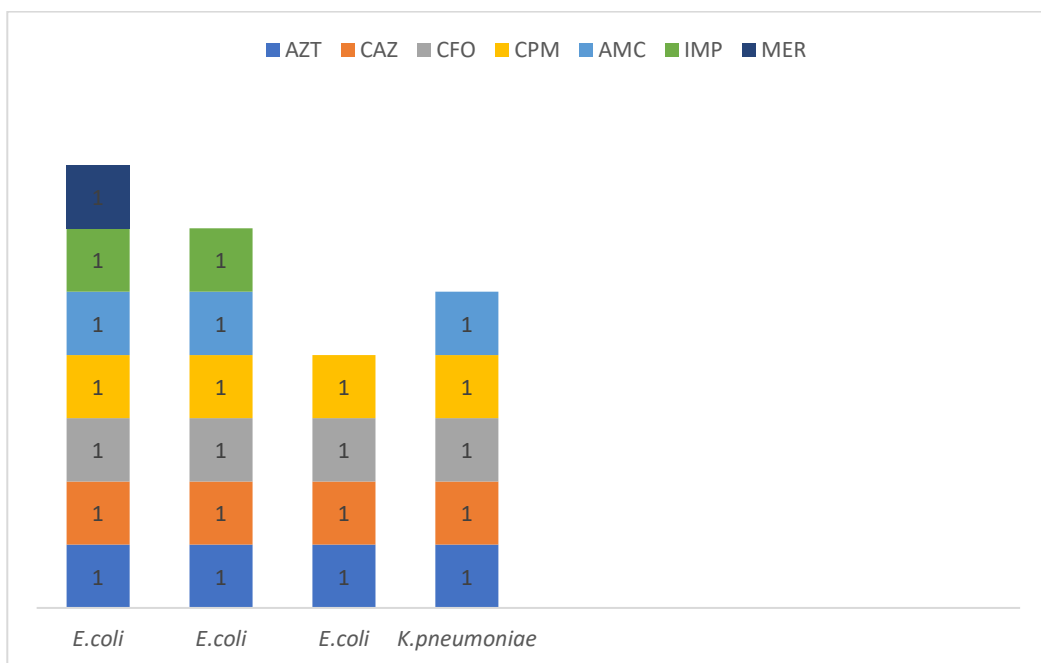
Entretanto, na análise genotípica, não foram detectados os genes buscados neste trabalho. Estes jabutis foram considerados aptos a reintegração ao ambiente natural, porém, podem apresentar outros genes de resistência não avaliados neste estudo.

Em relação às amostras de mão-pelada, não foi observada resistência fenotípica em nenhum método avaliado e nenhum gene foi detectado, porém, repetindo o que já foi exposto,

isto não significa que não existem genes de resistência, apenas que poderia ter outros genes que não foram avaliados.

Nas amostras oriundas dos cachorros-do-mato, foram observados perfis compatíveis com resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em todas as cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativos, ou seja, foram resistentes à cefoxitina e penicilina, entretanto não houve detecção dos genes *mecA* e *blaZ*. Não foram encontrados trabalhos na literatura encontrando estes genes nestas espécies animais.

Entre as cepas de enterobactérias identificadas, 100% (4/4) apresentaram resistência ao aztreonam, ceftazidima, cefoxitina e cefepime (3 *Escherichia coli* e 1 *Klebsiella pneumoniae*); 75% (3/4) à amoxicilina com ácido clavulânico (2 *Escherichia coli* e 1 *Klebsiella pneumoniae*) e à ampicilina (3 *Escherichia coli*) e 50% (2/4) ao imipinem (2 *Escherichia coli*). No teste confirmatório fenotípico para a produção de  $\beta$ -lactamases utilizando meropenem, observaram-se resultados positivos para a produção de carbapenemase em uma cepa de *Escherichia coli* oriunda da cavidade nasal e ESBL em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* obtida do reto. A pesquisa dos genes produtores destas enzimas detectou a presença dos genes *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>* somente na cepa de *Klebsiella pneumoniae*, como descrito na **Figura 22**.



**Figura 22.** Caracterização e frequência da resistência fenotípica de produção de ESBL pelas cepas de cachorro-do-mato.

Souza e colaboradores (2019) encontraram alta resistência a metronidazol 97% (65/67), ampicilina 94% (63/67), amoxicilina 93% (62/67), sulfonamidas 93% (62/67), colistina 93% (62/67) e nitrofurantoína 88% (59/67) em amostras de animais domésticos e silvestres, incluindo cachorro-do-mato. Aqueles que apresentaram menor taxa de resistência foram: meropenem 3% (2/67), imipenem 6% (4/67) e amicacina 16% (11/67).

Observa-se, então que a partir da caracterização de cepas bacterianas e genes de resistência em 4 diferentes espécies de animais selvagens monitorados pelo CETAS-RJ, 03 espécies (maritaca, jabuti e cachorro do mato) apresentaram bactérias com genes de resistência de importância em Saúde Única, sendo animais saudáveis e aptos a serem liberados para seu habitat natural. Podendo atuar como disseminador desses genes de resistência para o ambiente e outras espécies animais, além do homem. Há importância em se continuar pesquisando nesta área, uma vez que, são poucos os estudos alertando sobre o papel dos animais selvagens como fonte de disseminação e possível propagador de bactérias resistentes a antimicrobianos de uso em infecções graves.

### **5.3 Coleta e identificação de bactérias coletadas de avicultura**

No setor de Avicultura da UFRRJ, como em toda granja, a produção de frango de corte é cíclica. Neste, os frangos são obtidos como pintinhos de 1 dia, ficam cerca de 40 dias nos galpões e são vendidos. Sendo assim, foram realizadas 3 coletas de frango, a primeira realizada em adultos (fase final/venda), a segunda realizada em pintinhos de 1 dia e a terceira coleta após 30 dias destes mesmos pintos em idade de frangos. No mesmo momento da coleta de suabes de cloacas dos frangos e dos pintinhos, foram coletadas amostras randomizadas da cama de maravalha nas quais esses animais ficaram alojado, entretanto, também foi coletado no momento do enleiramento, a fim de observar se o processo de fermentação seria efetivo.

No total foram suabes de cloaca de 30 frangos e 25 pintinhos. Destas, após análises fenotípicas de identificação, como análise presuntiva e bioquímicas foram identificados 44 cepas Gram-negativas, 51 cepas identificadas como *Enterococcus* spp. e 25 cepas identificadas como *Staphylococcus* coagulase negativas.

Das cepas Gram-negativas identificadas, a análise proteômica confirmou 81,82% (36/44) de *Escherichia coli*, 9,09% (4/44) de *Enterobacter bugandensis* e de *Klebsiella pneumoniae*, 6,82% (3/44) de *Proteus mirabilis* e 2,27% (1/44) como *Pseudomona aeruginosa*.

Das cepas de *Enterococcus* spp. 47,06% (24/51) foram identificados como *Enterococcus gallinarum*, 31,37% (16/51) como *Enterococcus faecium*, 19,61% (10/51) como

*Enterococcus faecalis* e 1,96% (1/51) como *Enterococcus avium*. É importante destacar que na coleta de pintinhos de 1 dia só foram identificados isolados de *Enterococcus* spp. que são bactérias presentes no ceco de aves. Algumas amostras bacterianas de *Enterococcus* spp. não bateram com a identificação fenotípica, mostrando algumas diferenças nos testes iniciais, nenhum artigo na literatura observou esta diferença.

Das cepas de *Staphylococcus* coagulase negativas 48% (12/25) foram identificados como *Staphylococcus gallinarum*, 40% (10/25) como *Staphylococcus sciuri*, 8% (2/25) como *Staphylococcus cohnii* e 4% (1/25) como *Staphylococcus lentus*. Dentro desta análise por MALDI-TOF MS todos apresentaram *score* alto de confiança para gênero e espécie. Spinali e colaboradores (2015) enfatizaram a importância da interpretação dos dados para uma melhor identificação de espécies clinicamente relevantes, mesmo ao nível da estirpe, e descreveram diretrizes para tipagem microbiana (SPINALI *et al.*, 2015). Dentro do resultado que a Bruker (BioTyper®) disponibiliza, eles caracterizam como confiabilidade de gênero e espécie quando o parâmetro conhecido como *score* é maior do que 2,3. Pimenta e colaboradores (2021) também encontraram a maior prevalência de *Staphylococcus gallinarum* e outras espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa.

Segundo Albornoz e colaboradores (2014) apesar da grande variedade de espécies que constituem a comunidade da microbiota intestinal das aves é comumente observado no trato intestinal destes animais: *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp. e *Escherichia* spp., o que é confirmado com o atual trabalho. Sanz e colaboradores (2021) encontrou uma predominância de *Enterococcus* spp., seguido de *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Pantoea agglomerans*.

O grupo coliforme é composto pelos gêneros *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Hafnia* spp., *Klebsiella* spp. e *Escherichia* spp. pertencentes à família Enterobacteriaceae (CELI *et al.*, 2020), sendo o de maior abundância nas aves de produção. Yadav e colaboradores (2021) avaliaram microbiota de conteúdo cecal de animais tratados com diferentes dietas através de sequenciamento por Illumina onde identificaram *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. *Phascolarctobacterium* spp., *Slackia* spp., *Ruminococcus* spp., *Oscillospira* spp., *Atopobium* spp. e *Faecalibacterium* spp..

O ambiente intestinal das aves corresponde ao conjunto de microrganismos comensais do trato gastrointestinal, vivendo em harmonia com o seu hospedeiro, principalmente em animais saudáveis, mantendo a homeostasia do ambiente intestinal. Essa simbiose entre agente e hospedeiro tem relevância para a sanidade e bem-estar animal, afetando diretamente a

produção numa relação de ganho e perda (DE OLIVEIRA FEITOSA *et al.*, 2020), por serem capazes de regular absorção e o aproveitamento de nutrientes, favorecer a maturação e integridade intestinal e modular a imunidade (ALEXANDRINO *et al.*, 2020) sendo assim, identificar os isolados pertencentes à microbiota animal é essencial. Esses animais são destinados para a alimentação e se tiverem com disbiose microbiana, podem gerar grandes perdas, principalmente financeiras, com o descarte de animais e contaminação para o homem e o ambiente.

Diante disso, vários estudos têm utilizado as técnicas de sequenciamento para análise da microbiota intestinal das aves, no intuito de identificar os principais membros desse microbioma, estabelecer sua funcionalidade e monitorar a dinâmica da microbiota intestinal das aves (CHRISTOFOLI *et al.*, 2020), sendo assim, estudos futuros utilizando estas técnicas serão importante para melhor compreensão melhor da microbiota de aves.

#### **5.4 Resistência das cepas bacterianas oriundas da avicultura**

Das 25 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativas identificadas neste trabalho, todas foram testados para resistência fenotípica mediada pelo gene *mecA*, mas nenhum apresentou resistência à cefoxitina, porém 4% (1/25) apresentaram o gene *mecA*, isto se dá por uma não expressão fenotípica no momento do teste, por isso a importância do teste padrão ouro que é o PCR (CLSI, 2021). Nenhum isolado apresentou resistência fenotípica para penicilina ou genotípica para *blaZ*, não sendo considerados produtores de  $\beta$ -lactamases. Porém, de acordo com o BrCAST (2021) nenhum método existente atualmente pode detectar produção de penicilinas de modo confiável em SCN. Pimenta e colaboradores (2021) também não encontraram correlação fenotípica e genotípica nas cepas de SCN, demonstrando o grande desafio desses agentes.

Outra pesquisa realizada foi a de produção de  $\beta$ -lactamases em Gram-negativos, das 44 cepas Gram-negativas identificadas, 59,09% (26/44) apresentaram resistência antimicrobiana fenotípica pelo método de disco difusão para ESBL e 2,72% (1/44) para ESBL e produtora de carbapenemase simultaneamente.

Da prevalência de ESBL seguindo a resistência aos antimicrobiano, 57,69% (15/26) foram resistentes à ampicilina (15 *Escherichia coli* e 4 *Klebsiella pneumoniae*), 34,62% (9/26) foram à cefotaxima (3 *Escherichia coli*, 3 *Enterobacter bugandensis* e 3 *Klebsiella pneumoniae*), 26,92% (7/26) foram à ceftazidima (3 *Escherichia coli*, 2 *Enterobacter bugandensis* e 2 *Klebsiella pneumoniae*), 23,08% (6/26) foram à cefepime (3 *Enterobacter*

*bugandensis*, 2 *Klebsiella pneumoniae* e 1 *Escherichia coli*), 15,39 % (4/26) foram à aztreonam (2 *Escherichia coli* e 2 *Enterobacter bugandensis*) e à ampicilina com ácido clavulânico (2 *Enterobacter bugandensis*, 1 *Escherichia coli* e 1 *Pseudomonas aeruginosa*), 11,54% (3/26) foram à cefoxitina (2 *Enterobacter bugandensis* e 1 *Pseudomonas aeruginosa*). Uma cepa de *Enterobacter bugandensis* apresentou resistência fenotípica ao meropenem, sendo assim, selecionado com possibilidade de ser produtor de ESBL e de carbapenemase, simultaneamente, como descrito na **Tabela 9**.

**Tabela 9.** Identificação bacteriana, sítio de coleta, caracterização do perfil fenotípico de resistência e frequência de ESBL em cepas de avicultura.

Bactéria	Sítio de coleta	Resistencia fenotípica	N
<i>Escherichia coli</i>	Traqueia	AMP	3
<i>Escherichia coli</i>	Traqueia	AMP, ATM	1
<i>Escherichia coli</i>	Cloaca	AMP	7
<i>Escherichia coli</i>	Cloaca	AMP, CPM, CTX, CAZ, ATM	1
<i>Escherichia coli</i>	Cloaca	AMP, CPM, CTX, CAZ	1
<i>Escherichia coli</i>	Cloaca	AMP, CTX	1
<i>Escherichia coli</i>	Cloaca	AMP, CAZ, AMC	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cloaca	AMP	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cloaca	AMP, CPM, CTX, CAZ	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cloaca	AMP, CTX	1
<i>Enterobacter bugandensis</i>	Cloaca	AMP, CTX, CAZ, ATM	1
<i>Enterobacter bugandensis</i>	Cloaca	AMP, CPM, CTX, CAZ, CFO, AMC, MPM	1
<i>Enterobacter bugandensis</i>	Cloaca	AMP, CAZ, CTX	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cloaca	AMC, CTX	1

\* ampicilina (AMP 10µg), ceftazidima (CAZ 30µg), cefoxitina (CFO 30µg), cefotaxima (CTX 30µg), aztreonam (ATM 30µg), meropenem (MPM 10µg), cefepime (CPM 30µg), e amoxicilina + ácido clavulânico (AMC 30µg).

Através da pesquisa genotípica foi possível detectar a presença de 69,23% (18/26) genes nas cepas que apresentaram resistência fenotípica. Dos quais, 38,89% (7/18) apresentaram o gene *bla<sub>SHV</sub>*, 22,22% (4/18) apresentaram o gene *bla<sub>CTX</sub>*, 16,67% (3/18) apresentaram *bla<sub>TEM</sub>*, 11,11% (2/18) apresentaram os genes *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>CTX</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>* simultaneamente. É importante destacar que dentro destes, 18 isolados com genes de resistência a ESBL, 22,22% (4/18) eram oriundos de pintinhos de 1 dia, que não tinham tido contado com antimicrobianos.

Nenhum gene de produção de carbapenemase pesquisado foi detectado, o que não implica na possibilidade de que as cepas analisadas possuam outros genes que não os pesquisados, dada a ampla diversidade de genes relacionados a produção dessas enzimas.

Há no mercado, antimicrobianos para auxiliar na prevenção de doenças respiratórias e diarreias em pintos e, geralmente, os antimicrobianos administrados aos animais são pouco absorvidos e grandes proporções são excretadas nas fezes e/ou urina como composto original não metabolizado (HEUER *et al.*, 2011), porém, na granja da UFRRJ não há uso de antimicrobianos de forma profilática no manejo produtivo. Sendo assim, são animais nascidos com os genes, que são provavelmente passados por contaminação horizontal pelas matrizes. Esse dado caracteriza preocupação pela presença de resíduos dos antimicrobianos nos produtos de origem animal, uma vez que, ao serem absorvidas, podem se distribuir por todo o organismo dos animais tratados, inclusive, no caso das aves, no ovário e no oviduto (BORSOI, 2015) e, de igual forma, transferindo genes de resistência, gerando um alerta em Saúde Única. De acordo com Saliu e colaboradores (2017), um alto nível de heterogeneidade em genes ESBL e plasmídeos foi relatado em aves de produção.

No entanto, vários estudos sugeriram que o sistema de produção de frangos de corte atua como um reservatório de bactérias resistentes à cefalosporinas de terceira geração, como  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL) ou *Escherichia coli* produtora de *AmpC*  $\beta$ -lactamase codificada por plasmídeo (pAmpC) (ESBL/ pAmpC-EC), visto que sua prevalência é maior na indústria de produção de frangos de corte em comparação com outros setores de animais (DAME-KOREVAAR *et al.*, 2019). Apostolakos e colaboradores (2020) pesquisaram por sequenciamento de nova geração em 100 cepas de *Escherichia coli* pertencentes à frangos de corte, incluindo pintinho de 1 dia, e detectaram 31 sequências, incluindo uma sequência encontrada em sangue humano na Itália, outra de infecção urinária, entre outras. Todas carreando genes de ESBL, tais como *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>*. Corroborando com a ideia de

que novas técnicas poderiam ser utilizadas para detectar outros genes que não os pesquisados neste trabalho.

Enterobacteriaceae que produzem  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs) são um problema desafiador na medicina humana e veterinária devido às limitações das opções de tratamento contra infecções causadas por essas bactérias resistentes (PROJAHN *et al.*, 2018), ainda mais provindos de animais de produção, cujo destino final é o abastecimento do mercado consumidor de carne.

Neste mesmo trabalho foram avaliadas outras resistências além da produção de  $\beta$ -lactamases, como resistência à vancomicina. Das 51 cepas de *Enterococcus* spp. avaliadas, 1 cepa *Enterococcus faecalis* de cloaca de frango adulto apresentou resistência fenotípica à vancomicina. Todos os isolados passaram por pesquisa genotípica de detecção de *vanA* e *vanB*, e em 1 cepa identificada como *Enterococcus faecium* oriundo de cloaca de pinto foi identificado o gene *vanB* e em 1 cepa de *Enterococcus faecalis* de cloaca frango adulto foi identificado *vanA* e *vanB* simultaneamente. Vale ressaltar que a cepa que apresentou resistência fenotípica não foi a mesma que se detectou os genes. Outro ponto importante a salientar é que apesar de *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus* possuírem resistência intrínseca à vancomicina (CLSI, 2021), neste trabalho não foi observado, podendo fazer parte de estudos futuros e avaliar se a resistência intrínseca em cepas animais é diferente. Entretanto, é importante notar que foi utilizado valores de referência em tabelas do CLSI/EuCast humanos. Esses resultados são alarmantes, pois a vancomicina é um antimicrobiano de última escolha em clínica humana, sendo utilizado em bactérias multirresistentes e que não estão respondendo ao tratamento (OMS, 2017). Sendo assim, a existência desses genes de resistência de forma natural no microbioma destas aves facilitam a dispersão destes genes no ambiente configurando um risco direto à saúde de humanos, dificultando cada vez mais o tratamento e aumentando a resistência aos antimicrobianos nas bactérias, sendo um desafio num contexto em Saúde Única.

Estes mesmos 51 isolados de *Enterococcus* spp. foram avaliados quanto ao *high-level aminoglycoside resistance* (HLAR-altos níveis de resistência à aminoglicosídeos), dos quais, 23,53% (12/51) apresentaram resistência a estreptomicina e 8% (2/51) foram inconclusivos de acordo com o tamanho de halo preconizado pelo CLSI (2021). 11,74% (6/51) apresentaram resistência fenotípica à gentamicina. Sendo assim, 35,30% (18/51) dos isolados possuem altos níveis de resistência à glicosídeos. A gentamicina injetável é utilizada em pintos e perus recém-nascidos para prevenção ou controle da transmissão horizontal de diversas bactérias (ITO *et al.*, 2005) e isto é confirmado pelas propagandas de empresas agropecuárias indicando a utilização



de gentamicina injetável em ovos ou pinto de 1 dia. A gentamicina e a estreptomicina são dois importantes antimicrobianos do grupo aminoglicosídeo usados na prática clínica, que são usadas no tratamento de infecções bacterianas em humanos e animais. Portanto, a propagação de resistência a aminoglicosídeos de alto nível em bactérias leva a sérias dificuldades no tratamento de infecções bacterianas (ÖZDEMIR & TUNCER, 2020).

Em relação as 8 amostras de camas de aviário avaliadas é importante frisar que as mesmas são utilizadas a cada ciclo produtivo, considerando a ausência de episódios sanitários durante a criação das aves, desta forma a mesma pode ser reutilizada, desde que seja submetida a tratamento para inativação ou redução de patógenos e respeitando o vazio sanitário (BRASIL, 2016). O processo de lineira, onde se coloca a cama no canto e espera sua fermentação é muito utilizada. Após a extração foi realizada a pesquisa genotípica dos genes de resistência de interesse em Saúde Única. Esta análise permitiu a detecção do gene *bla<sub>VIM</sub>* oriundo de uma amostra de DNA de cama referente ao final do ciclo produtivo dos animais, sendo identificado apenas neste momento de coleta, considerando os pontos de coleta avaliados. Este gene é ligado à produção de carbapenemase.

É válido reiterar a importância do tratamento da cama para reutilização da mesma como alternativa na redução da dispersão de agentes bacterianos e genes de resistência. No entanto, em alguns casos, o manejo não é suficiente para evitar esta dispersão, como demonstrado no estudo de De Oliveira e colaboradores (2021), que identificaram alguns genes de resistência em solos que tiveram manejo de compostagem para eliminação de patógenos.

Considerando que o Brasil é um dos maiores produtores de frango do mundo e que os produtores necessitam de orientações quanto ao uso de aditivos antimicrobianos há necessidade de estudos para melhor entendimento da relação entre produção e consumo num contexto de Saúde Única, além de entender se o manejo de cama para reutilização em várias criações é válido.

### **5.5 Fatores de virulência de *Escherichia coli***

Existem muitas estirpes diferentes dentro da espécie *Escherichia coli*, a presença ou não de determinados fatores de virulência é utilizado como parâmetro de classificação de *Escherichia coli* como comensal, patogênica intestinal ou patogênica extraintestinal. No atual estudo 35 cepas de *Escherichia coli* foram avaliados, destes, 14,28% (5/35) apresentaram 1 ou mais genes relacionados a virulência relacionadas à APEC (*Avian Patogenic Comensal*). 100% destas cepas (5/5) apresentaram o gene codificador de protease de membrana externa epissomal

(*ompT*), 40% (2/5) apresentaram gene codificador de enzima putativa de *Escherichia coli* aviária (*hlyF*), 20% (1/5) apresentou gene de virulência que representa o receptor de siderófilo Samochelin (*iroN*). É importante salientar que neste estudo os que apresentaram o gene *hly* e *iroN*, apresentaram *ompT* simultaneamente (**Tabela 10**).

**Tabela 10.** Característica dos isolados *Escherichia coli* de acordo com sua origem e fator de virulência.

Isolado	Origem	Fator de virulência
1	Traqueia frango adulto	<i>ompT</i> e <i>hlyF</i>
2	Cloaca frango adulto	<i>ompT</i> e <i>hlyF</i>
3	Cloaca frango adulto	<i>ompT</i>
4	Cloaca frango adulto	<i>ompT</i> e <i>iroN</i>
5	Cloaca pintinho	<i>ompT</i>

Os antimicrobianos são comumente usados na granja para contornar os desafios que surgem devido às cepas APEC (SUBEDI *et al.*, 2018). A *Escherichia coli* que apresentou os genes *ompT* e *iroN*, também apresentou o gene codificador de  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>TEM</sub>.

Com base nos critérios genéticos para a patogenicidade, isolados contendo pelo menos cinco genes de virulência foram considerados como APEC e isolados contendo menos de cinco genes de virulência foram considerados como *Escherichia coli* aviária não patogênica (não-APEC) (SUBEDI *et al.*, 2018). Outro estudo usa o critério de que *Escherichia coli* que abrigava pelo menos quatro genes são classificados como APEC (THOMRONGSUWANNAKIJ *et al.*, 2020). Já Johnson e colaboradores (2008) considerava a presença de 3 genes simultaneamente.

Como visto, cada autor considera a classificação como APEC de uma forma diferente, porém no presente estudo nenhuma foi considerada APEC, entretanto, existem outros genes relacionados à APEC que não foram avaliados. No atual trabalho poderia ser considerada AFEC (*Avian fecal comensal*), quando tem um ou dois genes (JOHNSON *et al.*, 2008).

## 5.6 Identificação de cepas bacterianas do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*

Das 190 cepas de cocobacilos Gram-negativos não fermentadores avaliados, 35 foram identificados como oxidase e motilidade negativos. 33 eram oriundos de diferentes espécies animais, como cão, gato e cavalo e de diferentes processos infecciosos, como conduto auditivo, pele, urina e infecção otológica e 02 eram amostras de solo (**Tabela 11**). Das cepas avaliadas,

a identificação proteômica revelou que 31,42% (11/35) eram *A. pittii*, 40% (14/35) *A. baumannii*, 11,48% (4/35) foram identificados como *A. nosocomialis*, 8,57% (3/35) foram identificados como não pertencentes do complexo *Acb* (2 *A. ursinguii* e 1 *A. venetianus*), 2,87% (1/33) só foi identificado o gênero *Acinetobater* e 2 não foram identificadas, como descrito no **Figura 23** e na **Tabela 11**.

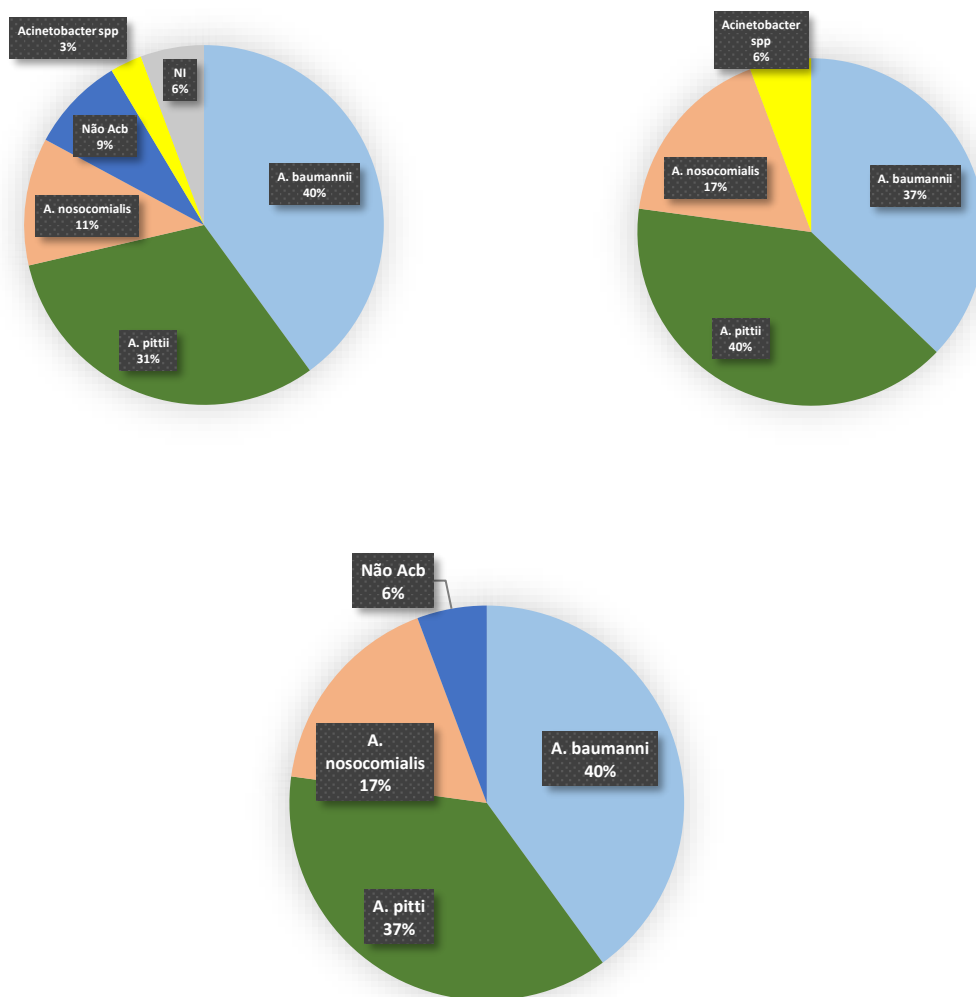
**Tabela 11.** Caracterização dos isolados do complexo *Acb* quanto a origem e processo infeccioso.

Isolado	Origem	Amostra
1	Cão	Urina
2	Gato	Urina
3	Cão	Urina
4	Cão	Urina
5	Gato	Tecido
6	Cão	Pele
7	Cavalo	Pele
8	Cão	Urina
9	Cão	Urina
10	Gato	Urina
11	Cão	Urina
12	Cão	Secreção otológica
13	Cão	Urina
14	Cão	Urina
15	Cão	Urina
16	Cão	Urina
17	Gato	Urina
18	Cão	Swab oral
19	Cão	Secreção nasal
20	Cão	TVT
21	Cão	Secreção otológica
22	Cão	Secreção otológica
23	Gato	Urina
24	Cão	Lesão

<b>Tabela 11.</b> Continuação		
25	Cão	Urina
26	Gato	Secreção nasal
27	Cão	Urina
28	Cão	Urina
29	Gato	Secreção otológica
30	Cão	Urina
31	Cão	Secreção otológica
32	Gato	Urina
33	Solo	
34	Cão	Necrópsia
35	Solo	

\*TVT Tumor venéreo transmissível

A identificação molecular por multiplex PCR revelou que 34,28% (14/35) dos isolados eram *A. pittii*, 37,14% (13/35) *A. baumannii*, 17,14% (6/35) foram identificados como *A. nosocomialis* e 5,71% (2/35) foram identificados como *Acinetobacter* spp. Já a identificação molecular padrão ouro por sequenciamento do gene *rpoB* revelou que 40% (14/35) dos isolados eram *A. baumannii*, 37,14% (13/35) *A. pittii*, 17,14% (6/35) foram identificados como *A. nosocomialis* e 5,71% (2/35) foram identificados como não pertencentes do complexo *Acb* (*A. ursinguii* e *A. venetianus*), como descrito na **Figura 23** e na **Tabela 12**. Algumas divergências entre as técnicas ocorreram nas cepas 17, 20, 23, 26, 30 e 32 em relação a identificação quando comparada ao padrão ouro de sequenciamento por *rpoB* e a cepa 27 só foi identificada a nível de gênero tanto por MALDI TOF, quanto por multiplex.



**Figura 23.** Resultados obtidos na utilização das diferentes técnicas: MALDI TOF, multiplex PCR e sequenciamento do gene *rpoB*.

Em relação ao MALDI TOF, já é descrito que a confiança se dá a níveis acima de 2,3 de score quando avaliados pelo equipamento, podendo ser uma justificativa, pois apesar de todos terem dado escore acima de 2,0, nenhum apresentou escore acima de 2,3. A técnica MALDI-TOF MS para identificação microbiana revolucionou a prática laboratorial clínica; requer menos tempo de resposta e volumes de amostra mais baixos, tem custos mais baixos e atinge uma maior seletividade de identificação do que os procedimentos laboratoriais clássicos para identificação microbiana (HUANG *et al.*, 2013). Uma limitação da técnica pelo multiplex PCR utilizada no presente estudo seria a identificação de apenas três espécies pertencentes ao complexo *Acb*, podendo ter estudos futuros para agregar novos *primers* para identificação de outras espécies.

**Tabela 12.** Identificação pelas diferentes técnicas das espécies do complexo *Acb*.

Isolado	Identificação		
	MALDI TOF MS	Multiplex PCR	<i>rpoB</i>
1	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	99,26% <i>A. pittii</i>
2	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	99,18% <i>A. pittii</i>
3	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	99,18% <i>A. pittii</i>
4	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	98,00% <i>A. pittii</i>
5	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	99,39% <i>A. baumannii</i>
6	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	99,20% <i>A. baumannii</i>
7	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	99,10% <i>A. baumannii</i>
8	<i>A. nosocomialis</i>	<i>A. nosocomialis</i>	99,70% <i>A. nosocomialis</i>
9	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	98,97% <i>A. pittii</i>
10	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	99,39% <i>A. pittii</i>
11	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	99,01% <i>A. pittii</i>
12	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	99,03% <i>A. baumannii</i>
13	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	99,80% <i>A. pittii</i>
14	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	99,80% <i>A. baumannii</i>
15	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	99,80% <i>A. pittii</i>
16	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	99,80% <i>A. baumannii</i>
17	<b><i>A. ursinguii</i></b>	<i>A. pittii</i>	99,33% <i>A. pittii</i>
18	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	99,01% <i>A. baumannii</i>
19	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	100% <i>A. nosocomialis</i>
20	<i>A. venetianus</i>	<b><i>A. nosocomialis</i></b>	98,62% <i>A. venetianus</i>
21	<i>A. nosocomialis</i>	<i>A. nosocomialis</i>	99,79% <i>A. nosocomialis</i>
22	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	98,87% <i>A. baumannii</i>
23	<i>A. nosocomialis</i>	<b><i>Acinetobacter spp.</i></b>	99,79% <i>A. nosocomialis</i>
24	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	98,62% <i>A. pittii</i>
25	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	99,41% <i>A. baumannii</i>
26	<i>A. ursinguii</i>	<b><i>A. nosocomialis</i></b>	97,59% <i>A. ursinguii</i>
27	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<b>93,34% <i>A. baumannii</i></b>
28	N.I.	<i>A. nosocomialis</i>	96,26% <i>A. nosocomialis</i>
29	N.I.	<i>A. nosocomialis</i>	96,26% <i>A. nosocomialis</i>
30	<b><i>A. nosocomialis</i></b>	<i>A. pittii</i>	99,02% <i>A. pittii</i>
31	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	99,20% <i>A. baumannii</i>
32	<b><i>A. baumannii</i></b>	<i>A. pittii</i>	99,02% <i>A. pittii</i>
33	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	99,21% <i>A. baumannii</i>
34	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	99,60% <i>A. baumannii</i>
35	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	98,45% <i>A. baumannii</i>

\*N.I.- Não identificado

É interessante apontar que a comparação entre pares das semelhanças percentuais de DNA do gene *rpoB* das cepas testadas variou entre 98 e 99% de semelhança, ou seja, quando o sequenciamento foi realizado e o BLAST foi utilizado para identificar qual seria a espécie de *Acinetobacter spp.*, apenas uma espécie *A. nosocomialis* apresentou 100% de homologia de DNA quando comparações pareadas foram feitas.

A identificação de todas as três espécies de relevância clínica do complexo *Acb* em amostras de processos infecciosos animais (CHEN *et al.*, 2018) reforça as necessidades de uma

investigação adequada desses agentes no laboratório de diagnóstico veterinário de rotina. A maioria das amostras foram oriundas de cães, seguida de gatos, equinos e solo.

Originalmente, o gênero *Acinetobacter* spp. era primariamente ambiental, com o tempo, isolados patogênicos nosocomiais aumentaram a incidência. Na literatura, muitos são os relatos de caso em estudos com animais de espécies do complexo *Acb* (KUZU *et al.*, 2016; SMET *et al.*, 2014; ARIAS *et al.*, 2013; PIMENTA GUIMARÃES *et al.*, 2013), porém estudos recentes em animais mostram que *A. baumannii* está associado a diferentes infecções, em hospitais ou clínicas, acometendo cães, gatos, cavalos entre outras espécies animais (MABONI *et al.*, 2019).

No mesmo estudo, *A. baumannii* foi encontrado como a espécie de maior prevalência isolada de uma ampla gama de infecções animais. Já no estudo de Rafei e colaboradores (2015) *A. pittii* foi identificada como uma espécie significativa não-*baumannii* em gado, cavalos e pequenos animais de companhia.

Os animais mais frequentemente hospitalizados são os animais de companhia, sendo os cães, gatos e cavalos os mais relevantes a nível global. Como consequência, a maioria dos dados sobre infecções por *Acinetobacter* spp. diz respeito a essas espécies animais (VAN DER KOLK *et al.*, 2019). Neste trabalho, Van der Kolk e colaboradores analisaram amostras de cães, gatos, cavalos, suínos, frangos, falcão, coelhos, ratos, papagaio e outros animais, utilizando diferentes técnicas de identificação de *Acinetobacter* spp. como sequenciamento e multiplex PCR para determinar a importância desse complexo em medicina veterinária.

Muito se estuda sobre *A. baumannii* em medicina humana, mas por outro lado, pouco se sabe sobre a ocorrência natural de *Acinetobacter* spp. em animais, sua relevância clínica, identificação, patogênese, resistência, virulência de *Acinetobacter baumannii* e não *baumannii* em medicina veterinária pertencentes ao complexo *Acb* e se eles são um reservatório deste patógeno favorecendo a disseminação para o homem.

O gênero *Acinetobacter* compreende 73 espécies, sendo 27 espécies nomeadas efetivamente, mas não publicadas de forma válida ([www.bacterio.net/acinetobacter.html](http://www.bacterio.net/acinetobacter.html); último acesso em março de 2022). As espécies clinicamente mais relevantes são do complexo *Acb*.

As espécies mais prevalentes identificadas neste estudo foram *A. pittii*, *A. baumannii* e *A. nosocomialis*, respectivamente. Nossos achados corroboram com os de um estudo anterior, destacando que as espécies do complexo *Acb* são de grande relevância clínica veterinária (CHEN *et al.*, 2018). *A. baumannii* é a espécie mais bem estudada em humanos e está associada a bacteremia, pneumonia associada à ventilação mecânica, infecções do trato urinário, infecções

de pele e tecidos moles (WEINBERG *et al.*, 2020; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2019). Em animais, *A. baumannii* está associado a diferentes infecções, em hospitais ou clínicas, acometendo cães, gatos, cavalos entre outras espécies animais (MABONI *et al.*, 2019).

A técnica do padrão ouro é baseada na amplificação e sequenciamento de quatro regiões variáveis do gene *rpoB* que incluem duas regiões polimórficas e duas regiões flanqueadas que são conservadas dentro do genoma completo do gênero *Acinetobacter* (LaSCOLA *et al.*, 2006). Esta permite a correta identificação de todas as espécies pertencentes ao complexo *Acb*, como a identificação fenotípica desses agentes em laboratório de rotina com base em testes bioquímicos não permite uma real caracterização desses agentes (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2014) e considerando que a técnica padrão ouro é extremamente trabalhosa e cara, busca-se por técnicas alternativas que permitam a identificação segura das espécies, portanto a validação de técnicas que garantam a identificação desses agentes é uma estratégia necessária para acelerar o diagnóstico de doenças causadas por essas espécies (CHEN *et al.*, 2014) bem como o entendimento da disseminação desses agentes na área veterinária, permitindo o conhecimento das cepas circulantes e seu real impacto.

Para realizar a validação das técnicas e avaliar a confiabilidade entre os métodos estudados, utilizou-se o teste de Kappa (FLEISS, 1981) que indica a concordância entre os resultados avaliados pelos diferentes métodos de identificação das cepas do complexo *Acb*. Foi avaliado a relação entre MALDI-TOF e PCR, MALDI-TOF e *rpoB*, PCR e *rpoB*, e entre os três. Sendo assim, obtivemos 4 coeficientes distintos (**Tabela 13**).

**Tabela 13.** Avaliação utilizando teste Kappa entre os métodos de identificação MALDI-TOF, multiplex PCR e *rpoB* das espécies do complexo *Acb*.

Comparações	Coefficiente Kappa (IC)	p-value
MALDI -TOF X PCR	0,729 (0,509 e 0,949)	8,29 e-11
MALDI-TOF X <i>rpoB</i>	0,774 (0,554 e 0,994)	5,31 e-12
PCR X <i>rpoB</i>	0,787 (0,569 e 1,000)	1,60 e-12
MALDI-TOF X PCR X <i>rpoB</i>	0,757 (0,628 e 0,886)	0

A interpretação dos coeficientes oferecida por Fleiss (1988) diz que acima de 0,75 a concordância entre os métodos avaliados para identificação das espécies dos isolados bacterianos estudados é excelente. Já Altman (1991) diz que um coeficiente entre 0,61 a 0,80



possui uma concordância boa. A concordância só é caracterizada como perfeita quando o índice é igual a 1,00 (FLEISS, 1998; ALTMAN, 1991). Sendo assim, MALDI-TOF MS e PCR são excelentes alternativas na identificação dos isolados pertencentes a espécies do complexo *Acb*. E entre MALDI-TOF MS e PCR, o PCR pode ser considerado o de mais fácil acesso, uma vez que o aumento dos números de laboratórios de biologia molecular está crescente e o acesso ao equipamento do MALDI-TOF MS ainda não é tão simples.

A técnica do MALDI-TOF MS surgiu há quase duas décadas como uma técnica para a identificação rápida de microrganismos e se estabeleceu como um instrumento fundamental no laboratório de microbiologia clínica (OVIAÑO & RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, 2021). É importante salientar que MALDI-TOF MS e outros sistemas são tão bons quanto seu banco de dados, ou seja, eles devem incluir cepas de referência de todas as espécies, de preferência várias cepas por espécie para cobrir a variação dentro das espécies. Como consequência, o MALDI-TOF MS permite a identificação de *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* com precisão aceitável e relativamente rápida.

Segundo Chen e colaboradores (2018) o método de PCR multiplex é capaz de diferenciar as três espécies do complexo *Acb* clinicamente relevantes em uma única reação. A PCR multiplex baseada em genes específicos da espécie é considerada simples, rápida e aceitável para a identificação de diferentes espécies dentro do complexo *Acb*. Este PCR multiplex é reproduzível. Uma PCR multiplex baseada na amplificação do gene *gyrB* foi proposta para a identificação de *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*.

Ambas as técnicas são precisas e podem ser utilizadas, pois apresentam vantagens e desvantagens e irá depender do acesso ao equipamento e reagentes, de pessoal treinado para realizar as técnicas e da disponibilidade financeira a serem utilizados, porém, pela análise estatística, o resultado é bastante preciso quando comparadas entre si. Sendo uma boa alternativa para a rotina veterinária de identificação de espécies do complexo *Acb* de importância clínica.

### **5.7 Resistência das cepas do complexo *Acb***

As bactérias do complexo *Acb* apresentam resistência intrínseca (RI) aos antimicrobianos AMP, AMO, AMC, AZT, ertapenem (ERT 10µg), trimetoprim (TRI 10µg), cloranfenicol (CLO 30µg) e fosfomicina (FOS 30µg) (BrCAST, 2021), o que já gera uma dificuldade no tratamento de rotina, além disso, poucos são os antimicrobianos com pontos de corte específicos nos manuais de disco-difusão (BrCAST e CLSI, 2021). Além disso, o

BrCAST (2021) considera resistência intrínseca para cefotaxima (CTX 30 µg) ceftriaxona (CRO 30µg), doxiciclina (DOX 30µg) e tetraciclina (TET 30µg), e o CLSI Veterinário (2020) considera resistência intrínseca para ceftaxima e possuem ainda a habilidade de adquirir genes de resistência adicionais (POIREL *et al.*, 2011), mostrando o real desafio de se trabalhar com espécies deste complexo e gerar um diagnóstico acurado.

Dos 35 isolados avaliados, considerando o perfil de resistência, 54,28% (19/35) foram classificadas como MDR, sendo 31,57% (6/19) *A. pittii*, e *A. baumannii*, igualmente, 26,32% (5/19) *A. nosocomialis* e 10,52% (2/19) não pertencentes ao complexo *Acb* (*A. venetianus* e *A. ursinguii*). Maboni e colaboradores (2019) e CLSI (2021) consideram que uma bactéria é classificada como MDR quando possui resistência a pelo menos um representante de três ou mais classes de antimicrobianos bacterianos. No entanto, poucos estudos relataram a ocorrência de outras espécies do complexo *Acb* causando infecção em animais e apresentando um padrão de MDR (MABONI *et al.*, 2019; KUZU *et al.*, 2016; SMET *et al.*, 2014; ARIAS *et al.*, 2013; PIMENTA GUIMARÃES *et al.*, 2013).

Os isolados de MDR identificados estavam envolvidos principalmente em infecções do trato urinário e pele de gatos e cães (**Tabela 14**), o que confirma o desafio real na rotina clínica veterinária, e reforça a necessidade de monitorar essas cepas no ambiente veterinário para a adoção de medidas de controle e tratamento adequados.

**Tabela 14.** Indicação dos processos infecciosos classificados como MDR.

Processo infeccioso	MDR
Urina	8
Pele	6
Secreção otológica	3
Secreção nasal	2

Nossos resultados, juntamente com os de estudos recentes, levantam preocupações sobre a considerável prevalência de MDR em cepas do complexo *Acb* associadas à infecções em animais e que pode ser potencialmente transmitida ao ambiente humano ou vice-versa (VAN DER KOLK *et al.*, 2019; MABONI *et al.*, 2019). O padrão MDR está relacionado à expressão de vários mecanismos de resistência, incluindo β-lactamases, bombas de efluxo multidrogas, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, defeitos de permeabilidade e alteração de sítios-alvo (GALLAGHER & BAKER, 2020). Em um estudo recente, altas taxas

de resistência de MDR aos principais antimicrobianos foram encontradas para isolados de *Acinetobacter* spp. de animais, exceto para imipenem ao qual todos os isolados testados foram suscetíveis (MABONI *et al.*, 2020).

A prevalência de resistência no complexo *Acb* de acordo com cada antimicrobiano avaliado foi de 88,57% (31/35) para ampicilina + sulbactam, 62,86% (22/35) para aztreonam, 57,14% (20/35) para ceftaxima, 40% (14/35) para sulfametoxazol + trimetoprima, 37,14% (13/35) para gentamicina, 31,42% (11/35) para levofloxacina, amoxicilina + sulbactam e ciprofloxacina, 22,87% (8/35) para cefepima e ceftazidima, 17,14% (6/35) para meropenem e imipenem, 14,29% (5/35) para tetraciclina e amoxicilina + clavulanato, 11,43% (4/35) para ceftoxitima, 8,57% (3/35) para amicacina e 5,71% (2/35) azitromicina e doxacilina.

Estas cepas bacterianas configuram muitos aspectos interessantes, ainda mais no que tange mecanismos de resistência, principalmente em relação aos  $\beta$ -lactâmicos, uma vez que alguns deles foram identificados como produtores de ESBL e carbapenemase. Ou seja, são isolados capazes de hidrolisar a maioria das penicilinas e cefalosporinas de terceira e quarta gerações e monobactâmicos (AZT), mas não cefamicinas ou carbapenêmicos (CLSI, 2021; BrCAST, 2020; LITAKE *et al.*, 2015). A maioria das ESBLs pertence à classe A de Ambler e é inibida por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam e por diazabiciclooctanonas (avibactam) (BrCAST, 2020).

As cepas detectadas com ESBL tem grande importância em todo o mundo. A disseminação destes agentes tem aumentado cada vez mais, sendo resultado da expansão clonal de organismos produtores de ESBL, da transferência horizontal de genes de ESBL em plasmídeos e, menos comumente, surgimento de novas enzimas, tendo como grupo clinicamente mais importantes de ESBLs as enzimas CTX-M, seguido de SHV e ESBLs derivados de TEM (BrCAST, 2020; LITAKE *et al.*, 2015).

Das 35 cepas estudadas, 48,57% (17/35) apresentaram 1 ou mais genes de ESBL, destes, 23,53% (4/17) cepas apresentaram o gene *bla*<sub>CTX</sub>, 5,88% (1/17) cepas apresentou o gene *bla*<sub>SHV</sub>, 47,06% (8/17) cepas apresentaram o gene *bla*<sub>TEM</sub>, 17,65% (3/17) cepas o gene *bla*<sub>CTX</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> e 5,88% (1/17) cepa apresentou *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> (**Tabela 15**). Apesar da identificação destes genes serem considerados relativamente rara em *A. baumannii* (GHAIMA, 2018; LITAKE *et al.*, 2015), neste estudo foram identificados 7 isolados de *A. baumannii* produtores de ESBL e 10 isolados não- *A. baumannii*, sendo 70% (7/10) *A. pittii* e 30% (3/10) *A. nosocomialis*.

Alguns são os desafios de identificação fenotípica de resistência em laboratório, uma vez que desde 2018 todos os laboratórios brasileiros de diagnóstico microbiológico precisam

estar padronizados de acordo com o manual do BrCAST, porém há falta de dados para veterinária. Sendo assim, o método híbrido de utilização dos manuais do BrCAST e CLSI é realizado. Entretanto, há algumas diferenças significativas em relação aos pontos de corte entre eles, como por exemplo, na avaliação de ESBL, embora as duas considerem a resistência fenotípica aos mesmos antimicrobianos, os pontos de corte são diferentes e o BrCAST considera um resultado positivo quando as zonas de inibição em torno de qualquer um dos discos de cefalosporinas são aumentadas na direção do disco que contém o ácido clavulânico, considerando o aparecimento ou não de zona fantasma e deformação no halo das cefalosporinas, já no CLSI se considera a resistência a qualquer antimicrobiano utilizado.

Nos manuais utilizados para identificação e avaliação de resistência bacteriana, a avaliação utilizando testes fenotípicos para produção de carbapenemase é preconizada para ordem Enterobacterales, ou seja, não há testes fenotípicos preconizados para cepas de *Acinetobacter* spp. Essa pode ser uma justificativa para dificuldade de correlação entre testes fenotípicos e a detecção de genes de resistência. No presente trabalho, 4 isolados não apresentaram fenótipo de produção de ESBL no método de disco-difusão indicado pelo CLSI e BrCAST possuíam genes de ESBL. Mostrando a grande dificuldade da correta identificação de resistência desse complexo dentro da clínica.

Essa produção de carbapenemase é avaliada pelo fato dos carbapenêmicos se configurarem como uma excelente alternativa para o tratamento das infecções causadas por estes patógenos (OMS, 2017), porém, principalmente no que tange possuírem resistência intrínseca, poderem ser MDR e produtores de ESBL e carbapenemase há uma maior dificuldade de escolha terapêutica.

As cepas de *Acinetobacter* spp. têm se tornado resistentes aos carbapenêmicos através de distintos mecanismos que incluem a presença de metalo- $\beta$ -lactamases (MBL) (classe B) que hidrolisam todos os  $\beta$ -lactâmicos e podem ser transmitidos por transferência horizontal de genes entre bactérias, bem como clonagem de genes, portanto, se espalharam rapidamente dentro das espécies bacterianas e em grandes distâncias geográficas (THERIAULT *et al.*, 2021) e/ou a presença ou superexpressão de carbapenemase do tipo oxacilinase (OXA) (classe D), especialmente *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>*, *bla<sub>OXA-58</sub>* e *bla<sub>OXA-51</sub>* (CHEN *et al.*, 2018; POIREL *et al.*, 2011). Enzimas comuns conferem resistência à maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo cefalosporinas de terceira geração. Além disso, estes mecanismos podem ocorrer em conjunto com a resistência a outras classes de antimicrobianos (THERIAULT *et al.*, 2021).

No atual contexto de Saúde Única, as cepas do presente trabalho foram avaliadas quanto a produção de carbapenemase do tipo penicilinase com o gene *bla<sub>KPC</sub>*, do tipo MBL para os genes *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>* e quanto a produção de carbapenemase do tipo OXA para os genes *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>OXA-58</sub>* e *bla<sub>OXA-143</sub>*. Das 35 cepas, 54,28% (19/35) apresentaram 1 ou mais genes para carbapenemase. Dos 19, 36,82% (7/19) apresentaram genes MBL, dos quais 28,57% (2/7) cepas apresentaram *bla<sub>IMP</sub>*, 71,43% (5/7) cepas apresentaram *bla<sub>VIM</sub>* e 14,28% (1/7) apresentou ambos os genes (**Tabela 14**). Não foram encontrados outros genes MBL ou do tipo penicilinasas. Dessas 19 cepas com genes para carbapenemase, 89,47% (17/19) apresentaram genes OXA, sendo 76,47% (13/17) cepas de *A. baumannii* com *bla<sub>OXA-51</sub>*, 5,88% (1/17) cepas de *A. pittii* com *bla<sub>OXA-51</sub>*, 5,88% (1/17) cepa de *A. nosocomialis* com *bla<sub>OXA-51</sub>*, 5,88% (1/17) cepa de *A. pittii* com *bla<sub>OXA-23</sub>* e 5,88% (1/17) cepa de *A. baumannii* com *bla<sub>OXA-51</sub>* *bla<sub>OXA-23</sub>*, sendo esta amostra ambiental (**Tabela 14**). 26,31% (5/19) das cepas apresentaram genes MBL e OXA simultaneamente e 52,63% (10/19) das cepas apresentaram genes de produção de ESBL e carbapenemase simultaneamente.

Algumas cepas não apresentaram resistência fenotípica ao meropenem e foi detectado genes de produção de carbapenemase. Segundo o CLSI (2020), *Acinetobacter* spp apresenta baixa sensibilidade ao teste fenotípico CarbaNP e aos testes enzimáticos fenotípicos mCIM e eCIM onde o antimicrobiano meropenem é utilizado, podendo ser uma possível explicação ou algum mecanismo de bloqueio da expressão fenotípica no momento de realização da pesquisa.

Devido a essas características, os MBLs têm sido amplamente divulgados e ocorrem mais comumente em cepas de *A. baumannii* (THERIAULT *et al.*, 2021). Kabir e colaboradores (2016) não encontraram *bla<sub>OXA-23</sub>* ou *bla<sub>OXA-24</sub>* em *A. baumannii*. São muitos os estudos analisando *A. baumannii* através de *bla<sub>OXA-51</sub>*, por ser considerado intrínseco (TAKEBAYASHI *et al.*, 2021; TURTON *et al.*, 2006), mas neste estudo encontramos estes genes em *Acinetobacter* não-*baumannii*, gerando um alerta para a transferência de genes entre espécies.

**Tabela 15.** Perfil fenogenotípico de resistência antimicrobiana das espécies do complexo *Acb*.

Isolado	Espécie	Perfil resistência	Perfil resistência genotípica	
		fenotípica	ESBL	Carbapenemase
1	<i>A. pittii</i>	CTX	SHV	OXA-23, IMP e VIM
2	<i>A. pittii</i>	ATM, AMP, SUT, TET	-	-
3	<i>A. pittii</i>	ATM, AMP, SUT, CTX(I)	-	VIM
4	<i>A. pittii</i>	ATM, AMP, CTX, MER, LEV	TEM e SHV	VIM
5	<i>A. baumannii</i>	ATM, AMP, SUT, CTX, IMP, CPM, GEN, LEV, CIP, ASB	CTX	OXA-51
6	<i>A. baumannii</i>	ATM, AMP, SUT, CTX, LEV, CIP, CAZ, AMI	CTX e TEM	VIM e OXA-51
7	<i>A. baumannii</i>	ATM, AMP, SUT, CTX, LEV, CIP, CAZ, GEN	CTX e TEM	OXA-51
8	<i>A. nosocomialis</i>	AMP, SUT, CTX, CPM, LEV, CIP, CAZ, ASB	-	-
9	<i>A. pittii</i>	AMP, CTX, CPM, GEN, ASB	-	-
10	<i>A. pittii</i>	ATM, AMP, CTX, IMP, ASB	TEM	IMP e OXA-51
11	<i>A. pittii</i>	ATM, AMP, CTX, IMP, ASB	TEM	-
12	<i>A. baumannii</i>	ATM, AMP, CTX, GEN, IMP, ASB	CTX	OXA-51
13	<i>A. pittii</i>	ATM, AMP, SUT, TET, CTX, CIP, GEN	-	-
14	<i>A. baumannii</i>	ATM, AMP, MER	-	OXA-51
15	<i>A. pittii</i>	ATM, AMP, CTX, MER, GEN, ASB	TEM	-

**Tabela 15.** Continuação

16	<i>A. baumannii</i>	ATM, AMP, CTX, MER, GEN, ASB	CTX e TEM	IMP e OXA-51
17	<i>A. pittii</i>	ATM, AMP	TEM	-
18	<i>A. baumannii</i>	ATM, AMP, CAZ, GEN	-	OXA-51
19	<i>A. pittii</i>	AMP, ATM, CAZ	TEM	-
20	<i>A. nosocomialis</i>	ATM, AMP, SUT, CTX, IPM, CPM, CIP, CAZ, ASB	TEM	-
21	<i>A. nosocomialis</i>	ATM, AMP, SUT, CTX, MER, IPM, CIP, LEV	TEM	-
22	<i>A. baumannii</i>	ATM, AMP, CTX, LEV	CTX	OXA-51
23	<i>A. nosocomialis</i>	ATM, AMP, AMI	TEM	-
24	<i>A. pittii</i>	AMP, CFO	-	-
25	<i>A. baumannii</i>	AMP	-	OXA-51
26	<i>A. nosocomialis</i>	AMP, SUT, AMC, AZI, CFO	-	-
27	<i>A. baumannii</i>	-	-	OXA-51
28	<i>A. nosocomialis</i>	AMP, GEN, CPM (I)	-	-
29	<i>A. nosocomialis</i>	AMP, ATM, SUT, CPM, CAZ, GEN, TET, CTX, CIP, LEV, ASB, AMC, DOX	-	VIM e OXA-51
30	<i>A. pittii</i>	AMP, CTX, SUT, CIP, LEV, ASB, AMI, MER, TET, DOX, CPM, GEN	TEM	-
31	<i>A. baumannii</i>	AMP, CAZ, CPM, GEN, SUT, CIP, LEV, AMC, TET, CFO, AZI	CTX	OXA-51
32	<i>A. pittii</i>	AMP, GEN, SUT, CIP, LEV, AMC, CFO	-	-

**Tabela 15.** Continuação

33	<i>A. baumannii</i>	-	-	OXA-51
34	<i>A. baumannii</i>	ATM, AMP, CTX, AMC	-	OXA 51
35	<i>A. baumannii</i>	-	-	OXA-51 e OXA-24

\*

Dos 19 isolados que foram classificados como MDR, 68,42% (13/19) apresentaram algum gene de produção de  $\beta$ -lactamase, seja ESBL ou carbapenemase. Este é o real alerta na rotina clínica veterinária, onde prescrever o tratamento para esses animais se torna cada dia mais desafiador.

A resistência antimicrobiana é grave ameaça à saúde pública, em especial porque os mecanismos de geração, manutenção e transmissão da resistência antimicrobiana entre humanos e animais não estão claramente estabelecidos, sendo *A. baumannii* um exemplo notável dessa complexidade (MABONI *et al.*, 2020).

Poucos estudos na área da medicina veterinária relatam a ocorrência das distintas espécies do complexo, além de *A. baumannii*, bem como seu respectivo perfil de resistência, porém, estudos como esse mostra o quão importante esse complexo de bactérias tem sido frente às infecções clínicas rotineiras e a continuação dessas pesquisas são muito importantes para a total compreensão dentro do ambiente veterinário.

### 5.8 PFGE das cepas do complexo *Acb*

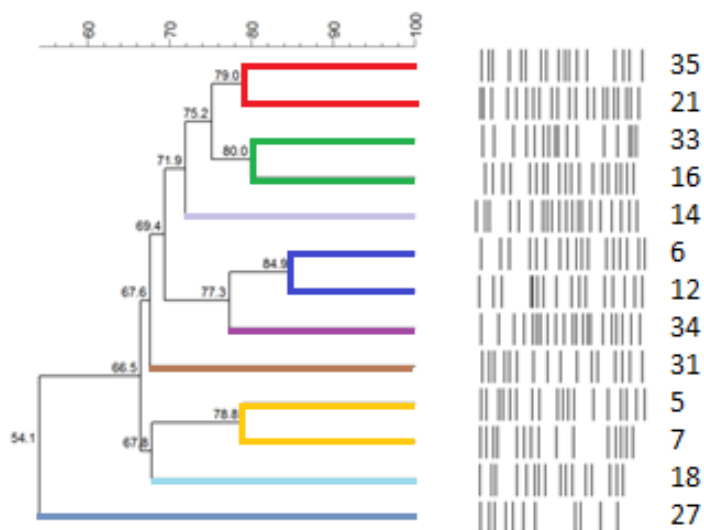
Das 35 cepas do complexo *Acb* foram escolhidas as cepas de maior frequência, sendo assim, foram avaliadas 25 cepas de *Acinetobacter* spp., sendo 13 *Acinetobacter baumannii* e 12 *Acinetobacter pittii* foram tipados por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) após digestão de DNA genômico com a enzima *ApaI*. Os perfis de restrição *ApaI* foram inicialmente comparados por inspeção visual, e os isolados foram considerados intimamente relacionados se tivessem diferenças em menos de três bandas (TENOVER *et al.*, 1995).

A análise realizada por computador usando o software BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) também foi realizada e o agrupamento foi pelo método de grupos de pares não ponderados com média matemática. A similaridade de DNA foi calculada usando o coeficiente Dice baseado em banda com uma configuração de tolerância de 1,0% e uma configuração de otimização de 1,0% para todo o perfil (WANG *et al.*, 2018).



Na avaliação do PFGE, 69,23% (9/13) pulsotipos diferentes foram identificados entre os *Acinetobacter baumannii* pesquisados em 4 clusters diferentes e 5 perfis únicos, como descrito na **Figura 24**. Das 14 cepas originalmente identificadas como *A. baumannii*, 13 foram analisadas pela técnica de PFGE. Entretanto, nenhum pulsotipo foi considerado clone entre as cepas, por apresentarem percentual menor que 85% de semelhança, testes utilizando outras técnicas como MLST (tipos de sequências em muitos locus) poderão ser realizadas futuramente para melhor compreensão da relação entre estas cepas.

Embora não tenha tido nenhuma semelhança significativa, é interessante notar que existe algum grau de semelhança entre cepas providas de diferentes espécies animais e diferentes locais, destacando alguns *clusters*. Como o primeiro, formado pela cepa 35 oriunda de amostra ambiental e a cepa 21, oriunda de cão, se repetindo no segundo *cluster* formado pelas cepas 33, oriunda de ambiente e 16 oriunda de cão. O quarto *cluster* é formado pelas cepas 5 e 7, onde a cepa 5 é oriunda de amostras de gato e a cepa 7 de amostra equina.

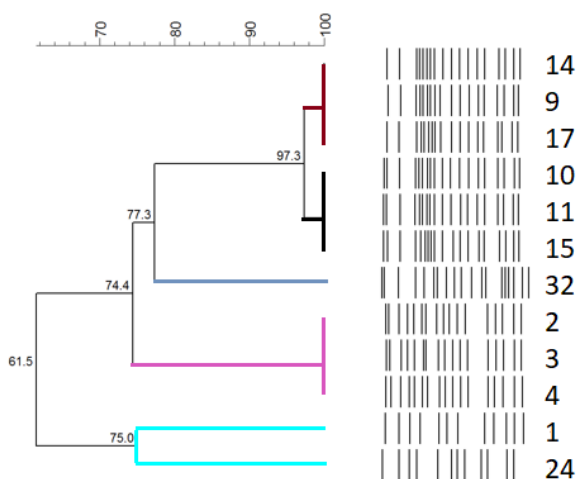


**Figura 24.** Resultado de tipagem por técnica de PFGE dos *A. baumannii*

Na mesma avaliação do PFGE, 41,67% (5/12) pulsotipos diferentes foram identificados entre os *Acinetobacter pittii* pesquisados em 4 *clusters* diferentes e 1 perfil único, como descrito na **Figura 25**. Foram observados 2 *clusters* apresentando percentual maior do que 97% de semelhança, podendo ser considerados como clones, testes utilizando outras técnicas como MLST (tipos de sequências em muitos locus) poderão ser realizadas.

Entretanto, os dados foram interessantes para observar que no primeiro cluster formado pela cepa 14, 9 e 17 pertencem a diferentes espécies animais, as cepas 14 e 9 são providas de amostras de cães e a cepa 17 é provida de amostra de gato, o mesmo acontece com o segundo

cluster formado pelas cepas 10, 11 e 15, onde a cepa 10 pertence a amostra oriunda de gato e as cepas 11 e 15 pertencem a amostras oriundas de cães. No terceiro cluster formado pelas cepas 2,3 e 4, apesar de não terem tido um percentual de semelhança acima de 85%, a cepa 2 é oriunda de amostra de gato e as cepas 3 e 4 são oriundas de amostras de cães. Isto é alarmante se pensar que as mesmas cepas poderão estar circulando em espécies animais diferentes, espécies estas que possuem um contato estreito com os tutores. Trabalhos futuros realizando a mesma técnica para cepas oriundas de amostras humanas poderão ser avaliadas.



**Figura 25.** Resultado de tipagem por técnica de PFGE dos *A. pittii*

A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) tem sido usada nas últimas três décadas para decifrar as ligações epidemiológicas entre isolados bacterianos e vias de transmissão. Esta técnica tem sido constantemente substituída pela tipagem baseada no genoma completo sequenciado, que fornece árvores filogenéticas e se tornou o novo padrão de referência para tipagem bacteriana (MARTAK *et al.*, 2020). Normalmente, os métodos de tipagem molecular fornecem dados muito úteis sobre a fonte e a taxa de disseminação de infecções nas populações estudadas, porém o grau de desafio deste trabalho é fazer as comparações com cepas de fontes diversas, uma vez que as amostras não provêm de uma mesma espécie animal e nem de um mesmo hospital ou clínica, são amostras providas de um mesmo laboratório que recebe pedidos de diferentes partes do Rio de Janeiro.

## 6. CONCLUSÕES

A análise de amostras provenientes de distintos ambientes de produção, manutenção e cuidados clínicos de animais permitiu a construção de um panorama da diversidade e resistência antimicrobiana dentro de uma abordagem em Saúde Única.

Os animais selvagens utilizados no presente estudo, foram resgatados e monitorados para a reintrodução na natureza. Por serem animais saudáveis e albergarem patógenos bacterianos com potencial de virulência e resistência, é possível evidenciar seu papel no processo de disseminação de genes de resistência, com destaque para o gene *mcr-9* relacionado a resistência à colistina, antimicrobiano de uso terapêutico em tratamento de infecções humanas graves.

A detecção de uma cepa de *Pantoea dispersa* a partir de uma amostra de maritaca, apresentando resistência fenotípica por produção de ESBL e carbapenemase, simultaneamente, e ainda o gene *mcr-9*, de algum modo envolvido na resistência à colistina somam-se aos relatos de sua importância na agricultura e em saúde humana, e apontam para a importância deste tipo de estudo numa abordagem multifatorial voltada ao conceito de Saúde Única.

A avaliação das bactérias de traqueia e cloaca de pintos de 01 dia e frangos da Avicultura da UFRRJ permitiu observar várias espécies da Ordem Enterobacterales, com destaque para *Escherichia coli*. Esse achado corrobora a necessidade de atenção no manejo a fim de controlar e evitar disbiose nesses animais a ponto de terem colibacilose e serem descartados.

Dentro do ambiente de produção animal, a análise da detecção fenotípica de resistência é importante para a compreensão da pressão de seleção exercida pelo uso de antimicrobianos e aditivos zootécnicos na disseminação de genes de resistência para o ambiente, outros animais e para os humanos.

A detecção do gene *vanA* em *Proteus mirabilis* de cloaca de frango adulto e cloaca de pinto de 01 dia de idade, do gene *mecA* em SCN de traqueia de frango adulto, e os fatores de virulência relacionados à *Escherichia coli* em 05 cepas de APEC foram os pontos de destaque.

A interligação do manejo dentro do sistema de produção favorece a disseminação desses genes pelas excretas para o ambiente, pelo consumo direto da carne, pela reutilização de cama de maravalha, pelas falhas no manejo sanitário, entre outros. A detecção de gene de produção de carbapenemase na cama de maravalha antes do processo de compostagem e vazão sanitário, levanta questões sobre sua reutilização.

Um dos aspectos mais desafiadores do trabalho foi a padronização de protocolo para identificação de espécies do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* a partir de espécimes clínicos animais. A associação das técnicas moleculares MALDI-TOF e PCR multiplex permitiu a identificação segura das espécies pertencentes ao complexo *Acb*.

Outro ponto de destaque é a elevada resistência intrínseca presente nas espécies do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*, além da crescente resistência adquirida aos carbapenêmicos. Neste trabalho, foram detectadas cepas com 1 ou mais genes de resistência por produção de ESBL e carbapenemase oriundos principalmente de infecção urinária, mostrando cada vez mais um aumento de resistência bacteriana em medicina veterinária

Entre os vários pontos críticos observados quando se trabalha com identificação e análise de resistência em amostras oriundas de animais, cabe destacar a diversidade de espécies e a falta de protocolos específicos para identificação dessas espécies, uma vez que ainda são poucos os trabalhos relacionados aos animais, sendo a literatura embasada em amostras humanas. Estudos que preencham as lacunas de informações são importantes para o monitoramento, vigilância e a compreensão da interrelação Homem, Animal e Ambiente, dentro do contexto de Saúde Única.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AARESTRUP, Frank Moller et al. Glycopeptide susceptibility among Danish Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis isolates of animal and human origin and PCR identification of genes within the VanA cluster. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1938-1940, 1996.
- ADZITEY, Frederick; HUDA, Nurul; ALI, Gulam Rusul Rahmat. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. **3 Biotech**, v. 3, n. 2, p. 97-107, 2013.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - Nota Técnica nº 1/2013. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Brasília, DF, 2013
- AGHAPOUR, Zahra et al. Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae. **Infection and drug resistance**, v. 12, p. 965, 2019.
- AGHAPOUR, Zahra et al. Genes involved in colistin resistance of gram-negative isolates in the northwest of Iran. **Gene Reports**, v. 14, p. 81-86, 2019.
- AHMED, Mohamed O.; BAPTISTE, Keith E. Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 5, p. 590-606, 2018.
- ALBORNOZ, Luis Antonio Llanco; NAKANO, Viviane; AVILA-CAMPOS, Mario Julio. Clostridium perfringens e a enterite necrótica em frangos: principais fatores de virulência, genéticos e moleculares. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n. 3, p. 178-193, 2014.
- ALEXANDRINO, Samantha Leandro de Sousa Andrade et al. Microbiota intestinal e os fatores que influenciam na avicultura. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 6, p. e87963098-e87963098, 2020.
- ALÓS, Juan-Ignacio. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 33, n. 10, p. 692-699, 2015.
- ALTMAN, D.G. (1991). Practical statistics for medical research. New York: Chapman and Hall.
- ALVAREZ-VEGA, Marco et al. Multidrug-resistant Acinetobacter meningitis in neurosurgical patients with intraventricular catheters: assessment of different treatments—authors' response. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 3, p. 783-784, 2020.
- APOSTOLAKOS, Ilias et al. High-resolution characterisation of ESBL/pAmpC-producing Escherichia coli isolated from the broiler production pyramid. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.
- ARGUDÍN, M. Angeles et al. Genetic diversity among Staphylococcus aureus isolates showing oxacillin and/or ceftiofur resistance not linked to the presence of mec genes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 7, p. e00091-18, 2018.
- ARIAS, Mônica V. Bahr et al. Estudo da ocorrência de infecção hospitalar em cães e gatos em um centro cirúrgico veterinário universitário. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 771-779, 2013.
- ASAI, Nobuhiro et al. Pantoea dispersa bacteremia in an immunocompetent patient: a case report and review of the literature. **Journal of medical case reports**, v. 13, n. 1, p. 1-5, 2019.
- AYOUB MOUBARECK, Carole; HAMMOUDI HALAT, Dalal. Insights into Acinetobacter baumannii: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. **Antibiotics**, v. 9, n. 3, p. 119, 2020.
- AZEVEDO, Alessandra Lages Oliveira et al. Perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos de bacilos Gram-negativos fermentadores da glicose isolados de hemoculturas. **Rev. bras. anal. clin.**, p. 255-259, 2020.

BARBER, M. 1961. Methicillin resistant staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 14:385–393

BARBOSA, Nei André Arruda et al. Digestibilidade ileal de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com enzimas exógenas. **Comunicata Scientiae**, v. 5, n. 4, p. 361-369, 2014.

BARON, Sophie et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 6, p. 583-591, 2016.

BEZERRA, W. G. A. et al. Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. **Archivos de zootecnia**, v. 66, n. 254, p. 301-307, 2017.

BRESSLAU, Suzana; COORDENADORA, C. P. R. A. Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos. 2017.

BORDIER, Marion et al. Characteristics of one health surveillance systems: a systematic literature review. **Preventive veterinary medicine**, v. 181, p. 104560, 2020.

BOROWIAK, Maria et al. Development of a novel mcr-6 to mcr-9 multiplex PCR and assessment of mcr-1 to mcr-9 occurrence in colistin-resistant *Salmonella enterica* isolates from environment, feed, animals and food (2011–2018) in Germany. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 80, 2020.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. *Biomás*. 2022. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/biomas.html#:~:text=O%20Brasil%20%C3%A9%20formado%20por,de%20vegeta%C3%A7%C3%A3o%20e%20de%20fauna>. Acesso em: janeiro de 2022

BRASIL, Ministério da Pecuária, Agricultura e Abastecimento. Exportações do agronegócio batem recorde para setembro, com US\$ 10,1 bilhões. 2021 Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/agricultura-e-pecuaria/2021/10/exportacoes-do-agronegocio-batem-recorde-para-setembro-com-us-10-1-bilhoes> Acesso em: novembro de 2021

BRASIL, Ministério da Pecuária, Agricultura e Abastecimento. IN 45 de 22 de outubro de 2016. Proibir, em todo o território nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal, na forma desta Instrução Normativa. Disponível em: [https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22078290/do1-2016-11-30-instrucao-normativa-n-45-de-22-de-novembro-de-2016-22078259](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22078290/do1-2016-11-30-instrucao-normativa-n-45-de-22-de-novembro-de-2016-22078259) Acesso em: 22 de outubro de 2021

BRASIL, Ministério da Pecuária, Agricultura e Abastecimento. Portaria número 171, de 13 de dezembro de 2018 Disponível em: [http://www.in.gov.br/materia//asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/55878469/do12011219-portaria-n-171-de-13-de-dezembro-de-2018-55878239](http://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/55878469/do12011219-portaria-n-171-de-13-de-dezembro-de-2018-55878239) Acesso em: 22 de outubro de 2021

BUSH K, JACOBY GA, MEDEIROS AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother** 1995; 39: 1211-33

BUSS, Paulo M. et al. *Cadernos CRIS-Fiocruz: Saúde Global e Diplomacia da Saúde-Informe 17-Setembro/Outubro-2021*. 2021.

BUYUKCANGAZ, ESRA et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolated from animals and retail meat in North Dakota, United States. **Foodborne pathogens and disease**, v.10, n.7, p.608-617. 2013

CALISTRU, P. et al. The components of ‘one world–one health’ approach. **Transboundary and emerging diseases**, v. 60, p. 4-13, 2013.

CARROLL, Laura M. et al. Identification of novel mobilized colistin resistance gene mcr-9 in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate. **MBio**, v. 10, n. 3, p. e00853-19, 2019.

CELI, P.; VERLHAC, V.; PÉREZ C. E.; SCHMEISSER, J.&KLUENTER, A. M. 2019. Biomarcadores da funcionalidade gastrointestinal na nutrição e saúde animal. **Rev. Ciência e**

- Tecnologia de Ração Animal.** 250:9-31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.07.012>. Acesso em: 09 de janeiro de 2022
- CEPEA. Centro de Economia Aplicada em Estudos Aplicado. PIB do Agronegócio Brasileiro. 2021. Disponível EM: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx> Acesso em: | novembro de 2021
- CERON, K., CARVALHO, P. S., MÖCKLINGHOFF, L., & SANTANA, D. J Diurnal feeding behaviour of crab-eating raccoon upon a paradoxal frog, with a review of its diet. **Acta Biológica Colombiana**, v. 25, n. 2, p. 359-367, 2020.
- CHEN, TE-LI, LEE, YI-TZU, KUO, SHU-CHEN, YANG, SU-PEN, FUNG, CHANG-PHONE, LEE SHOU-DONG. Rapid identification of *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii* with a multiplex PCR assay. **Journal of Medical Microbiology**, 63, 1154–1159 DOI 10.1099/jmm.0.071712-0, 2014.
- CHEN, Lu et al. Comparison of clinical manifestations and antibiotic resistances among three genospecies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **PloS one**, v. 13, n. 2, p. e0191748, 2018.
- CHERAZARD, Regine et al. Antimicrobial resistant *Streptococcus pneumoniae*: prevalence, mechanisms, and clinical implications. *American journal of therapeutics*, v. 24, n. 3, p. e361-e369, 2017.
- CLARK, N. C., COOKSEY, R. C., HILL, B. C., SWENSON, J. M., & TENOVER, F. C Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from US hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 11, p. 2311-2317, 1993.
- COLLIGNON, Peter J.; MCEWEN, Scott A. One health—its importance in helping to better control antimicrobial resistance. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 4, n. 1, p. 22, 2019
- CORMICAN, Martin G.; MARSHALL, Steven A.; JONES, Ronald N. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 8, p. 1880-1884, 1996.
- COSGAYA C, MART-ALMIRALL M, VAN ASSCHE A et al. *Acinetobacter dijkschoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 66(10), 4105–4111 (2016).
- CHRISTOFOLI, Marcela et al. Microbiota intestinal benéfica e prejudicial na avicultura: Revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e43973667-e43973667, 2020.
- CUNHA, M.P.V. et al. Caracterização de APEC (avian pathogenic *Escherichia coli*) multivirulentas e multirresistentes. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 13, n.12. 2015.
- DAME-KOREVAAR, Anita et al. Transmission routes of ESBL/pAmpC producing bacteria in the broiler production pyramid, a literature review. **Preventive veterinary medicine**, v. 162, p. 136-150, 2019.
- DA SILVA DAVID, Maria Tereza Santos. O impacto do uso indiscriminado de antibióticos na pandemia do COVID-19. PANDEMIA: Caminhos para Aprendizagem [S. l.]: Pedro & João Editores, p. 165, 2021.)
- DA SILVEIRA ROSINA, Laís et al. OCORRÊNCIA DE *Salmonella* sp. NA CLOACA DE RÉPTEIS DE COMPANHIA. **Revista de Medicina Veterinária do UNIFESO**, v. 1, n. 01, 2021.
- DA SILVA, Elidiomar Ribeiro; COELHO, Luci Boa Nova. Sobre incursões da fauna silvestre a áreas urbanas durante a pandemia do novo coronavírus. **Revista A Bruxa**, v. 4, n. 2, p. 1-13, 2020.

DA SILVA, Raphael Paiva Paschoal; MANÇANO, Stella Maria Casas Novas; PICÃO, Renata Cristina. Cronologia da emergência global de carbapenemases em bacilos gram-negativos. **Revista Saber Digital**, v. 10, n. 2, p. 43-61, 2018.

DA SILVA, Gabriela Jorge. Resistência à colistina e sua disseminação: implicações em saúde pública. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, v. 10, n. 1, p. 47-52, 2018.

DA SILVA MC, DE SOUSA RM, PADILHA KG. Patient destination after discharge from intensive care units: wards or intermediate care units? **Rev Lat Am Enfermagem**. 2010

DE ANDRADE FRANCO, Marcos Bevilacqua; DE ANDRADE FRANCO, Jose Luiz; CUNHA, Andre A. Ecoturismo, Conservação da Natureza e Deep Ecology: uma Reflexão sobre o Turismo como Experiência de Ampliação da Consciência. **Environmental Science**, v. 10, n. 2, 2021.

DE CARVALHO, Juliana Jeanne Vieira et al. Bactérias multirresistentes e seus impactos na saúde pública: Uma responsabilidade social. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e58810616303-e58810616303, 2021.

DE FREITAS, Maria Helena Dantas; RODRIGUES, Márcio Nogueira. Osteomielite no membro pélvico de felino secundária à infecção bacteriana: Relato de caso. **PUBVET**, v. 14, p. 163, 2019.

DE MAGALHAES, Walkyria Biondi Lopes; CORDEIRO, Lara Celeste; COUTO, João Pedro Piccolo. ANTROPOMORFIZAÇÃO DOS ANIMAIS NAS REDES SOCIAIS E O TRÁFICO DE ANIMAIS SILVESTRES. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 3, p. 50-50, 2021.

DE MELO, Dayanne A. et al. Accuracy of PCR universal primer for methicillin-resistant Staphylococcus and comparison of different phenotypic screening assays. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 403-407, 2020.

DE OLIVEIRA FEITOSA, THIAGO JORDÃO C. E., DE SOUZA, R. G., LIMA, C. D. S., DE CARVALHO GURGEL, A., DE OLIVEIRA, L. L. G., ... & MINAFRA, C. S. Microbiota intestinal das aves de produção: revisão bibliográfica. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, p. e42952779-e42952779, 2020.

DE SANT'ANA, Carlos ER et al. Análise Microbiológica em Aves Silvestres: Patógenos Virais e Bacterianos. **Revista Processos Químicos**, v. 6, n. 12, p. 74-79, 2012.

DEVRIESE, L. A.; VAN DAMME, L. R.; FAMEREE, L. Methicillin (cloxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis cases. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 19, n. 7, p. 598-605, 1972.

DIALLO, Ousmane Oumou et al. Antibiotic resistance surveillance systems: A review. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2020.

DICKINSON, Vanessa M. et al. Nasal and cloacal bacteria in free-ranging desert tortoises from the western United States. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 2, p. 252-257, 2001.

DOS SANTOS, Márcia Alves; DE PAIVA, Isabel Cristina; DA SILVA ANDRADE, Erci Gaspar. Enterococcus resistente a vancomicina (vre): perfil geral. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 4, n. 8, p. 127-139, 2021.

D'SOUZA, Roshan et al. Phenotypic and genotypic characterization of Acinetobacter spp. panel strains: a cornerstone to facilitate antimicrobial development. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 559, 2019.

DUNLAP, Christopher A.; ROONEY, Alejandro P. Acinetobacter dijkshoorniae is a later heterotypic synonym of Acinetobacter lactucae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 131-132, 2018

DURMAZ, Riza et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Jpn J Infect Dis**, v. 62, n. 5, p. 372-7, 2009.



ELLIFF, C. 2020. O que o COVID-19 pode nos ensinar sobre conservação ambiental. [online]. Disponível em: [www.batepapocomnetuno.com](http://www.batepapocomnetuno.com). Acesso em: 23 de março de 2020.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária. Estatísticas. 2021 Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/> Acesso em: novembro de 2021

EWERS, Christa et al. OXA-23 and ISAbal–OXA-66 class D  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates from companion animals. **International journal of antimicrobial agents**, v. 49, n. 1, p. 37-44, 2017.

EWERS, Christa; JANßEN, Traute; WIELER, Lothar H. Avian pathogenic Escherichia coli (APEC). **Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift**, v. 116, n. 9-10, p. 381-395, 2003.

FALLAH, Fatemeh et al. Prevalence of blaNDM, blaPER, blaVEB, blaIMP, and blaVIM genes among *Acinetobacter baumannii* isolated from two hospitals of Tehran, Iran. **Scientifica**, v. 2014, 2014.

FERNÁNDEZ-CUENCA, Felipe et al. Attenuated virulence of a slow-growing pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* is associated with decreased expression of genes encoding the porins CarO and OprD-like. **International journal of antimicrobial agents**, v. 38, n. 6, p. 548-549, 2011.

FERNANDES, Raimunda Thyciana Vasconcelos et al. Aditivos fitogenicos na alimentacao de frangos de corte: óleos essenciais e especiarias. **PubVet**, v. 9, p. 502-557, 2015.

FERNANDES, J. C. T.; CARDOSO, M. R. I. Mamite ovina causada por Staphylococcus aureus. Primeira observação no Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 13, p. 71-74, 1985

FLEISS, Joseph L.; LEVIN, Bruce; PAIK, Myunghee Cho. Statistical methods for rates and proportions. **john wiley & sons**, 2013.

FLEMING, A. On the anticlotting action of culture of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. **British Journal of experimental pathology**, v.10, n.3, p.226. 1929

FOXMAN, Betsy et al. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. **Epidemiologic perspectives & innovations**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2005.

FRANTZ, Laurent AF et al. Animal domestication in the era of ancient genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 8, p. 449-460, 2020.

GAGGINI, Thais Schwarz et al. Endocardite vegetativa em leitões causada por streptococcus suis sorotipo 9. **Veterinária e Zootecnia**, v. 25, n. 1, p. 94-98, 2018.

GALLAGHER, Peter; BAKER, Stephen. Developing new therapeutic approaches for treating infections caused by multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*: *Acinetobacter baumannii* therapeutics. **Journal of Infection**, v. 81, n. 6, p. 857-861, 2020.

GALOSI, Livio et al. Health assessment of wild speckled dwarf tortoises, *Chersobius signatus*. **BMC veterinary research**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2021.

GARCIA, Jessica et al. Prevalence and predictors of bacteremia in dairy calves with diarrhea. **Journal of Dairy Science**, 2021.

GARCIA, Danitiele Almas; GOMES, Deriane Elias. A avicultura brasileira e os avanços nutricionais. **Revista Científica**, v. 1, n. 1, 2019.

GAY, Kathryn et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 3, p. 297-304, 2006.

GESER, N.; STEPHAN, R.; KORCZAK, B.M.; BEUTIN, L.; HÄCHLER, H. Molecular Identification of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase Genes from Enterobacteriaceae Isolated from Healthy Human Carriers in Switzerland. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1609–1612, 2012.

GHAIMA, K. K. Distribution of extended spectrum  $\beta$ -lactamase ( ESBL ) genes 71 among *Acinetobacter baumannii* isolated from burn infections. **MOJ Cell Sci Rep**, v. 5, n. 2, p. 42–46, 2018.

GHOSH, Antara et al. Abatement of arsenic-induced phytotoxic effects in rice seedlings by an arsenic-resistant *Pantoea dispersa* strain. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 17, p. 21633-21649, 2021.

GOERING, Richard V. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 866-875, 2010.

GOŁAWSKA, Olga et al. Complex bacterial flora of imported pet tortoises deceased during quarantine: Another zoonotic threat?. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 65, p. 154-159, 2019.

GOMES, Camila Moreira Barreto et al. Determinação de enterobactérias de mamíferos silvestres em criadouro conservacionista. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 2, p. 74-80, 2011.

GUO, San Jun; SHAN, R. E. N.; XIE, Yong En. Evaluation of the protective efficacy of a fused OmpK/Omp22 protein vaccine candidate against *Acinetobacter baumannii* infection in mice. **Biomedical and environment al sciences**, v. 31, n. 2, p. 155-158, 2018

HAAG, Andreas F.; FITZGERALD, J. Ross; PENADÉS, José R. *Staphylococcus aureus* in Animals. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 3, p. 7.3. 11, 2019.

HAENNI, Marisa; LUPO, Agnese; MADEC, Jean-Yves. Antimicrobial resistance in *Streptococcus* spp. **Microbiology spectrum**, v. 6, n. 2, p. 6.2. 09, 2018.

HAMOUDA, Ahmed et al. Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. **International journal of antimicrobial agents**, v. 38, n. 4, p. 314-318, 2011.

HARKINS, C.P., PICHON, B., DOUMITH, M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biol** 18, 130 2017

HASANI, Alka et al. Expression of Efflux Pumps, Porins and Genotypic Insight Into the Carbapenem Resistance in *Acinetobacter Baumannii*. 2021.

HEUER, Holger et al. Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 7, p. 2527-2530, 2011.

HIGGINS, Paul G. et al. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International journal of antimicrobial agents**, v. 35, n. 3, 2010.

HOLMSTROM, Therese et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: an underestimated risk at pet clinic. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 42, n. 1, p. e107420-e107420, 2020.

HUANG, Angela M. et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. **Clinical infectious diseases**, v. 57, n. 9, p. 1237-1245, 2013.

HUSSAIN, A. et al. Risk of Transmission of Antimicrobial Resistant *Escherichia coli* from Commercial Broiler and Free-Range Retail Chicken in India. **Frontiers in Microbiology**, v.8, 2017.

JIMÉNEZ-GUERRA, Gemma et al. Urinary tract infection by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: evolution of antimicrobial resistance and therapeutic alternatives. **Journal of medical microbiology**, v. 67, n. 6, p. 790-797, 2018.

IEVY, Samina et al. Molecular detection of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) for the first time in layer farms in Bangladesh and their antibiotic resistance patterns. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1021, 2020.

INEA. Instituto Estadual do Ambiente. Triagem e Reabilitação (CETAS e CRAS). 2022. Disponível em: <http://www.inea.rj.gov.br/biodiversidade-territorio/triagem-e-reabilitacao-cetas-e-cras/> Acesso em: janeiro de 2022

INEA. Resolução INEA N° 157 de 19 de outubro de 2018. Dispõe sobre as categorias de uso e manejo da fauna silvestre, nativa e exótica em cativeiro, no território do estado do Rio de Janeiro. Disponível: <http://www.inea.rj.gov.br/wp-content/uploads/2019/02/RESOLU%C3%87%C3%83O-INEA-N%C2%BA-157.pdf> Acesso: janeiro de 2022.

IOANNOU, Petros; MAVRIKAKI, Vasiliki; KOFTERIDIS, Diamantis P. Infective endocarditis by *Acinetobacter* species: A systematic review. **Journal of Chemotherapy**, v. 33, n. 4, p. 203-215, 2021

IOVLEVA, Alina et al. The ecology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the developed world. **Journal of travel medicine**, v. 24, n. suppl\_1, p. S44-S51, 2017.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; LIMA, E. A.; OKABAYASHI, S. Antimicrobianos: Usos preventivos e curativos na avicultura. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. Farmacologia aplicada à avicultura: boas práticas no manejo de medicamentos. São Paulo: Editora Roca, 2005. cap. 8, p. 115-147.

JIANG, Lingmin et al. Potential of *Pantoea dispersa* as an effective biocontrol agent for black rot in sweet potato. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y. M.; JOHNSON, S. J.; NOLAN, L. K. Complete DNA Sequence, Comparative Genomics, and Prevalence of an IncHI2 Plasmid Occurring among Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3929–3933, 2006.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, S. J.; ROSENBERGER, S. C.; NOLAN, L. K. Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3987-3996, 2008.

JOHNSON, J. R. & STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* 9 strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis.** v. 181, p. 261-272. 2000

JUNQUEIRA, Otto Mack et al. Uso de aditivos em rações para suínos nas fases de creche, crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 2394-2400, 2009.

KACZOREK, E. et al. Phenotypic and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus* spp. isolated from cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6442-6453, 2017.

KANAMORI, Hajime et al. Next-generation sequencing and comparative analysis of sequential outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* at a large academic burn center. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1249-1257, 2015.

KAPOOR, Garima; SAIGAL, Saurabh; ELONGAVAN, Ashok. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300, 2017.

KEMPF, Isabelle; JOUY, Eric; CHAUVIN, Claire. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 6, p. 598-606, 2016.

KIMURA, Yui et al. Species distribution, virulence factors and antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. isolates from dogs and cats: a preliminary study. **Microbiology and immunology**, v. 62, n. 7, p. 462-466, 2018.

- KISLAK, J. W. Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. **Am. J. Med. Sci.**, v. 250, p. 261-268, 1965.
- KOPOTSA, Katlego; OSEI SEKYERE, John; MBELLE, Nontombi Marylucy. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1457, n. 1, p. 61-91, 2019.
- KUZI, S. et al. Multi-drug-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex infection outbreak in dogs and cats in a veterinary hospital. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 11, p. 617-625, 2016
- LASCOLA, Bernard et al. Sequencing of the rpoB gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 3, p. 827-832, 2006.
- LEE, Terence et al. Antimicrobial-resistant CC17 Enterococcus faecium: The past, the present and the future. **Journal of Global Antimicrobial Resistance** ,[S. 1.], 2018.
- LEE, Chang-Ro et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 55, 2017.
- LIM, Daniel; STRYNADKA, Natalie CJ. Structural basis for the  $\beta$  lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature structural biology**, v. 9, n. 11, p. 870-876, 2002.
- LIMA, Débora Costa Viegas de et al. Microbiology of rectal and otologic swabs of wild carnivores from the Zoo of the Parque Estadual de Dois Irmãos, Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 159-164, 2012.
- LITAKE, G. M. et al. Phenotypic ESBL Detection in *Acinetobacter baumannii*: A Real Challenge. **American Journal of Infectious Diseases Original**, 2015.
- LIU, Yi-Yun et al. 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.
- LUO, Qixia; WANG, Yuan; XIAO, Yonghong. Prevalence and transmission of mobilized colistin resistance (*mcr*) gene in bacteria common to animals and humans. **Biosafety and Health**, v. 2, n. 02, p. 71-78, 2020.
- MABONI, Grazieli et al. Antimicrobial resistance patterns of *Acinetobacter* spp. of animal origin reveal high rate of multidrug resistance. **Veterinary Microbiology**, v. 245, p. 108702, 2020
- MACKENZIE, John S.; JEGGO, Martyn. The One Health approach—Why is it so important?. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 4, n. 2, p. 88, 2019.
- MAGALHÃES, Vanda D. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia-uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.
- MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.
- MAHICH, Swati et al. *Acinetobacter* sepsis among out-born neonates admitted to neonatal unit in pediatric emergency of a tertiary care hospital in North India. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 88, n. 2, p. 127-133, 2021.
- MAIORKI, Karolyna Mattes; FUKUMOTO, Nelson Massaru. Colibacilose Aviária: Revisão de Literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 10, p. 99696-99707, 2021.
- MALOV, V. A.; MALEYEV, V. V. Pets in modern society: hidden threats. **Terapevticheskii arkhiv**, v. 90, n. 11, p. 105-111, 2018.
- MARTAK, Daniel et al. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and whole-genome-sequencing-based typing confirms the accuracy of pulsed-field gel electrophoresis for the

investigation of local *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks. **Journal of Hospital Infection**, v. 105, n. 4, p. 643-647, 2020.

McMULLIN, P. Produção avícola sem antibióticos: riscos potenciais de contaminação cruzada e detecção de resíduos. In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Santos. Anais... Santos: Facta, 2004. v. 2, p. 219-226.

MENIN, Álvaro. Saúde única: uma reflexão. *Encuentro de Salud Animal*, v. 4, 2018.

MENIN, Álvaro et al. Diagnóstico de infecção urinária em fêmeas suínas produtivas em granjas comerciais no sul do Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 197-206, 2008.

MINARINI, Luciene AR et al. Prevalence of community-occurring extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Current microbiology**, v. 54, n. 5, p. 335-341, 2007.

MONTEIRO, Jussimara et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 906-909, 2012.

MOREIRA, J. M. A. R., MENEZES, I. G., LUNA, I. S. R., NOGUEIRA, B. S., SOUSA, A. T. H. I. D., CÂNDIDO, S. L., ... & NAKAZATO, L. Vancomycin susceptibility profiles of *Staphylococcus* spp. isolates from domestic and wild animals. **Ciência Rural**, v. 50, 2020.

MORENO, Gilberti et al. Resistência a drogas em enterobactérias isoladas de animais silvestres. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 32, n. 1-2, p. 57-61, 1972.

MUNIER, Anne-Lise et al. Incidence, risk factors and outcome of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections during an outbreak in a burn unit. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 79, p. 179-184, 2019.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. Washington, D.C.: **National Academy Press**, 2001. 381p.

National Research Council, 1984. Nutrient Requirements of Poultry. 8th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC

NEOH, Hui-min et al. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 74, p. 103935, 2019.

NEWSOM, S. W. B. Ogston's coccus. *Journal of hospital Infection*, v. 70, n. 4, p. 369-372, 2008.

NOCERA, Francesca Paola; ATTILI, Anna-Rita; DE MARTINO, Luisa. *Acinetobacter baumannii*: Its clinical significance in Human and Veterinary Medicine. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 127, 2021.

NOWAK, Jennifer et al. High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 12, p. 3277-3282, 2017.

NOVOVIĆ, Katarina et al. *Acinetobacter* spp. porin Omp33-36: Classification and transcriptional response to carbapenems and host cells. *PloS one*, v. 13, n. 8, p. e0201608, 2018

NUNES, O. C., OLIVEIRA, E. D., LABORDA, S. S., HOHLENWERGER, J. C., NETO, M. M., & FRANKE, C. R Isolamento e identificação de cepas de *Salmonella* spp de jabutis-piranga oriundos do tráfico de animais silvestres. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 168-173, 2010.

OMT- Organização Mundial de Turismo. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2021/08/1761632> Acesso em: 21 de dezembro de 2021

O'NEILL, J. Antimicrobials in Agriculture and the Environment: Reducing Unnecessary Use and Waste. The Review on Antimicrobial Resistance. 2015. Disponível em: <https://amr-review.org/sites/default/files/Antimicrobials%20in%20agriculture%20and%20the%20environment%20-%20Reducing%20unnecessary%20use%20and%20waste.pdf>. Acesso em: 23 outubro de 2021.

ÖZDEMİR, Rahime; TUNCER, Yasin. Detection of antibiotic resistance profiles and aminoglycoside-modifying enzyme (AME) genes in high-level aminoglycoside-resistant (HLAR) *enterococci* isolated from raw milk and traditional cheeses in Turkey. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 3, p. 1703-1712, 2020.

PANDITRAO, Mridul; PANDITRAO, Minnu. *Pantoea dispersa*: is it the next emerging “monster” in our intensive care units? A case report and review of literature. **Anesthesia, Essays and Researches**, v. 12, n. 4, p. 963, 2018.

PENESYAN, Anahit; GILLINGS, Michael; PAULSEN, Ian T. Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5286-5298, 2015.

PEREIRA, David Guilherme et al. Endocardite por *Staphylococcus* sp. em bovino e ovino causando osteoartrite e sepsis como desfechos incomuns. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n. 1, p. 303, 2018.

PIFFARETTI, Jean-Claude. Antibiotic resistance: the emergence of plasmid-mediated colistin resistance enhances the need of a proactive one-health approach. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 5, 2016.

PIMENTA, Ramon Loureiro et al. Characterization of *Staphylococcus* spp. isolates and  $\beta$ -lactam resistance in broiler chicken production. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, n. 1, p. e00720-e00720, 2021.

PIMENTA GUIMARÃES, Kátia de Oliveira et al. Infecção por *Acinetobacter* em um cão: relato de um caso. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, 2013.

PIZO, M.A. Padrões e causas de variação no tamanho de bando de psitacídeos neotropicais. In: GALETTI, M.E.; PIZO, M.A. Ecologia e conservação de psitacídeos no Brasil. Belo Horizonte, MG: Melopsittacus Publicações Científicas, p.49-62.2002

POIREL, Laurent et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 70, n. 1, p. 119-123, 2011.

PREMATUNGE C, MACDOUGALL C, JOHNSTONE J, ADOMAKO K, LAM F, ROBERTSON J, et al. Resultados de Bacteremia VRE e VSE na Era da Terapia Eficaz de VRE: Uma Revisão Sistemática e Meta-análise. **Epidemiol do Hospital de Controle de Infecções**. V.37, n.1, p.26–35, 2016

PROCOP, Gary W. et al. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 2018.

PROJAHN, Michaela et al. Reviewing interventions against Enterobacteriaceae in broiler processing: using old techniques for meeting the new challenges of ESBL *E. coli*? **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

OLDER, Caitlin E. et al. Characterization of cutaneous bacterial microbiota from superficial pyoderma forms in atopic dogs. **Pathogens**, v. 9, n. 8, p. 638, 2020.

OVERGAAUW, Paul AM et al. A one health perspective on the human–companion animal relationship with emphasis on zoonotic aspects. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 11, p. 3789, 2020.

OVIANO, Marina; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, Belén. MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed.)**, v. 39, n. 4, p. 192-200, 2021.

RAFEI, Rayane et al. Update on the epidemiological typing methods for *Acinetobacter baumannii*. **Future Microbiology**, v. 14, n. 12, p. 1065-1080, 2019.

RODRÍGUEZ, C. H.; NASTRO, M.; FAMIGLIETTI, A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. **Revista Argentina de Microbiología**. 50(3):327-333, 2018.

ROSTAGNO, Horacio Santiago et al. Tabelas Brasileiras. para Aves e SUÍDOS. 2005.

RUPP, Mark E.; FEY, Paul D. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. **Drugs**, v. 63, n. 4, p. 353-365, 2003.

RUSSO, Thomas A. et al. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. **Infection and immunity**, v. 78, n. 9, p. 3993-4000, 2010.

SADER, H. S. O uso de antimicrobianos promotores de crescimento contribui para a resistência a antibióticos? Anais... **Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**, Campinas, Brasil, p.211-217. 2004.

SHAHID, M. Citrobacter spp. Simultaneously Harboring bla<sub>CTX-M</sub>, bla<sub>TEM</sub>, bla<sub>SHV</sub>, bla<sub>ampC</sub>, and Insertion Sequences IS26 and orf513: an Evolutionary Phenomenon of Recent Concern for Antibiotic Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1833–1838, 2010.

SALIU, Eva-Maria; VAHJEN, Wilfried; ZENTEK, Jürgen. Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in poultry. **Animal Health Research Reviews**, v. 18, n. 1, p. 46-57, 2017.

SANZ, Susana et al. Airborne Dissemination of Bacteria (Enterococci, Staphylococci and Enterobacteriaceae) in a Modern Broiler Farm and Its Environment. **Animals**, v. 11, n. 6, p. 1783, 2021.

SEIBERT, L.M. Social behavior of psittacine birds. In: LuescherAU. Manual of Parrot Behaviour. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. p 43-47.

SELVAKUMAR, G. et al. Characterization of a cold-tolerant plant growth-promoting bacterium *Pantoea dispersa* isolated from a sub-alpine soil in the North Western Indian Himalayas. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 955-960, 2008.

asaiSILVA-MARIANO, Luísa Cerqueira et al. SEPTICEMIA NEONATAL EM CÃO CAUSADA POR *Streptococcus canis*. **Science and Animal Health**, v. 9, n. 1, p. 76-87, 2021.

SMANI, Younes; PACHÓN, Jerónimo. Loss of the OprD homologue protein in *Acinetobacter baumannii*: impact on carbapenem susceptibility. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 677-677, 2013.

SILVEIRA, Débora R. et al. *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* isoladas de animais silvestres em um centro de reabilitação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1838-1843, 2018.

SMET, Annemieke et al. *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. Pt\_12, p. 4007-4015, 2014.

SPINALI, Sébastien et al. Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: do we need guidance for data interpretation? **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 3, p. 760-765, 2015.

SUBEDI, Manita et al. Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. **BMC Veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2018.

REBELO, Ana Rita et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. **Eurosurveillance**, v. 23, n. 6, p. 17-00672, 2018.

REIS, Túlio Leite; VIEITES, Flávio Medeiros. Antibiótico, prebiótico, probiótico e simbiótico em rações de frangos de corte egalinhas poedeiras. **Ciênc. Anim. Bras**, v. 29, p. 133-147, 2019.

RIBEIRO VMF & MEDEIROS LS. Animais Silvestres: Convivências e Riscos. 1ª edição. Rio Branco. Acre. Editora da Universidade Federal do Acre – Edufacé. 2017importante

RIBOT EM, GAUTOM R, CAMERON DN, HUNTER SB, SWAMINATHAN B, BARRETTJ. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathog Dis**. 2006

ROSATO, Adriana E. et al. mecA-bla<sub>Z</sub> corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1460-1463, 2003.



SELVAKUMAR, G. et al. Characterization of a cold-tolerant plant growth-promoting bacterium *Pantoea dispersa* 1A isolated from a sub-alpine soil in the North Western Indian Himalayas. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 955-960, 2008.

SILVA-MARIANO, Luísa Cerqueira et al. SEPTICEMIA NEONATAL EM CÃO CAUSADA POR *Streptococcus canis*. **Science And Animal Health**, v. 9, n. 1, p. 76-87, 2021.

SOUSA, A. T. H. I. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de animais domésticos e silvestres. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, p. 584-593, 2019.

SPINELLI, Taciana P. et al. Normal aerobic bacterial conjunctival flora in the Crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*) and Coati (*Nasua nasua*) housed in captivity in pernambuco and paraíba (Northeast, Brazil). **Veterinary ophthalmology**, v. 13, p. 134-136, 2010.

SUBEDI, Manita et al. Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2018.

SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 2, p. 625-30, 1996

TAFFAREL, Andréia Cristiane. Aspectos do papel do médico veterinário na saúde pública, o ensino curricular e o conceito de One Health: revisão de literatura e considerações. 2015.

TAKEBAYASHI, Yuiko et al. Variability in carbapenemase activity of intrinsic OxaAb (OXA-51-like)  $\beta$ -lactamase enzymes in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 3, p. 587-595, 2021.

TAYABALI, Azam F. et al. Comparison of the virulence potential of *Acinetobacter* strains from clinical and environmental sources. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e37024, 2012.

TENOVER, Fred C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

THERIAULT, Nicolette; TILLOTSON, Glenn; SANDROCK, Christian E. Global travel and Gram-negative bacterial resistance; implications on clinical management. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 19, n. 2, p. 181-196, 2021.

THOMRONGSUWANNAKIJ, Thotsapol et al. A comparison of virulence genes, antimicrobial resistance profiles and genetic diversity of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolates from broilers and broiler breeders in Thailand and Australia. **Avian Pathology**, v. 49, n. 5, p. 457-466, 2020

TIWARI, Ruchi et al. COVID-19: animals, veterinary and zoonotic links. **Veterinary Quarterly**, v. 40, n. 1, p. 169-182, 2020.

TRABULSI, L.R & ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TUCUNDUVA, P., RODRIGUES, M. B., DE CARVALHO, R. B. J., & BERTO, B. P. *EIMERIA psittacariae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeiriidae) from white-eyed parakeets *Psittacara leucophthalmus* (Müller, 1776) (Psittaciformes: Psittacidae) kept for rehabilitation and reintroduction in the Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Southeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 4459, n. 1, p. 164-170, 2018.

TURLEJ, AGATA; HRYNIEWICZ, WALERIA; EMPEL, Joanna. *Staphylococcal* cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview. **Polish journal of microbiology**, v. 60, n. 2, p. 95, 2011.

TURNER, Nicholas A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203-218, 2019.



TURTON, Jane F. et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2974-2976, 2006

TUTTOBENE, M. R. et al. Light modulates important pathogenic determinants and virulence in ESKAPE pathogens *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 203, n. 5, p. e00566-20, 2020.

VAISSAIRE, Josée et al. Septicémie à pneumocoque (*Streptococcus pneumoniae*) chez le veau. **Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France**, v. 141, n. 2, p. 173-180, 1988.

VALENTIM, Jean Kaique et al. Implicações sobre o uso de promotores de crescimento na dieta de frangos de corte. 2019.

VAN DER KOLK, Johannes Hermanus et al. *Acinetobacter* in veterinary medicine, with an emphasis on *Acinetobacter baumannii*. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 16, p. 59-71, 2019. VIEITES, Flávio Medeiros et al. Aditivos zootécnicos na alimentação de suínos–Revisão de Literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 45880-45895, 2020.

VIJAYAKUMAR, Saranya; BISWAS, Indranil; VEERARAGHAVAN, Balaji. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. **Future science OA**, v. 5, n. 7, p. FSO395, 2019.

WANG, Jianfeng et al. Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104882, 2014.

WALKER, Clay B. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. **Periodontology 2000**, v. 10, n. 1, p. 79-88, 1996.

WANG, Teng-Ho et al. Prevalence of different carbapenemase genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* blood isolates in Taiwan. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2018

WANG, Chengcheng et al. Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 508-516, 2020.

WARETH, Gamal; NEUBAUER, Heinrich; SPRAGUE, Lisa D. *Acinetobacter baumannii*—a neglected pathogen in veterinary and environmental health in Germany. **Veterinary research communications**, v. 43, n. 1, p. 1-6, 2019.

WATKINS, Richard R.; HOLUBAR, Marisa; DAVID, Michael Z. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to newer antimicrobial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 12, p. e01216-19, 2019.

WEBER, M. N., MOSENA, A. C. S., DA SILVA, M. S., CANOVA, R., DE LORENZO, C., OLEGÁRIO, J. C., ... & CANAL, C. W Virome of crab-eating (*Cercyon thous*) and pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*) from southern Brazil and Uruguay. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, p. 104421, 2020.

WEINBERG, S. E. et al. Control and management of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: A review of the evidence and proposal of novel approaches. **Infection prevention in practice**, v. 2, n. 3, p. 100077, 2020.

WEITZMAN, Chava L.; SANDMEIER, Franziska C.; TRACY, C. Richard. Host species, pathogens and disease associated with divergent nasal microbial communities in tortoises. **Royal Society open science**, v. 5, n. 10, p. 181068, 2018.

WONG, Darren et al. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 409-447, 2017.

WOODFORD, Neil et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International journal of antimicrobial agents**, v. 27, n. 4, p. 351-353, 2006.

World Health Organization (WHO) Disponível em: [www.who.int/hpvcenter/statiscs/dynamic/ico/contry.pdf/bra/pdf](http://www.who.int/hpvcenter/statiscs/dynamic/ico/contry.pdf/bra/pdf). Acesso em 01.02.2022.

YADAV, Sudhir et al. Cecal microbiome profile of Hawaiian feral chickens and pasture-raised broiler (commercial) chickens determined using 16S rRNA amplicon sequencing. **Poultry Science**, v. 100, n. 7, p. 101181, 2021.

YEATES, C. et al. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. **Biological procedures online**, v. 1, n. 1, p. 40-47, 1998.

ZHANG, K.; SPARLING, J.; CHOW, B.L.; ELSAYED, S.; HUSSAIN, Z.; CHURCH, D.L.; GREGSON, D.B.; LOUIE, T.; CONLY, J.M. New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative *Staphylococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n 11, p. 4947–4955, 2004

ZIMBLER, D. L. Stress Response and Virulence Functions of the *Acinetobacter baumannii* NfuA Fe-S Scaffold Protein. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 11, p. 2884–2893, 2012.

**ANEXO 1- Primers utilizados na caracterização das espécies bacterianas.**

<b>Gene/ Produto de PCR</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Programa</b>
<i>16S rRNA</i> (756 pb)	AACTCTGTTATTAGGGAAGAACA CCACCTTCCTCCGGTTTGTCCACC	94 °C por 5 min; 30 ciclos (94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C for 1 min) e uma extensão final por 72 °C por 10 min.
27F/1512R (1500 pb)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ACGGCTACCTTGTTACGACT	94 °C por 5 min; 30 ciclos (94 °C por 1 min, 65 °C por 1 min e 72 °C for 1 min) e uma extensão final por 72 °C por 5 min.
<i>recA</i> (425 pb)	CCTGAATCTTCTGGTAAAAC GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC	94 °C por 5 min; 35 ciclos de (94 °C por 1 min, 58 °C por 30 seg e 72 °C por 30 seg) e uma extensão final de 72 °C por 10 min.
<i>gyrB</i> (294 pb)	CACGCCGTAAGAGTGCATTA AACGGAGCTTGTTCAGGGTTA	
<i>ITS region</i> (208 pb)	CATTATCACGGTAATTAGTG AGAGCACTGTGCACTTAAG	
<i>ITS region</i> (150 pb)	CTCAAGAGTTTAGATTAAGCAAT GTCCGTGCGATTCTTCATCG	
Ac696F (+2916) Ac1093R (+3267) Ac1055F (+3263)	TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG CMACACCYTTGTTMCCRTGA GTGATAARATGGCBGGTCGT	
Ac1598R (+3773)	CGBGCRTGCATYTTGTCRT	Temperatura de Anelamento 60°C.
AcintLBF (-361) AcintLBR (+29) AcintBCF (+4048)	GAAGARCTTAAGAMDAARCTTG CGTTTCTTTTCGGTATATGAGT GTTCTTTAGGTATCAACATTGAA	Temperatura de Anelamento 58°C.
AcintBCR (+4207)	GACGCAAGACCAATACGRAT	Temperatura de Anelamento 60°C.
		Temperatura de Anelamento 59°C.

## ANEXO 2- Primers utilizados na caracterização da resistência antimicrobiana.

Gene/ Produto de PCR	Sequência (5'-3')	Programa
<i>mecA</i> (574 pb)	ACGTTACAAGATATGAAGGAA ACATTAATAGCCATCATC	95 °C por 5 min (94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min) x 30 e uma extensão final por 72 °C por 10 min.
<i>bla<sub>Z</sub></i> (861 pb)	TACAACCTGTAATATCGGAGGG CATTACACTCTTGGCGGTTTC	94°C por 5 min; (94°C por 30 seg; 58°C por 30 seg; 72°C por 30 seg) x 35 e uma extensão final por 72°C por 5 min.
<i>vanA</i> (649 pb)	CATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATA CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	94 °C por 5 min; 30 ciclos (94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min e 72 °C for 1 min) e uma extensão final por 72 °C por 5 min.
<i>vanB</i> (432 pb)	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA	
<i>bla<sub>TEM</sub></i> (831 pb)	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	94 °C por 5 min; 40 ciclos (94 °C Por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C for 1 min) e uma extensão final por 72 °C por 5 min.
<i>bla<sub>CTX</sub></i> (862 pb)	AAAAATCACTGCGCCAGTTC CCGTGCGGTGACGATTTTAGCC	
<i>bla<sub>SHV</sub></i> (831 pb)	TTTATCGGCCCTCACTCAAGG TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	94 °C por 3 min; 32 ciclos (94 °C por 30 seg, 56 °C por 30 seg e 72 °C for 1 min) e uma extensão final por 72 °C por 10 min.
<i>bla<sub>OXA-23</sub></i> (501 pb)	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCCAT	
<i>bla<sub>OXA-51</sub></i> (353 pb)	TAATGCTTTGATCGGCCTTG TGGATTGCACTTCATCTTGG	94°C por 10 min; 30 ciclos de (94 °C por 25 seg, 52 °C por 45 seg e 72 °C por 50 seg) e uma extensão final de 72 °C por 6 min.
<i>bla<sub>OXA-143</sub></i> (196 pb)	TGGCACTTTTCAGCAGTTCTT TAATCTTGAGGGGGCCAACC	
<i>bla<sub>OXA-24</sub></i> (246 pb)	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	
<i>bla<sub>OXA-58</sub></i> (590 pb)	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC	
<i>bla<sub>IMP</sub></i> (587 pb)	GAAGGCGTTTATGTTTCATAC GTAAGTTTCAAGAGTGATGC	94°C por 5 min; 36 ciclos (94°C por 1 min, 52 a 56°C por 1 min e 72°C for 1 min) e uma extensão final por 72°C por 5 min.
<i>bla<sub>VIM</sub></i> (390 pb)	GATGGTGTGGTTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	
<i>bla<sub>KPC</sub></i> (785 pb)	TCGCTAACTCGAAACAGG TFACTGCCCGTTGACGCCAATCC	94°C por 5 min; 30 ciclos (94°C por 45 seg, 60°C por 45 seg e 72°C for 45 seg) e uma extensão final por 72°C por 5 min.
<i>bla<sub>NDM</sub></i> (345 pb)	CGAAGCTGAGCACCGCATTA ATCTTGCCCTGATGCGCGTG	
<i>bla<sub>OXA48</sub></i> (177 pb)	TGTTTTTGGTGGCATCGAT GTAAMRATGCTTGGTTCGC	

<i>mcr-1</i> (320 pb)	AGTCCGTTTGTTCCTTGTTGGC AGATCCCTTGGTCTCGGCTTG	
<i>mcr-2</i> (715 pb)	CAAGTGTGTTGGTTCGCAGTT TCTAGCCCGACAAGCATAACC	
<i>mcr-3</i> (929 pb)	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG AATGGAGATCCCCGTTTTT	
<i>mcr-4</i> (1116 pb)	TCACTTTCATCACTGCGTTG TTGGTCCATGACTACCAATG	94°C por 15 min; 25 ciclos de (94°C por 30 seg, 58°C por 1:30 min e 72°C por 60 seg) e uma extensão final de 72°C por 10 min.
<i>mcr-5</i> (1644 pb)	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG	
<i>mcr-6</i> (252 pb)	GTCCGGTCAATCCCTATCTGT ATCACGGGATTGACATAGCTAC	
<i>mcr-7</i> (551 pb)	TGCTCAAGCCCTTCTTTTCGT TTCATCTGCGCCACCTCGT	
<i>mcr-8</i> (856 pb)	AACCGCCAGAGCACAGAATT TTCCCCAGCGATTCTCCAT	
<i>mcr-9</i> (1011 pb)	GTATCCTTCCCTGCCATCCTC CTTCCATAACAGCGAGACAC	

**ANEXO 3- Primers utilizados na caracterização dos fatores de virulência.**

<b>Gene/ Produto de PCR</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Programa</b>
<i>iroN</i> (553 pb)	AGTCCGTTTGTCTTTGTGGC GTTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	94°C por 2 min; 25 ciclos de (94°C por 30 seg, 63°C por 30 seg e 68°C por 3 min) e uma extensão final de 72°C por 10 min.
<i>ompT</i> (496 pb)	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	
<i>hlyF</i> (450 pb)	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	
<i>Iss</i> (323 pb)	CAGCAACCCGAACCACTTGATG AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	
<i>iutA</i> (302 pb)	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	