



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

Leonardo da Silveira Pessi

**ESTUDO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Escherichia coli* E SUA
RELAÇÃO COM BACTERIÓFAGOS A PARTIR DE ESGOTO SANITÁRIO
HUMANO**

Florianópolis - SC
2024

Leonardo da Silveira Pessi

**ESTUDO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Escherichia coli* E SUA
RELAÇÃO COM BACTERÍOFAGOS A PARTIR DE ESGOTO SANITÁRIO
HUMANO**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em farmácia.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Gislaine Fongaro
Coorientador: Me. Rafael Dorighello Cadamuro

Florianópolis - SC

2024

Pessi, Leonardo da Silveria

ESTUDO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Escherichia coli* E SUA RELAÇÃO COM BACTERÍOFAGOS A PARTIR DE ESGOTO SANITÁRIO HUMANO / Leonardo da Silveria Pessi ; orientadora, Gislaine Fongaro, coorientador, Rafael Dorighello Cadamuro, 2024.

44 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Escherichia coli*. 3. Genes de resistência antimicrobiana. 4. Bacteriófagos. 5. Genes de Virulência. I. Fongaro, Gislaine. II. Cadamuro, Rafael Dorighello. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Leonardo da Silveira Pessi

**ESTUDO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Escherichia coli* E SUA
RELAÇÃO COM BACTERÍOFAGOS A PARTIR DE ESGOTO SANITÁRIO
HUMANO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Farmácia e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Auditório Profº Lúcio Botelho, 02 de Dezembro de 2024.



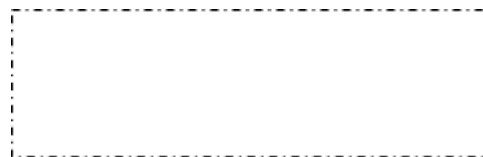
Coordenação do Curso

Banca examinadora



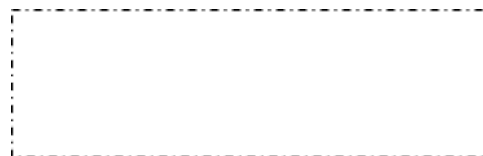
Profª Drª Gislaine Fongaro

Universidade Federal de Santa Catarina



Profº Drº Thiago Caon

Universidade Federal de Santa Catarina



Ma. Giulia Von Tönnemann Pilati

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2024.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer este trabalho à professora e orientadora Gislaine, a quem sou muito grato pela excelente orientação e que me abriu as portas para o laboratório, onde pude evoluir muito como pessoa e pesquisador.

Agradeço também às professoras Ariadne e Izabella, que além de serem excelentes professoras, estavam sempre por perto e dispostas a tirarem qualquer dúvida, mesmo que simples mas que foram importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Rafael pela coorientação e por quem tenho um imenso carinho, e que mesmo longe neste momento em função de seu doutorado, sei que nossa relação irá continuar da mesma maneira quando retornar.

Meu agradecimento especial à Beatriz, que esteve comigo desde o início desse trabalho e que me ajudou em todas as etapas, além de ser uma excelente companhia para conversas que muitas vezes aliviaram a tensão, facilitando o trabalho e interpretação de resultados.

Aos membros do LVA, meu muito obrigado por todos os momentos nesses quase dois anos, vou levar todos vocês no coração e com muito carinho pelo resto de minha vida, são pessoas que além de levarem o nome do LVA adiante, pode-se contar a qualquer momento para tirar dúvidas ou mesmo para conversar, agradeço também por poder compartilhar muitas experiências do lado de fora da universidade junto deles, que sempre me trataram muito bem independente do lugar ou situação.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a resistência antimicrobiana de *Escherichia coli*, através de métodos fenotípicos como a técnica de disco-difusão e por métodos genotípicos analisando dados de sequenciamento de material genético, além disso se faz necessário avaliar a presença de genes de virulência e a presença de plasmídeos. As resistências que por vezes são transmitidas por bacteriófagos levantou-se a hipótese de que pode-se estabelecer uma correlação entre esses dois organismos nas amostras analisadas. Como principais resultados desse estudo, foi possível fazer o isolamento por cultivo em ágar seletivo e diferencial e a identificação de 15 cepas de *Escherichia coli* utilizando a técnica de espectrometria, além disso, todas as cepas demonstraram resistência fenotípica a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Na análise do sequenciamento foi possível identificar a presença de 62 genes, sendo que 27 tiveram alguma relação com os antimicrobianos selecionados. Por fim, o sequenciamento também nos proporcionou a identificação de bacteriófagos que podem estar relacionados com alguns dos genes presentes nos isolados.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; Virulência; Plasmídeos; Bacteriófagos.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* using phenotypic methods, such as the disk-diffusion technique, and genotypic methods by analyzing genetic material sequencing data. Additionally, it is necessary to assess the presence of virulence genes and plasmids. Considering that resistance is sometimes transmitted by bacteriophages, the hypothesis was raised that a correlation between these two organisms could be established in the analyzed samples. As main results of this study, it was possible to isolate by cultivation on selective and differential agar and to identify 15 strains of *Escherichia coli* using the spectrometry technique, in addition, all strains demonstrated phenotypic resistance to at least one of the antimicrobials tested. In the analysis of the sequencing, it was possible to identify the presence of 62 genes, 27 of which had some relationship with the selected antimicrobials. Finally, the sequencing also provided us with the identification of bacteriophages that may be related to some of the genes present in the isolates.

Keywords: *Escherichia coli*; Virulence; Plasmids; Bacteriophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processos canônicos da transmissão horizontal de genes	19
Figura 2 - Perfil de resistência fenotípica de isolados de <i>Escherichia coli</i> frente aos antimicrobianos selecionados para a o trabalho	31
Figura 3 - Esquema representando os genes de resistência de interesse agrupados de acordo ao grupo que pertencem	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Amostras de águas residuais recebidas da SEMASA com o objetivo de isolar enterobactérias com características fenotípicas de <i>Escherichia coli</i>	24
Quadro 2 – Amostras identificadas como <i>Escherichia coli</i> através do MALDI-TOF	30
Quadro 3 - Lista de genes de resistência bacteriana	34
Quadro 4 - Lista de genes de virulência	35
Quadro 5 - Lista genes presentes em plasmídeos	37
Quadro 6 - Análise da presença de bacteriófagos a partir de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de águas residuárias	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BrCast - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

CASAN - Companhia Catarinense De Água e Saneamento

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CRISPR-cas - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DNA - Ácido desoxirribonucleico

LB - Luria-Bertani

LVA - Laboratório de Virologia Aplicada

MALDI-TOF - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight

OMS - Organização Mundial da Saúde

PMF - Peptide Mass Fingerprint

RPM - Rotações por minuto

SEMASA - Serviço Municipal de Água, Saneamento Básico e Infraestrutura

TSA - Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	22
	2.1 OBJETIVO GERAL	22
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	JUSTIFICATIVA	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
	4.1 RECEBIMENTO DE AMOSTRAS	24
	4.2 ISOLAMENTO BACTERIANO	26
	4.3 IDENTIFICAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	26
	4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	27
	4.5 EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO	28
	4.6 CARACTERIZAÇÃO DO GENOMA BACTERIANO	28
	4.7 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
	5.1 TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	30
	5.2 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	30
	5.3 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS GENES	32
	5.4 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS BACTERIÓFAGOS	37
	5.5 COBERTURA DO SEQUENCIAMENTO E LIMITAÇÕES	39
6	CONCLUSÃO	40
7	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

As bactérias são seres vivos unicelulares pertencentes ao reino monera possuindo algumas características e determinados componentes podem ser observados em vários tipos de células. De forma geral todas as células possuem uma parede celular que separa o citoplasma do ambiente externo. O citoplasma é composto por proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, polissacarídeos, íons inorgânicos e ribossomos. A parede celular confere resistência estrutural à célula e é uma estrutura moderadamente permeável localizada externamente à membrana plasmática (MADIGAN et al., 2016).

Mesmo com sua fama de seres patogênicos, as bactérias também possuem ações benéficas ao ser humano por fazer parte da microbiota intestinal, estabelecendo uma flora bacteriana com características que mantém a homeostase do corpo variando de indivíduo para indivíduo (EL-SAYED; ALEYA; KAMEL, 2021). Além disso, são responsáveis por converter componentes alimentares através de enzimas gerando alimentos fermentados como pães e kombuchas (DIMIDI et al., 2019).

As bactérias são organismos que, até meados dos anos 1920 foram responsáveis por uma alta taxa de infecções ao redor do mundo e por não haver uma forma de tratamento na época, as infecções resultaram em uma grande quantidade de óbitos (DAVIES; DAVIES, 2010). Entre as diversas epidemias que se teve ao longo dos anos podemos citar a peste, causada por uma bactéria conhecida como *Yersinia pestis* que chegou a matar aproximadamente 200 milhões de pessoas ao redor do mundo (SUN, 2016), outro exemplo epidemiologicamente importante é a bactéria *Vibrio cholerae* que é responsável por causar a cólera, e desde 1961 infecta aproximadamente 5 milhões de pessoas e causa 120 mil mortes ao ano (HARRIS et al., 2012). No entanto, a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, que se deu ao acaso, em 1928 (FLEMING, 1929) abriu portas para o tratamento e controle dessas infecções e teve seu uso amplamente disseminado principalmente durante a Segunda Guerra Mundial (GAYNES, 2017).

Esse grande avanço no tratamento das infecções bacterianas possibilitou a descoberta, desenvolvimento e fabricação de novos medicamentos visando combater infecções bacterianas pertinentes à época, que ficou conhecida como a era de ouro dos antibióticos. Como os estudos estavam em estágios iniciais, havia

uma ampla gama de moléculas e novas tecnologias auxiliares que foram importantes para o desenvolvimento de diversas classes de antibióticos, como exemplos temos os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e as polimixinas (HUEMER et al., 2020; SPAGNOLO; TRUJILLO; DENNEHY, 2021). Ao se aproximar do fim dos anos 1990 se observou um declínio desses grandes números de descobertas, período que foi marcado pela ausência de destaque nas pesquisas de novos antibióticos.

Entretanto, a problemática das resistências não é um assunto que só é discutido recentemente visto que em meados dos anos 1940 os casos de diversas resistências aos antibióticos foram relatados e assim foi possível observar que estava surgindo casos de inefetividade nos tratamentos das infecções bacterianas (O'MEARA, 2020). O motivo disso foi a capacidade das bactérias de desenvolver mecanismos de evasão aos antibióticos que à elas eram direcionados, gerando assim um problema de saúde pública que persiste até os dias de hoje, que são as resistências bacterianas, um assunto que vem sendo discutido do âmbito científico, médico e farmacêutico, visando melhorar os tratamentos já existentes ou propiciar a descoberta de novos (ABRAHAM et al., 1941; ABRAHAM; CHAIN, 1940; COHEN, 2000).

Estudos demonstram que atualmente existem mais de 20.000 possíveis genes de resistência que tendem a existir quando se analisa o genoma de 400 modelos bacterianos distintos. A problemática da resistência aos antibióticos mata aproximadamente 23.000 pacientes a cada ano nos Estados Unidos, que além do impacto humanitário ainda resulta em um aumento nos custos de saúde de mais de US\$20 bilhões (NADGIR; BISWAS, 2023). No Brasil a resistência se torna um problema tanto para humanos quanto animais, visto que o país é um grande produtor e exportador de produtos de origem animal, e já são observadas resistências às diversas classes de antibióticos neste setor como as de *Escherichia coli* às penicilinas e a combinação de sulfametoxazol e trimetoprima em amostras de frangos de corte (ROTH et al., 2018). No entanto, não é somente no Brasil que ocorrem casos de resistências aos antibióticos do âmbito pecuário, anualmente a produção de gado nos EUA é responsável por aproximadamente 80% do uso de todos os antibióticos que são utilizados no país, tanto para o tratamento quanto para a prevenção das infecções, além disso, estudos demonstram que não somente os

bovinos e aves mas também os suínos apresentam uma alta taxa de bactérias resistentes em sua microbiota (CHANG et al., 2014).

Os antibióticos após exercerem seu devido efeito farmacológico, são excretados do corpo, seja humano ou animal e podem se tornar micropoluentes no ambiente externo podendo se acumular em diversas matrizes como solos, efluentes e esgotos. Devido a esse fator, bactérias presentes nesses ambientes podem entrar em contato com esses antibióticos residuais oriundos de excreções humanas e animais e desenvolverem resistências frente a esses compostos que, em decorrência da capacidade de adaptação e seleção natural de cepas resistentes ao agente antimicrobiano, ocorre o surgimento de uma população de bactérias resistentes, o que pode dificultar o tratamento com o mesmo antibiótico ou até com outros pertencentes à mesma classe (DAVIES; DAVIES, 2010; LARSSON; FLACH, 2021).

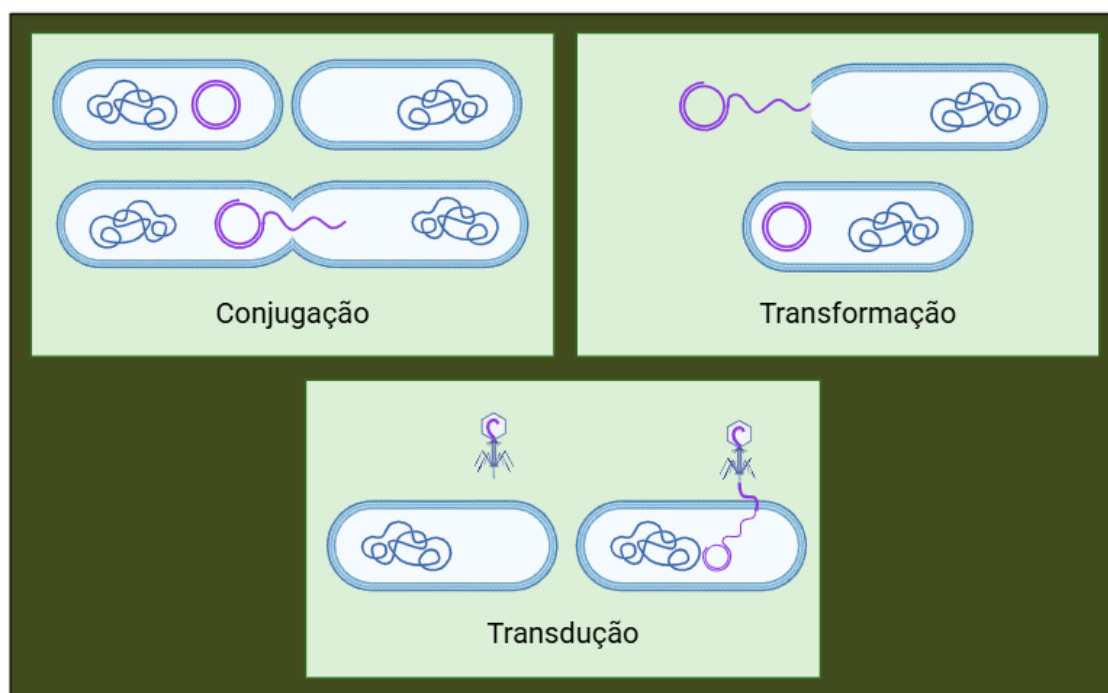
Para contornar esse problema, metabólitos secundários oriundos de plantas como os flavonóides, taninos e saponinas já tiveram suas propriedades antimicrobianas estabelecidas que englobam a interferência nas paredes celulares microbianas, destruição da parede, inibem a síntese de proteínas e impedem a função das enzimas microbianas, causando uma redução efetiva da carga microbiana e prevenindo infecções (GOLOWCZYC; GOMEZ-ZAVAGLIA, 2024). Outra abordagem que pode ser usada como forma de controle antimicrobiano é a utilização de desinfetantes como ácidos, álcalis, alcoóis, aldeídos, halogênios, fenóis e compostos quaternários de amônia (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016). Ainda assim, é necessária cautela em seu uso, pois as bactérias também possuem capacidade de resistir aos desinfetantes, tanto por formas adquiridas quanto por formas intrínsecas (CHEN et al., 2021; MC CARLIE; BOUCHER; BRAGG, 2020).

A obtenção das resistências podem acontecer de diversas maneiras e podem ser classificada em nível molecular como a modificação do sítio alvo de ligação do antibiótico ou degradação do medicamento, as defesas de nível celular que tem como exemplos a mudança de permeação das membranas, geração de bombas de efluxo, produção de vesículas e de lipopolissacarídeos, e por fim temos as defesas de nível multicelular que possuem como representantes a produção de biofilmes e apoptose da bactéria (SMITH et al., 2023). Algumas bactérias já são naturalmente resistentes a alguns medicamentos, característica conhecidas como resistências intrínsecas, fator que naturalmente a bactéria já possui em seu material genético,

entretanto para bactérias que são sensíveis a um antibiótico, a exposição contínua e de forma irracional pode levar ao que se conhece como resistência adquirida, uma característica onde a bactéria se adapta ao efeito do antibiótico e desenvolve a capacidade de retardar ou até mesmo impedir o seu efeito (DAVIES; DAVIES, 2010).

A obtenção da resistência adquirida ocorre principalmente de duas formas, a primeira delas é por um processo de mutação do material genético que é decorrente de um erro de replicação ou de um rearranjo cromossômico (RAESIDE et al., 2014) e a segunda forma é a transmissão horizontal de genes que acontece por meio de três processos canônicos (conjugação, transformação e transdução) como pode ser observado na figura 1(ARNOLD; HUANG; HANAGE, 2021).

FIGURA 1 - Processos canônicos da transmissão horizontal de genes



Fonte: Elaborado pelo autor

O primeiro processo canônico é a conjugação, que resulta da transferência do material genético entre bactérias através de um pilus. Durante o segundo processo canônico nomeado de transformação ocorre uma incorporação de um material genético exógeno ao da bactéria através de um poro em sua parede. Como último processo canônico tem-se a transdução que é resultado do transporte de material genético de uma bactéria para outra utilizando um vírus nomeado de bacteriófago

como mediador. (BORZIAK; FLEETWOOD; ZHULIN, 2013; SMITH et al., 2023; SHARMA et al., 2016).

Os bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam bactérias e são as partículas mais abundantes que se encontram na natureza, foram descritos primeira por Frederick Twort e Félix d'Herelle em meados dos anos 1915, onde Twort descreveu o processo de vitrificação, onde ele notou que algumas colônias bacterianas em cultura ficavam transparentes e não podiam mais ser cultivadas, indicando que as bactérias estavam mortas, fenômeno que ele atribuiu à uma atividade exercida por um vírus, já d'Herelle verificou o mesmo fenômeno em amostra de um paciente, onde ele percebeu que com o aparecimento das marcas transparentes, o quadro clínico do paciente melhorou e d'Herelle atribuiu esse resultado também a um vírus, ao qual nomeou de bacteriófago. O tratamento que ficou conhecido como fagoterapia, foi utilizado por d'Herelle durante os anos 1930 e 1940, no entanto com a descoberta dos antimicrobianos, a utilização dos fagos foi se tornando cada vez menos comum até o cenário atual, onde as bactérias apresentam altas taxas de resistência e os fagos voltaram a aparecer em artigos e pesquisas (SANTOS; ROMANS; WIGG, 2021).

Atualmente tem sido estudado pela sua ampla gama de utilizações biotecnológicas como a aplicação de partículas de bacteriófagos na vacinação, biocontrole de patógenos vegetais, dispositivos de biossensoriamento bacteriano, entrega de genes, biopreservação e segurança alimentar, métodos de transferência de genes de plantas e animais, controle de biofilme, desinfecção de superfícies e controle de corrosão, controle do crescimento das bactérias e também por sua capacidade de disseminação de genes de resistência bacteriano (HARADA et al., 2018; CLOKIE et al., 2011).

Os fagos apresentam duas formas de replicação, a primeira é a forma lítica que utiliza o ribossomo bacteriano para a formação de suas proteínas e em seguida promove a lise da bactéria para então liberar múltiplas cópias virais com capacidade de infectar novos hospedeiros. A segunda forma de replicação é a lisogênica que através de integrases (enzimas que possuem a capacidade de integrar DNA exógeno no genoma bacteriano) o fago consegue realizar a integração de seu material genético ao da bactéria hospedeira e cada vez que ela gera células filhas, os fagos integrados se proliferam também. Ocasionalmente esse fago pode converter seu ciclo lisogênico em lítico e se liberar do genoma bacteriano, destruindo

a bactéria no processo (KASMAN; PORTER, 2022). Nesse processo de lise celular os fagos ocasionalmente encapsulam fragmentos do material genético bacteriano durante a montagem de sua partícula viral e ao infectar outra bactéria esse material tem a possibilidade de se integrar ao genoma bacteriano, esse recurso foi citado anteriormente como a transdução, um dos processos canônicos da transmissão horizontal de genes que possui uma grande relevância para a disseminação de genes de resistência bacterianos (LECLERC et al., 2022).

Tendo em vista todas essas características adaptativas por parte das bactérias se faz cada vez mais necessário o monitoramento desses microrganismos para se tomar medidas necessárias no controle das resistências, e nesse sentido nota-se a relevância para um olhar mais amplo como o conceito de Saúde Única que segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) diz que, a saúde dos seres humanos, dos animais domésticos e selvagens, das plantas e do ambiente em geral (incluindo os ecossistemas) estão intimamente ligados e são interdependentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023).

Alguns estudos já foram realizados nessa linha, avaliando bactérias que possuem a rota fecal-oral em mamíferos e que continuam sobrevivendo em ambiente externo até por fim retornar ao mamífero após o consumo de água e/ou alimentos contaminados. Um exemplo clássico são as termotolerantes, como *Escherichia coli*, um bacilo gram-negativo conhecido por fazer parte da microbiota intestinal de mamíferos e que por vezes provoca diversos quadros patogênicos, especialmente gastrointestinais (MUELLER; TAINTER, 2023). A maioria dos trabalhos realizados com essa bactéria utilizam como matriz as águas residuais de diversas localizações visando a busca pela presença de resistências, seja ela por métodos fenotípicos como o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) ou genotípicos como a caracterização do material genético do agente a ser estudado, (HUTINEL et al., 2019; YU et al., 2022; AKTER; CHOWDHURY; MINA, 2021) dessa maneira o monitoramento desses genes de resistência se faz essencial para planejar medidas de controle e tratamento desses patógenos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o perfil de resistência de *Escherichia coli* frente à antibióticos e sua relação com os bacteriófagos a partir de amostras de esgoto sanitário humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar possíveis *Escherichia coli* de amostras de esgoto sanitário humano;
- Avaliar o perfil de resistência de isolados *Escherichia coli* frente a diferentes classes de antimicrobianos através da técnica de disco-difusão;
- Identificar genes de resistência a antimicrobianos dos isolados de *Escherichia coli* utilizando ferramentas de bioinformática;
- Relacionar os genes de resistência a antimicrobianos com bacteriófagos.

3 JUSTIFICATIVA

Em decorrência do elevado número de casos relacionados à resistência bacteriana, surge a necessidade de entender e elucidar os mecanismos pelos quais as bactérias adquirem as devidas resistências, seja para o desenvolvimento de novos fármacos ou medidas biotecnológicas para controlar bactérias resistentes. Um dos passos mais importantes para a concretização dessa estratégia é o monitoramento de cepas bacterianas em diferentes matrizes nas quais podem habitar.

Para esse trabalho, o esgoto sanitário humano é a matriz de maior interesse em decorrência de sua grande importância no âmbito da Saúde Única. Por meio desta matriz é possível detectar a presença de bactérias oriundas de humanos, animais e do meio ambiente. Desta maneira, o presente trabalho visa relacionar as possíveis resistências bacterianas decorrentes do uso de antibióticos, assim como também avaliar a capacidade de bacteriófagos que realizam ciclo lisogênico, de carrear genes de resistência a antimicrobianos e transmiti-los por meio de seu ciclo replicativo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 RECEBIMENTO DE AMOSTRAS

As amostras foram cedidas pela SEMASA e pela CASAN entre os períodos de dezembro de 2022 até fevereiro de 2024, computando-se 47 amostras avaliadas, conforme demonstrado abaixo no quadro 1.

As amostras foram coletadas de tanques de esgoto bruto das estações de SEMASA em Itajaí e da CASAN localizadas em Canasvieiras, Lagoa da Conceição e na região próxima ao centro de Florianópolis conhecida como Insular.

.QUADRO 1 – Amostras de águas residuais recebidas da SEMASA com o objetivo de isolar enterobactérias com características fenotípicas de *Escherichia coli*

Pontos de coleta	Data	Órgão concedente
Itajaí - Ponto 9 Itajaí - Ponto 18 Itajaí - Ponto 21	15/12/2022	SEMASA
Lagoa da Conceição	16/01/2023	CASAN
Canasvieiras	18/01/2023	CASAN
Insular	19/01/2023	CASAN
Itajaí - Ponto 6 Itajaí - Ponto 9 Itajaí - Ponto 18 Itajaí - Ponto 21	20/01/2023	SEMASA
Lagoa da Conceição	23/01/2023	CASAN
Itajaí - Ponto 9 Itajaí - Ponto 18 Itajaí - Ponto 21 Canasvieiras	02/02/2023	SEMASA (Itajaí) CASAN (canasvieiras)
Lagoa da Conceição	07/02/2023	CASAN
Canasvieiras Lagoa da Conceição	02/03/2023	CASAN
Lagoa da Conceição	22/05/2023	CASAN
Insular	30/05/2023	CASAN

Lagoa da Conceição	13/06/2023	CASAN
Canasvieiras	19/06/2023	CASAN
Insular	24/06/2023	CASAN
Canasvieiras Lagoa da Conceição	26/07/2023	CASAN
Insular	28/07/2023	CASAN
Insular Canasvieiras	17/08/2023	CASAN
Lagoa da Conceição	31/08/2023	CASAN
Canasvieiras	06/09/2023	CASAN
Insular	07/09/2023	CASAN
Lagoa da Conceição	08/09/2023	CASAN
Lagoa da Conceição Canasvieiras Insular	24/10/2023	CASAN
Lagoa da Conceição Lagoa da Conceição Canasvieiras	27/11/2023	CASAN
Canasvieiras	19/12/2023	CASAN
Lagoa da Conceição	21/12/2023	CASAN
Insular	26/12/2023	CASAN
Canasvieiras	16/01/2024	CASAN
Insular Lagoa da Conceição	17/01/2024	CASAN
Canasvieiras	19/02/2024	CASAN
Lagoa da Conceição Insular	21/02/2024	CASAN

Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 ISOLAMENTO BACTERIANO

Para o isolamento de colônias fenotipicamente características de *Escherichia coli* foi utilizado o meio seletivo e diferencial ágar MacConkey (KASVI, Espanha), utilizando 10 mL do mesmo em placas de petri e aproximadamente 100 µL da amostra, ao qual foi distribuída na placa utilizando alças de Drigalski, após isso as placas foram submetidas a uma temperatura de 37 °C por 24 horas utilizando uma estufa bacteriológica. As colônias isoladas foram ressuspendidas em meio Luria-Bertani (LB) (KASVI, Espanha) para propagação em meio nutritivo para que, sejam então, cultivadas em MacConkey novamente e isoladas novas colônias utilizando o mesmo procedimento citado anteriormente. Esse processo foi realizado visto que a amostra possui uma abundância de células bacterianas, onde as colônias por vezes podem se sobrepor umas às outras. Foram isoladas três colônias de cada amostra recebida. Para o armazenamento das colônias isoladas foi utilizado uma combinação de meio LB e glicerol (5:1) e armazenadas refrigerada em uma temperatura de -80 °C.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli*

Para o processo de identificação das espécies foi utilizada a técnica de Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF) que consiste em preparar a amostra que se deseja identificar com um composto orgânico, que é responsável por absorção de energia chamado matriz, que é submetido a um processo de secagem levando à cristalização. Após isso a matriz é submetida a um feixe de laser que gera um processo de dessorção e ionização tendo como resultado final, a formação de íons protonados oriundos da amostra que serão separadas de acordo com sua relação massa-carga (m/z). Após essa separação, os íons são submetidos a um analisador do tipo TOF, que faz o processamento de todos os íons em ordem crescente de relação massa-carga previamente realizado. Por fim, o sistema gera um espectro de massa conhecido como peptide mass fingerprint (PMF) que então será comparado com espectros existentes nos bancos de dados do equipamento para que ocorra sua devida identificação (SINGHAL et al., 2015).

Utilizou-se o equipamento Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha). As amostras foram preparadas por transferência direta estendida da seguinte forma: colônias bacterianas foram colhidas e depositadas (em duplicata) nos alvos de uma placa de aço polido, sendo aplicado 1µl de ácido fórmico a 70% (v/v), e após a secagem, 1µl da solução matriz (HCCA alfa-ciano-4-hidroxicinâmico). Para obtenção dos dados, foram realizados dois experimentos independentes para cada amostra. Além disso, foi utilizada a cepa DH5α de *Escherichia coli* como padrão para calibração e espectro de referência do equipamento. O processamento dos espectros das proteínas entre 2 e 20 kDa foi obtido através do software flexControl versão 3.4 (Bruker Daltonics, EUA) e comparado com os espectros presentes no pacote MBT 7854 MSP Library do software MALDI Biotyper versão 3.1 (Bruker Daltonics). Os parâmetros utilizados para interpretação dos resultados da identificação por meio de MALDI-TOF foram os seguintes: a) A identificação da espécie foi considerada como altamente provável quando a pontuação foi de 3.000 a 2.300; b) A identificação em nível de gênero foi considerada segura e de espécie considerada provável quando a pontuação foi de 2.299 a 2.000; c) A identificação apenas em nível de gênero foi considerada provável quando a pontuação foi de 1.999 a 1.700; d) A identificação foi classificada como não confiável quando a pontuação foi ≤ 1.699 .

4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O TSA tem a função de avaliar o nível de resistência ou de sensibilidade a diversos antimicrobianos, para isso foram selecionados aqueles que impactam diretamente em *Escherichia coli*. Para os antibióticos de uso humano foram selecionados os seguintes antibióticos (Laborclin): Norfloxacino (10 µg), Ceftriaxona (30 µg), Gentamicina (10 µg), Sulfametoxazol + Trimetoprima (25 µg), Nitrofurantoína (300 µg) e Ampicilina (10 µg). Avaliou-se então o diâmetro dos halos de inibição formados por esses antibióticos, para isso foi utilizada a tabela de pontos de corte clínicos disponibilizada pelo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCast), edição de 2024 conforme consta no anexo A. Para nitrofurantoína foi utilizado o anexo B disponibilizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Para a realização dos testes as cepas isoladas foram repicadas em tubos contendo 25 mL de caldo LB e incubadas a 37° C por 24 horas. Após a incubação as culturas foram semeadas com o auxílio de swabs estéreis em placas contendo ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA, Índia), em seguida foi realizada a adição dos discos antimicrobianos e as placas foram incubadas por 24 horas de incubação a 37 °C. (BAUER et al., 1966).

4.5 EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

Para o processo de extração de material genético, as amostras foram crescidas em meio LB em duplicata e então centrifugadas a 5000 RPM por 5 minutos, os *pellets* resultantes foram transferidos para um único tubo e processados utilizando o kit comercial RNAdvance Viral XP Reagent Kit, que consiste em uma etapa de lise da parede bacteriana para expor seu material genético, em seguida ocorre a ligação desse material genético com as beads, dessa maneira possibilita a separação do material alvo e dos contaminantes presentes na amostra, que após passar por processos de lavagens se obtém uma amostra purificada que foi então submetida ao sequenciamento.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DO GENOMA BACTERIANO

Os sequenciamentos seguiram o protocolo de montagem de biblioteca de DNA genômico para sequenciamento *shotgun* descrito no protocolo de sequenciamento - Rapid sequencing gDNA - barcoding (SQK-RBK004) da Oxford Nanopore. Inicialmente, as amostras foram quantificadas utilizando o fluorômetro Qubit (Invitrogen, MA, EUA) utilizando 1 µL de DNA das amostras. Após essa quantificação foi usado uma padronização de, no mínimo, 100 ng de material genético contidos em um volume final de 7,5 µL, desse total, 2,5 µL foram de barcodes do kit SQK-RBK004 (Oxford Nanopore). As amostras então foram submetidas a etapas de ciclagem via termociclador, sendo a primeira de 30° C por um minuto e a segunda de 80° C por um minuto. Em seguida, em um único tubo, as amostras foram ressuspendidas com beads AMPure XP (Beckman Coulter)

utilizando volume igual ao total da biblioteca, que corresponde ao volume somado de todas as amostras.

Após esse processo, as amostras foram submetidas ao processo de sequenciamento e para isso utilizou-se o MinION Mk-1B (Oxford nanopore), que realiza a sequência e identificação das bases do DNA em decorrência de mudanças na condutividade elétrica que são geradas de acordo com a passagem das fitas de DNA por um poro biológico (LU; GIORDANO; NING, 2016). Esses ensaios foram realizados em parceria com o Laboratório de Protozoologia e de Bioinformática situado na Universidade Federal de Santa Catarina.

4.7 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO

Os fragmentos de leitura obtidos do sequenciamento de leituras longas foram processados pelo pipeline fast-Basecalling do próprio equipamento (MinION Mk1c – Oxford Nanopore), que utiliza o software Guppy 5.0.7 (Wick, Judd e Holt, 2019). Foi utilizado o índice médio de qualidade Phred com *score* de 8 e tamanho mínimo de fragmento de 200 pares de base (pb) que foram então separados considerando o respectivo *barcode* adicionado na preparação da biblioteca por meio do software Guppy. Os fragmentos foram filtrados de forma a remover sequências de baixa qualidade, fragmentos de leitura de origem humana e adaptadores de sequenciamento. Após este processo, os fragmentos de leitura foram alinhados no genoma de referência de *Escherichia coli* (NCBI/CF_000005845.2_ASM584v2) com o objetivo de gerar a sequência consenso, utilizando o SAMtools v 1.7 (Danecek et al., 2021). Os genes de resistência, virulência e plasmídeos da sequência consenso foram obtidos utilizando o Abricate v. 0.9.8, com o database CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database), Virulence Finder e Plasmid Finder 2.0. As sequências de bacteriófagos foram encontradas utilizando o geNomad (Camargo et al., 2023) e a taxonomia identificada a partir de Blastn.

A análise dos sorogrupos foi realizada utilizando o programa Sorotyper 2.0 utilizando o valor de 85% de identificação e 40% do genoma obtido no sequenciamento como valor mínimo para comparação com o genoma de referência.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

As amostras que foram utilizadas neste trabalho foram processadas de acordo com sua chegada ao Laboratório de Virologia Aplicada (LVA). Por meio do MALDI-TOF, 15 isolados foram identificados como *Escherichia coli* (Quadro 2).

QUADRO 2 – Amostras identificadas como *Escherichia coli* por meio do MALDI-TOF

Local de coleta	Órgão concedente	Data	Numeração
Itajaí - Ponto 6	SEMASA	20/01/2003	1
Itajaí - Ponto 9	SEMASA	20/01/2023	2 e 3
Itajaí - Ponto 21	SEMASA	20/01/2023	4
Itajaí - Ponto 18	SEMASA	02/02/2023	5
Lagoa da Conceição	CASAN	07/02/2023	6 e 7
Insular	CASAN	28/07/2023	8 e 9
Lagoa da Conceição	CASAN	31/08/2023	10
Insular	CASAN	24/10/2023	11
Canasvieiras	CASAN	19/02/2024	12
Lagoa da Conceição	CASAN	21/02/2024	13
Insular	CASAN	21/02/2024	14 e 15

Fonte: Elaborado pelo autor

5.2 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS

Para avaliar o perfil fenotípico das colônias, foram considerados os valores dos diâmetros dos halos formados, sendo que seus valores de referência se encontram disponíveis no anexo A.

FIGURA 2 - Perfil de resistência fenotípica de isolados de *Escherichia coli* frente aos antimicrobianos selecionados para a o trabalho

Antimicrobianos															
Ampicilina	14	18	6	15	17	20	20	19	18	15	0	14	7	0	0
Ceftriaxona	20	25	0	24	25	26	32	23	24	22	20	22	22	21	22
Gentamicina	15	15	10	12	19	18	17	17	17	20	16	15	17	16	16
Nitrofurantoina	12	20	16	19	17	19	17	17	17	17	15	16	17	13	17
Norfloxacino	28	30	6	20	27	25	26	25	27	24	26	23	31	21	22
Sulfametoxazol + Trimetoprima	20	27	0	24	23	25	25	23	21	23	0	15	22	22	21
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	Amostras														

Figura 2 - Valores dos halos de inibição referente a cada uma das amostras com o objetivo de caracterizar fenotipicamente as resistências frente aos antimicrobianos selecionados para o estudo. Os quadrantes mostrados em ■ indicam resistência, ■ indica sensível, aumentando exposição e ■ indica sensível.

Ao analisar a figura 2, é possível observar que todos os isolados testados apresentaram alguma resistência fenotípica, e em valores percentuais, pode-se concluir que as resistências foram de: 33% para ampicilina (5 isolados), 26% para ceftriaxona (4 isolados), 46% para gentamicina (7 isolados), 13% para nitrofurantoina (2 isolados), 33% para norfloxacino (5 isolados) e 13% para sulfametoxazol + trimetoprima (2 isolados).

As resistências de *Escherichia coli* aos antimicrobianos mais observadas também são encontradas na literatura em outros estudos semelhantes e em localidades diferentes, o que mostra que quando se trata de bactérias resistentes, é possível ver que suas variantes estão em circulação por todo o mundo, mas principalmente em países subdesenvolvidos ou com baixa cobertura e investimento em setores de saúde e controle de qualidade (AHMED; RABBI; SULTANA, 2019). Exemplos disso são *Escherichia coli* encontradas em Bangladesh onde foi possível observar que as bactérias tiveram resistências à ampicilina de 57,9-69% de isolados clínicos, enquanto a combinação de trimetoprima + sulfametoxazol foi de 55,2%. Em águas residuárias das regiões de Mathbaria e Chhatak apresentaram uma alta proporção de cepas resistentes à ampicilina com percentual de 50-75% e ceftriaxona de 62,5%. Nesse estudo também foi possível observar que, 80-100% das cepas foram suscetíveis a norfloxacino, resultado diferente do observado no atual estudo

(JOHURA et al., 2024). As resistências também podem ser observadas em isolados obtidos de derivados lácteos e frutas como mostrado realizado na Etiópia onde foi visto que eram altamente resistentes à ampicilina (70%), sulfametoxazol + trimetoprima (60%) e suscetíveis a alguns antimicrobianos como gentamicina (100%), norfloxacina (100%) (TADESSE et al., 2018). Por fim, para demonstrar como as bactérias possuem diferentes comportamentos quando comparadas cepas de diferentes localizações, estudo realizado na cidade Bagua no Peru, demonstrou que as bactérias possuem resistências de 100% quando submetidas a gentamicina e 64% quando testadas contra norfloxacina (FERRO et al., 2024).

5.3 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS GENES

Após a etapa de sequenciamento foi possível detectar a presença de 62 genes de resistência, sendo que do total de genes, 27 apresentaram uma relevância para esse trabalho, visto que foi possível estabelecer uma correlação entre o gene de resistência e sua interação com o antimicrobiano alvo, no entanto para a nitrofurantoína e para a associação de sulfametoxazol + trimetoprima não foram encontrados genes de resistência que permitem relacionar com algumas das resistências.

FIGURA 3: Esquema representando os genes de resistência de interesse agrupados de acordo ao grupo que pertencem

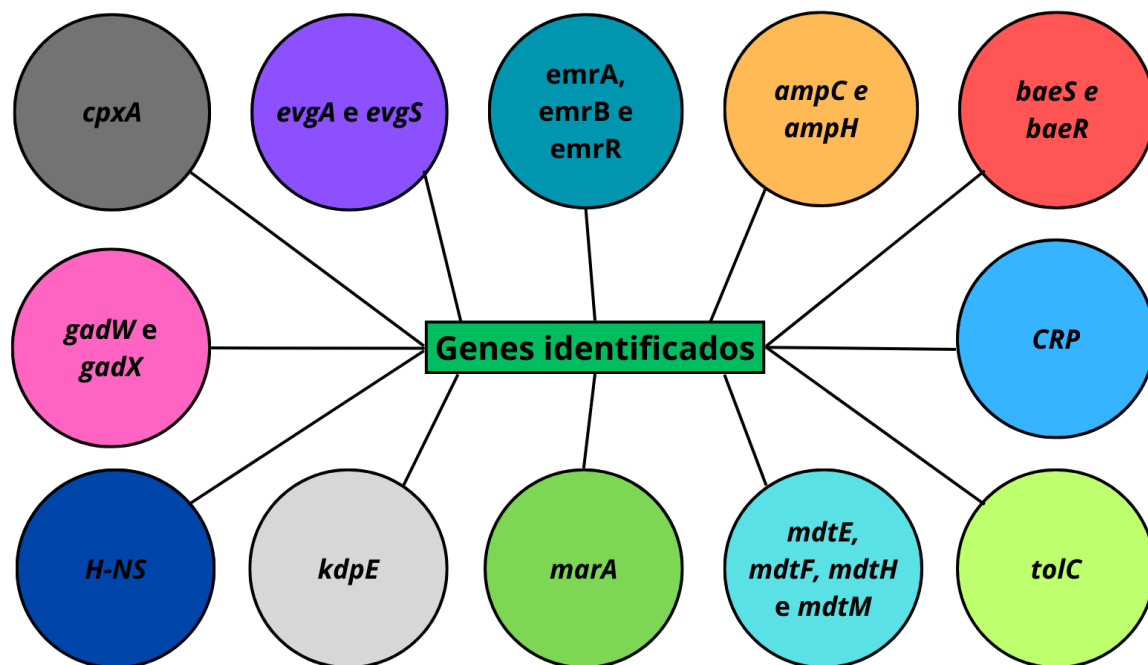


Figura 3 - Presença dos 27 genes de interesse para a execução deste trabalho.

Ao realizar o levantamento dos dados obtidos da totalidade dos genes de resistência foi possível observar que o gene *tolC* teve uma maior prevalência em relação ao total de amostras aparecendo em 47% (7 isolados), seguido de *acrA*, *acrB*, *acrD*, *acrE*, *baeR*, *baeS*, *emrA*, *emrB*, *emrR* e *kdpE* com 40% (6 isolados), *acrF*, *acrS*, *CRP*, *evgA*, *evgS*, *gadW*, *gadX*, *H-NS*, *marA*, *mdtE* e *mdtF* com 33% (5 isolados), *ampC*, *ampH* e *mdtM* com 27%, *cpxA* 20% (3 isolados) e *mdtH* com 13% (2 isolados).

QUADRO 3 - Lista de genes de resistência bacteriana

Gene	Antimicrobiano
<i>acrA</i> e <i>acrB</i>	Ceftriaxona e Norfloxacino
<i>acrD</i>	Gentamicina
<i>acrE</i> e <i>acrF</i>	Ceftriaxona
<i>acrS</i>	Ceftriaxona e Norfloxacino
<i>ampC</i> e <i>ampH</i>	Ampicilina
<i>baeR</i> e <i>baeS</i>	Gentamicina
<i>cpxA</i>	Gentamicina
<i>CRP</i>	Norfloxacino
<i>emrA</i> , <i>emrB</i> e <i>emrR</i>	Norfloxacino
<i>evgA</i> e <i>evgS</i>	Norfloxacino
<i>gadW</i> e <i>gadX</i>	Norfloxacino
<i>H-NS</i>	Ceftriaxona e Norfloxacino
<i>kdpE</i>	Gentamicina
<i>marA</i>	Ceftriaxona e Norfloxacino
<i>tolC</i>	Ceftriaxona, Gentamicina e Norfloxacino

Fonte: Elaborado pelo autor

Os genes de resistência *acrA* e *acrB* junto com o gene *tolC* são conhecidos por formarem o sistema *acrAB-tolC* que é composto pelo transportador *acrB*, pela proteína de membrana *acrA* e pelo canal de membrana externa multifuncional *tolC*, tendo como mecanismo de resistência a formação de bombas de efluxo que eliminam o antimicrobiano assim que ele ultrapassa a barreira citoplasmática bacteriana. Os genes *acrE*, *acrF* (formam o sistema *acrEF*) e *acrD* possuem o mesmo mecanismo e requerem *tolC* para exercer sua função (HORIYAMA; NISHINO, 2014). O papel do gene *acrS* ainda não é bem estabelecido mas já demonstraram que ele pode reprimir a atividade de genes como o sistema *acrAB*

(HIRAKAWA et al., 2008). O grupo dos genes *emr* também possuem atividade relacionadas às bombas de efluxo, sendo que o sistema *emrAB-toiC* é um dos mais estudados, de forma que a interrupção de sua expressão resultou na suscetibilidade das bactérias quando submetidas a um tratamento com nitrofurantoína (PUÉRTOLAS-BALINT et al., 2019).

As resistências à ampicilina é associada aos genes *ampC* e *ampH*, que são responsáveis por hidrolisar o anel beta-lactâmico de antimicrobianos da classe das penicilinas como a ampicilina, esse processo leva a degradação do antimicrobiano e inefetividade do mesmo (SADEGHI; SEDIGH EBRAHIM-SARAIE; MOJTAHEDI, 2022).

Semelhante ao sistema *acrAB*, o sistema *baeS/baeR* também são dois componentes que formam um sistema de resistência conhecidos por controlar a expressão de proteínas transmembranares da parede bacteriana conhecidas como porinas e também regular a expressão de bombas de efluxo e já foram relatados como responsáveis por gerar resistência ao antimicrobiano betalactâmico temocilina em bactérias da espécie *Enterobacterales*, no entanto ainda são necessários mais estudos para avaliar a resistência em outras representantes (PÉREZ-PALACIOS et al., 2024).

O gene *cpxA* também é comumente encontrado em associação com o *cpxR*, no entanto não foi possível detectar este último, mas esse sistema é essencial para responder a estresses ambientais, sendo os principais aqueles que impactam o envelope celular, como o estresse osmótico ou falhas no enovelamento de proteínas (SIRYAPORN; GOULIAN, 2008).

QUADRO 4 - Lista de genes de virulência

Gene	Mecanismo
<i>fimA, fimB, fimC, fimD, fimE, fimF, fimG, fimH e fimI</i>	Produção de fímbrias
<i>entA, entB, entC, entD, entE, entG e entS</i>	Biossíntese de enterobactina
<i>fapA, fapB, fapC, fapD e fapG</i>	Biossíntese de enterobactina
<i>fes</i>	Clivagem do ferro

<i>gspC, gspL e gspM</i>	Secreção de toxinas e enzimas
<i>espR1, espL1, espX4, espX5, espY1 e espL4</i>	Secreção de toxinas e enzimas
<i>aslA</i>	Permeabilizar barreira
<i>ykgk/ecpR</i>	Produção de fímbrias
<i>yagV/ecpE, yagW/ecpD, yagX/ecpC, yagY/ecpB, yagZ/ecpA</i>	Regulação metabólica e adaptação

Fonte: Elaborado pelo autor

As fímbrias ou pili são estruturas presentes na parede bacteriana e possuem propriedades de adesão às células. *Escherichia coli* e outras bactérias possuem uma ampla gama destas fímbrias com várias funções conhecidas e hipotéticas além da adesão, que vão desde a captura de DNA exógeno até a evasão de antimicrobianos e a invasão de células hospedeiras (MUNHOZ et al., 2023).

As bactérias possuem mecanismos especializados para capturar ferro do ambiente, um recurso essencial para seu metabolismo. Um desses mecanismos é a produção de enterobactinas, que são moléculas com alta capacidade quelante de ferro, facilitando o transporte para o interior do organismo bacteriano. Quando associados ao gene *fes*, as enterobactinas contribuem para o aumento da virulência em diversas espécies e gêneros de bactérias (RAYMOND; DERTZ; KIM, 2003).

A secreção de toxinas e enzimas desempenha um papel importante no aumento da virulência de diversas cepas, permitindo assim, que o conteúdo secretado desempenhe um papel crucial na degradação da parede celular, permitindo que as bactérias invadam os tecidos e os destruam (MEENA et al., 2019).

Por fim, tem-se os genes que causam um aumento nas chances de permeação da parede celular, exemplos realizados com *Escherichia coli* foi um ensaio *in vitro* em que se concluiu que a presença do gene *aslA* foi um fator contribuinte para a invasão da bactéria em células hospedeiras (HOFFMAN et al., 2000).

QUADRO 5 - Lista de genes encontrados em plasmídeos

Plasmídeos
<i>mdtA</i>
<i>blaCMY-5</i>
<i>blaACT-2</i>
<i>aac3-IIa</i>
<i>aadA2</i>

Fonte: Elaborado pelo autor

Os genes do tipo *mdt* encontrados que se associam ao gene *tolC* e resultam em bombas de efluxo, agindo como um eliminador de antimicrobianos quando ultrapassam a membrana bacteriana (SUNG et al., 2024). Os plasmídeos *blaCMY-5* e *blaACT-2* são responsáveis por produzirem uma beta-lactamase semelhante ao *ampC*, levando a bactéria a adquirir resistência contra antimicrobianos das classes das penicilinas e cefalosporinas (ISLAM et al., 2021).

Resistência a aminoglicosídeos mediado pelos genes presentes em plasmídeos *aac3-IIa* e *aadA2* são frequentemente encontrados em integrons que desempenham um papel significativo na aquisição e disseminação de genes de resistência a antibióticos entre bactérias. Os integrons estão bem incorporados e amplamente disseminados, reforçando sua contribuição para a propagação da resistência aos aminoglicosídeos em populações bacterianas (LAY et al., 2012).

5.4 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS BACTERIÓFAGOS

Dos isolados de bactérias sequenciadas não foi possível identificar bacteriófagos em todas, no entanto em algumas delas foi possível identificar a presença de mais de um bacteriófagos, como demonstrado no Quadro 6.

QUADRO 6 - Análise da presença de bacteriófagos a partir de amostras de *Escherichia coli* isoladas de águas residuárias

Amostra	Bacteriófagos
1	<i>Escherichia virus Lambda 2H10</i> <i>Escherichia virus Lambda 4A7</i>
2	<i>Escherichia phage Lambda ev099</i> <i>Shigella phage SfIV</i> <i>Escherichia phage Lambda ev243</i> <i>Escherichia virus Lambda 2H10</i>
4	<i>Escherichia virus Lambda 2H10</i> <i>Escherichia virus Lambda 4A7</i>
6	<i>Escherichia virus Lambda 2H10</i>
7	<i>Escherichia phage Lambda ev243</i>
12	<i>Escherichia virus Lambda 2H10</i> <i>Escherichia phage Lambda ev099</i> <i>Salmonella phage 118970 sal3</i> <i>Escherichia virus Lambda 4A7</i>
14	<i>Escherichia phage Lambda ev099</i>
15	<i>Escherichia phage Lambda ev243</i> <i>Escherichia virus Lambda 2H10</i> <i>Escherichia phage Lambda ev099</i>

Fonte: Elaborado pelo autor

A capacidade de transmissão de genes de resistência mediada por bacteriófagos através do processo de transdução é um tópico que foi demonstrado anteriormente em alguns estudos, onde utilizaram bacteriófagos lambda isolados de águas nesse processo, além disso também é possível a observação desses fenômenos em amostras de esgoto (SUN et al., 2021; RUNA et al., 2021).

Estudo utilizando modelos animais para avaliar a transmissão de genes por meio de transdução demonstrou que os bacteriófagos possuem seu número de genes codificados aumentado quando a célula hospedeira é alvo de um antimicrobiano, no entanto foi observado que não somente o antimicrobiano testado teve sua eficácia reduzida como também os representantes de outras classes, que

além de tornar a terapia falha, dá oportunidades de bactérias suscetíveis receberem os genes de resistência por meio da transdução (MODI et al., 2013).

Existem estudos que demonstram que o mecanismo de CRISPR-Cas (Repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente inter espaçadas), um mecanismo adaptativo de defesa bacteriana pode ser um fator resultante da transmissão de genes entre bacteriófagos e bactérias, o que ressalta a importância de estudos neste ramo, visto que os resultados ainda são escassos (WATSON; STAALS; FINERAN, 2018).

Os bacteriófagos identificados são em sua maioria *Escherichia virus Lambda* que pertencem à ordem caudovirales, família *Siphoviridae* e gênero *Lambdavirus*. São amplamente conhecidos como fago lambda ou bacteriófago λ , e seu hospedeiro natural é *Escherichia coli*. Podem ser facilmente distinguidos de outros vírus pela presença de uma cauda longa, não contrátil e fina, além de uma cabeça icosaédrica e material genético do tipo DNA de fita dupla (FERMIN; MAZUMDAR-LEIGHTON; TENNANT, 2018).

São fagos que possuem a capacidade de transmitir genes de virulência como os genes *bla* e *aac* (KLEINHEINZ; JOENSEN; LARSEN, 2014). Ambos os grupos de genes de virulência possuem representantes neste estudo e são *blaCMY-5*, *blaACT-2*, *aac3-IIa* e *aadA2*.

5.5 COBERTURA DO SEQUENCIAMENTO E LIMITAÇÕES

O sequenciamento realizado obteve variações em suas coberturas que apresentaram alguns impactos neste estudo. A média total das coberturas do sequenciamento foi em torno de 85% considerando os 15 isolados, dessa maneira foi possível identificar e estudar a presença de genes de resistência, virulência e de plasmídeos, no entanto a análise de sorotipagem não se mostrou satisfatória pois não foi possível classificar os isolados ao utilizar o *sorotyper 2.0*. Esta problemática pode ser devido aos métodos utilizados no estudo que dificultaram a análise.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou a visualização da presença de ao todo, 62 genes de resistências referentes à *Escherichia coli* isoladas de esgoto bruto de duas cidades com características distintas sendo uma portuária (Itajaí) e outra turística (Florianópolis), além da presença de seis espécies de bacteriófagos que estavam presentes nas amostras analisadas, sendo que em ambas as localizações foram observadas resistências.

As águas residuárias são uma das matrizes mais importantes no que diz respeito ao monitoramento e epidemiologia das resistências bacterianas, mostrando-se importante no contexto de Saúde Única, sendo fonte de estudo para diversos setores como a pecuária, a área da saúde e também a científica. Como ficou elucidado neste trabalho, as bactérias possuem uma grande variedade de mecanismos de resistência mesmo entre membros de uma mesma espécie, o que traz uma preocupação quanto à disseminação de genes que propiciam sua evolução como os de resistência, virulência e os plasmídeos.

Os bacteriófagos identificados neste estudo se mostraram capazes de transmitir genes que impactam diretamente na virulência das bactérias, culminando em sua patogenicidade. Dessa forma, o estudo dos bacteriófagos se torna uma ferramenta importante para avaliar quais destes podem ser transmitidos via transdução.

REFERÊNCIAS

- AHMED, I.; RABBI, MD. B.; SULTANA, S. Antibiotic resistance in Bangladesh: A systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 80, p. 54–61, mar. 2019.
- AKTER, S.; CHOWDHURY, A. M. M. A.; MINA, S. A. Antibiotic Resistance and Plasmid Profiling of Escherichia coli Isolated from Human Sewage Samples. **Microbiology Insights**, v. 14, p. 117863612110168, jan. 2021.
- ARNOLD, B. J.; HUANG, I-TING.; HANAGE, W. P. Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, 12 nov. 2021.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4_ts, p. 493–496, 1 abr. 1966.
- CHANG, Q. et al. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? **Evolutionary Applications**, v. 8, n. 3, p. 240–247, 2 ago. 2014.
- CHEN, B.; HAN, J.; DAI, H.; JIA, P. Biocide-tolerance and antibiotic-resistance in community environments and risk of direct transfers to humans: Unintended consequences of community-wide surface disinfecting during COVID-19? **Environmental Pollution**, v. 283, p. 117074, ago. 2021.
- CLOKIE, M. R. J. et al. Phages in nature. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 31–45, jan. 2011.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 30 ago. 2010.
- DIMIDI, E. et al. Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1806, 5 ago. 2019.
- EL-SAYED, A.; ALEYA, L.; KAMEL, M. Microbiota's Role in Health and Diseases. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 28, n. 28, p. 1–17, 27 maio 2021.
- FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 6, p. PMC.S14459, jan. 2014.
- FERMIN, G.; MAZUMDAR-LEIGHTON, S.; TENNANT, P. Viruses of Prokaryotes, Protozoa, Fungi, and Chromista. **Viruses**, p. 217–244, 2018.
- FERRO, P. et al. Water quality and phenotypic antimicrobial resistance in isolated of E. coli from water for human consumption in Bagua, under One Health approach. **Heliyon**, v. 10, n. 1, p. e23961–e23961, 1 jan. 2024.

FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures 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. 226–236, 1929.

FRAZÃO, N. et al. Horizontal gene transfer overrides mutation in *Escherichia coli* colonizing the mammalian gut. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 36, p. 17906–17915, 20 ago. 2019.

GAYNES, R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 849–853, 23 maio 2017.

GOLOWCZYC, M.; GOMEZ-ZAVAGLIA, A. Food Additives Derived from Fruits and Vegetables for Sustainable Animal Production and Their Impact in Latin America: An Alternative to the Use of Antibiotics. **Foods**, v. 13, n. 18, p. 2921, 15 set. 2024.

HARADA, L. K. et al. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. **Microbiological Research**, v. 212-213, p. 38–58, jul. 2018.

HARRIS, J. B. et al. Cholera. **The Lancet**, v. 379, n. 9835, p. 2466–2476, jun. 2012.

HIRAKAWA, H. et al. AcrS/EnvR Represses Expression of the *acrAB* Multidrug Efflux Genes in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 18, p. 6276–6279, 20 jun. 2008.

HOFFMAN, J. A. et al. *Escherichia coli* K1 *aslA* Contributes to Invasion of Brain Microvascular Endothelial Cells In Vitro and In Vivo. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 5062–5067, set. 2000.

HORIYAMA, T.; NISHINO, K. AcrB, AcrD, and MdtABC Multidrug Efflux Systems Are Involved in Enterobactin Export in *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108642, 26 set. 2014.

HUEMER, M. et al. Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. **EMBO reports**, v. 21, n. 12, 3 dez. 2020.

HUTINEL, M. et al. Population-level surveillance of antibiotic resistance in *Escherichia coli* through sewage analysis. **Eurosurveillance**, v. 24, n. 37, 12 set. 2019.

ISLAM, MD. S. et al. Detection of *bla*TEM, *bla*CTX-M, *bla*CMY, and *bla*SHV Genes Among Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Migratory Birds Travelling to Bangladesh. **Microbial Ecology**, 27 jul. 2021.

JOHURA, F.-T. et al. The Antimicrobial Resistance of Enterotoxigenic *Escherichia coli* from Diarrheal Patients and the Environment in Two Geographically Distinct Rural Areas in Bangladesh over the Years. **Microorganisms**, v. 12, n. 2, p. 301, 1 fev. 2024.

JUNG, B., & HOILAT, G. J. (2020). MacConkey Medium. In **StatPearls**.

KASMAN, L. M.; PORTER, L. D. Bacteriophages. In **StatPearls**.

KLEINHEINZ, K. A.; JOENSEN, K. G.; LARSEN, M. V. Applying the ResFinder and VirulenceFinder web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and *E. coli* virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. **Bacteriophage**, v. 4, n. 2, p. e27943, 22 jan. 2014.

LARSSON, D. G. J.; FLACH, C.-F. Antibiotic resistance in the environment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 1–13, 4 nov. 2021.

LAY, K. K. et al. Antimicrobial Resistance, Virulence, and Phylogenetic Characteristics of *Escherichia coli* isolates from Clinically Healthy Swine. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 11, p. 992–1001, nov. 2012.

LECLERC, Q. J. et al. Growth-Dependent Predation and Generalized Transduction of Antimicrobial Resistance by Bacteriophage. **mSystems**, 21 mar. 2022.

LU, H.; GIORDANO, F.; NING, Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 14, n. 5, p. 265–279, out. 2016.

MADIGAN, M. T.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; SATTLEY, W. M.; STAHL, D. A. *Microbiologia de Brock*. 14. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2016.

MATTHEW MUELLER; CHRISTOPHER R. TAINTER. (2023). *Escherichia Coli Infection* Medscape. **NCBI Bookshelf**.

MCVEY, S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Veterinary Microbiology**. 3rd. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2016.

MEENA, M. et al. Virulence Factors and Their Associated Genes in Microbes. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 181–208, 2019.

MODI, S. R. et al. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. **Nature**, v. 499, n. 7457, p. 219–222, 9 jun. 2013.

MUNHOZ, D. D. et al. *E. coli* Common pili promote the fitness and virulence of a hybrid aEPEC/ExPEC strain within diverse host environments. **Gut microbes**, v. 15, n. 1, 22 mar. 2023.

NADGIR, C. A.; BISWAS, D. A. Antibiotic Resistance and Its Impact on Disease Management. **Antibiotic Resistance and Its Impact on Disease Management**, v. 15, n. 4, 28 abr. 2023.

O'MEARA, S. Antimicrobial resistance. **Nature**, v. 586, n. 7830, p. S49–S49, 21 out. 2020.

PÉREZ-PALACIOS, P. et al. Implications of two-component systems *EnvZ/OmpR* and *BaeS/BaeR* in *in vitro* temocillin resistance in *Escherichia coli*. **The journal of antimicrobial chemotherapy**, 2 fev. 2024.

PUÉRTOLAS-BALINT, F. et al. Mutations that increase expression of the EmrAB-TolC efflux pump confer increased resistance to nitroxoline in *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 21 out. 2019.

RAESIDE, C. et al. Large Chromosomal Rearrangements during a Long-Term Evolution Experiment with *Escherichia coli*. **mBio**, v. 5, n. 5, 31 out. 2014.

RAYMOND, K. N.; DERTZ, E. A.; KIM, S. S. Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 7, p. 3584–3588, 24 mar. 2003.

ROTH, N. et al. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. **Poultry Science**, v. 98, n. 4, p. 1791–1804, 13 dez. 2018.

SADEGHI, M.; SEDIGH EBRAHIM-SARAIE, H.; MOJTAHEDI, A. Prevalence of ESBL and AmpC genes in *E. coli* isolates from urinary tract infections in the north of Iran. **New Microbes and New Infections**, v. 45, p. 100947, jan. 2022.

SANTOS, Norma Suely de Oliveira; ROMANS, Paulo; WIGG, José. *Virologia Humana*. 3. ed. São Paulo: **Editora Atheneu**, 2021.

SHARMA, S. et al. Bacteriophages and its applications: an overview. **Folia Microbiologica**, v. 62, n. 1, p. 17–55, 8 out. 2016.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF Mass spectrometry: an Emerging Technology for Microbial Identification and Diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 791, 5 ago. 2015.

SMITH, W. P. J. et al. Bacterial defences: mechanisms, Evolution and Antimicrobial Resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, p. 1–16, 24 abr. 2023.

SPAGNOLO, F.; TRUJILLO, M.; DENNEHY, J. J. Why Do Antibiotics Exist? **mBio**, v. 12, n. 6, 21 dez. 2021.

SUN, R. et al. Bacterial Concentrations and Water Turbulence Influence the Importance of Conjugation Versus Phage-Mediated Antibiotic Resistance Gene Transfer in Suspended Growth Systems. **ACS Environmental Au**, 30 nov. 2021.

SUN, W. Chapter 12 Plague vaccines: status and future. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 918, p. 313–360, 2016.

SUNG, K. et al. Whole-Genome Sequence Analysis of Antibiotic Resistance, Virulence, and Plasmid Dynamics in Multidrug-Resistant *E. coli* Isolates from Imported Shrimp. **Foods**, v. 13, n. 11, p. 1766–1766, 5 jun. 2024.

SIRYAPORN, A.; GOULIAN, M. Cross-talk suppression between the CpxA-CpxR and EnvZ-OmpR two-component systems in *E. coli*. *Molecular Microbiology*, v. 70, n. 2, p. 494–506, out. 2008.

TADESSE, H. A. et al. Antimicrobial Resistance Profile of *E. coli* Isolated from Raw Cow Milk and Fresh Fruit Juice in Mekelle, Tigray, Ethiopia. *Veterinary Medicine International*, v. 2018, p. 1–7, 2018.

WATSON, B. N. J.; STAALS, R. H. J.; FINERAN, P. C. CRISPR-Cas-Mediated Phage Resistance Enhances Horizontal Gene Transfer by Transduction. *mBio*, v. 9, n. 1, 13 fev. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. One Health Global. Disponível em: . YU, D. et al. Naturalized *Escherichia coli* in Wastewater and the Co-evolution of Bacterial Resistance to Water Treatment and Antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 30 maio 2022.

ANEXO A – Tabela de pontos de cortes do BrCAST 2024 para a técnica de disco-difusão

Enterobacterales*

Regras de Especialistas e Fenótipos Esperados

Para abreviações e explicações sobre pontos de corte, ver aba de Notas

Determinação da CIM: (Microdiluição em caldo de acordo com a padronização ISO 20776-1, exceto para fosfomicina, para qual diluição em agar é usada).
 Meio de cultura: Caldo Mueller-Hinton glicon-ajustado (para cefidroxilo, ver <https://www.eucast.org/eucastguidance/documents/>).
 Inóculo: 5×10^8 UFC/mL.
 Incubação: Painéis selados, ar ambiente, 35±1°C, 18±2h.
 Leituras: Salvo orientação contrária, ler a CIM como a menor concentração do antimicrobiano que visualmente inibe por completo o crescimento bacteriano. Consultar "Guia de leitura do BrCAST-EUCAST para microdiluição em caldo" para mais informações.
 Controle de qualidade: Escherichia coli ATCC 25922. Para agentes não avaliados por tal cepa e para o controle do componente inibidor da combinação betalactâmico-inibidor de betalactamase, ver Tabelas de CQ do BrCAST-EUCAST.

Tabela de Pontos de Corte Clínicos do BrCAST-EUCAST, válida a partir de 13-04-2024

Disco-difusão (método de disco-difusão padronizado pelo EUCAST)
 Meio de cultura: Agar Mueller-Hinton
 Inóculo: McFarland 0.5
 Incubação: Ar ambiente, 35±1°C, 18±2h
 Leituras: Salvo orientação contrária, ler as bordas dos halos de inibição do ponto em que não há mais crescimento, visto da parte posterior da placa, contra um fundo escuro e sob luz refletida. Consultar "Guia de leitura do BrCAST-EUCAST para disco-difusão" para mais informações.
 Controle de qualidade: Escherichia coli ATCC 25922. Para agentes não avaliados por tal cepa e para o controle de componente inibidor dos discos de combinação betalactâmico-inibidor de betalactamase, ver Tabelas de CQ do BrCAST-EUCAST.

*Estudos taxonômicos recentes estreitaram a definição da família Enterobacteriaceae. Alguns membros anteriormente pertencentes a esta família estão agora incluídos em outras famílias da ordem Enterobacterales [Adeolu M et al. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(12):5575-5599]. Os pontos de corte desta tabela são aplicáveis a todos os membros da ordem Enterobacterales.

Penicilinas	Ponto de corte p/ CIM (mg/L)				Conteúdo do disco (µg)	Ponto de corte p/ diâmetro do halo (mm)				Notas
	S ≤	I	R >	AIT		S ≥	I	R <	AIT	
Ampicilina iv ¹	8	-	>8		10	14 ^A	-	<14 ^A		1. Para obter informações sobre como implementar os novos pontos de corte de aminopenicilinas, consultar https://www.eucast.org/eucastguidance/documents/ . 2. Para fins de teste de sensibilidade, a concentração de sulfactam é fixada em 4 mg/L. 3.D. Para obter informações sobre como usar pontos de corte entre parênteses, consultar https://www.eucast.org/eucastguidance/documents/ . 4. Para fins de teste de sensibilidade, a concentração de ácido clavulânico é fixada em 2 mg/L. 5. Para fins de teste de sensibilidade, a concentração de tazobactam é fixada em 4 mg/L. A. Ignorar o crescimento que pode aparecer como um halo interno fino em alguns lotes de agar Mueller-Hinton. B. Sensibilidade inferida da ampicilina (iv ou oral). C. Isolados Sensíveis à ampicilina (iv ou oral) podem ser reportados como "Sensível, aumentando exposição" (I) à "Amoxicilina oral (infecções com origem no trato urinário)". Isolados Resistentes à ampicilina (iv ou oral) podem ser reportados como Resistentes à "amoxicilina oral (infecções com origem no trato urinário)". E. Inferir da ampicilina oral, mas o laudo deve explicar o significado dos pontos de corte entre parênteses. F. Ignorar colônias isoladas dentro do halo de inibição.
Ampicilina oral (exclusivamente infecção urinária (ITU não complicada) ¹	8	-	>8		10	14 ^A	-	<14 ^A		
Ampicilina-sulbactam iv ¹	8 ^B	-	>8 ^B		10-10	14 ^A	-	<14 ^A		
Ampicilina-sulbactam oral (exclusivamente ITU não complicada) ¹	8 ^B	-	>8 ^B		10-10	14 ^A	-	<14 ^A		
Amoxicilina iv ¹	8	-	>8		-	Nota ^B	-	Nota ^B		
Amoxicilina oral (infecções com origem no trato urinário) ¹	0,001	0,002-8	>8		-	Nota ^B	-	Nota ^B		
Amoxicilina oral (exclusivamente ITU não complicada) ¹	8	-	>8		-	Nota ^B	-	Nota ^B		
Amoxicilina oral (outras indicações) ¹	(8) ^B	-	(>8) ^B		-	Nota ^B	-	Nota ^B		
Amoxicilina-ácido clavulânico iv ¹	8 ^B	-	>8 ^B		20-10	19 ^A	-	<19 ^A	19-20	
Amoxicilina-ácido clavulânico oral (infecções com origem no trato urinário) ¹	0,001 ^F	0,002-8	>8 ^A		20-10	50 ^F	19-49	<19 ^A	19-20	
Amoxicilina-ácido clavulânico oral (exclusivamente ITU não complicada) ¹	32 ^A	-	>32 ^A		20-10	16 ^A	-	<16 ^A		
Amoxicilina-ácido clavulânico oral (outras indicações) ¹	(8) ^B	-	(>8) ^B		20-10	(19) ^B	-	(<19) ^B	19-20	
Piperacilina-tazobactam	8 ^B	-	>8 ^B	16	30-4	20	-	<20	19	
Temocilina (infecções com origem no trato urinário), E. coli, Klebsiella spp. (exceto K. aerogenes) e P. mirabilis	0,001	0,002-16	>16		30	50 ^F	17-49	<17 ^F		

Enterobacterales

Regras de Especialistas e Fenótipos Esperados

Para abreviações e explicações sobre pontos de corte, ver aba de Notas

Tabela de Pontos de Corte Clínicos do BrCAST-EUCAST, válida a partir de 13-04-2024

Cefalosporinas ¹	Ponto de corte p/ CIM (mg/L)				Conteúdo do disco (µg)	Ponto de corte p/ diâmetro do halo (mm)				Notas
	S ≤	I	R >	AIT		S ≥	I	R <	AIT	
Cefaclor (exclusivamente ITU não complicada)	EI	EI	EI		30	EI	EI	EI		1. Os pontos de corte de cefalosporinas para Enterobacterales permitem detectar todos os mecanismos de resistência clinicamente relevantes (incluindo ESBL e AmpC medidos por plasmídeos). Alguns isolados produtores de β-lactamases são sensíveis (S ou I) às cefalosporinas de 3 ^o e 4 ^o gerações, considerando-se estes pontos de corte, e devem ser reportados de acordo com o resultado do teste, ou seja, a presença ou ausência de ESBL, não influencia na categorização da sensibilidade. A detecção e caracterização de ESBL são recomendadas para fins de saúde pública e controle de infecções. 2.A. Isolados sensíveis à cefadroxila e/ou cefalexina podem ser reportados como "sensível, aumentando exposição" (I) para cefazolina. 3. A determinação da CIM por microdiluição deve ser realizada com caldo Mueller-Hinton sem ferro e as instruções de leitura específicas devem ser seguidas. Para condições de teste e instruções de leitura, consultar http://www.eucast.org/eucastguidance/documents/ . 4. O ECOFF (8 mg/L) de cefotaxima apresenta alta sensibilidade, porém baixa especificidade para a identificação de Enterobacterales produtoras de AmpC, uma vez que este fármaco é afetado também por alterações de permeabilidade e algumas carbapenemases. Isolados classicamente não produtores de AmpC têm perfil selvagem, enquanto os produtores de AmpCs plasmidiais ou hiperprodutores de AmpC cromossômica têm perfil não selvagem. 5. Para fins de testes de sensibilidade, a concentração de avibactam é fixada em 4 mg/L. 6. Ver tabela de dosagens para doses para diferentes indicações. 7. Para fins de testes de sensibilidade, a concentração de tazobactam é fixada em 4 mg/L.
Cefadroxila (exclusivamente ITU não complicada)	16	-	>16		30	12	-	<12		
Cefalexina (exclusivamente ITU não complicada)	16	-	>16		30	14	-	<14		
Cefazolina (infecções com origem no trato urinário), E. coli e Klebsiella spp. (exceto K. aerogenes)	0,001 ^F	0,002-4 ^F	>4 ^F		30	50 ^F	20-49 ^F	<20 ^F		
Cefepima	1	2-4	>4		30	27	24-26	<24		
Cefiderocol	2 ^F	-	>2 ^F		30	23	-	<23	21-23	
Cefotaxima (infecções não meningéas)	1	2	>2		3	20	17-19	<17		
Cefotaxima (meningite)	1	-	>1		30	20	-	<20		
Cefotaxima (exclusivamente triagem) ²	Nota ^F	Nota ^F	Nota ^F		30	19	-	<19		
Cefpodoxima (exclusivamente ITU não complicada)	1	-	>1		10	21	-	<21		
Ceftarolina	0,5	-	>0,5		3	23	-	<23	22-23	
Ceftazidima	1	2-4	>4		10	22	19-21	<19		
Ceftazidima-avibactam	8 ^B	-	>8 ^B		10	13	-	<13		
Ceftiozama-tazobactam ³	2 ^F	-	>2 ^F		30-10	22	-	<22	19-21	
Ceftriaxona (infecções não meningéas)	1	2	>2		30	25	22-24	<22		
Ceftriaxona (meningite)	1	-	>1		30	25	-	<25		
Cefuroxima IV, E. coli, Klebsiella spp. (exceto K. aerogenes), Raoultella spp. e P. mirabilis	0,001	0,002-8	>8		30	50	19-49	<19		
Cefuroxima oral (exclusivamente ITU não complicada), E. coli, Klebsiella spp. (exceto K. aerogenes), Raoultella spp. e P. mirabilis	8	-	>8		30	19	-	<19		

Enterobacterales

Regras de Especialistas e Fenótipos Esperados

Para abreviações e explicações sobre pontos de corte, ver aba de Notas

Tabela de Pontos de Corte Clínicos do BrCAST-EUCAST, válida a partir de 13-04-2024

Fluoroquinolonas	Ponto de corte p/ CIM (mg/L)				Conteúdo do disco (µg)	Ponto de corte p/ diâmetro do halo (mm)				Notas
	S ≤	I	R >	AIT		S ≥	I	R <	AIT	
Ciprofloxacino, <i>Salmonella</i> spp. ¹	0,06	-	>0,06			Nota ⁸	Nota ⁸	Nota ⁸		<p>1. Existem evidências clínicas que indicam uma resposta inadequada ao tratamento com ciprofloxacino em infecções sistêmicas causadas por <i>Salmonella</i> spp. com qualquer mecanismo de resistência detectável às fluoroquinolonas. Os dados disponíveis relacionam-se principalmente a <i>Salmonella</i> Typhi, mas também há relatos de casos com resposta inadequada em relação à outras espécies de <i>Salmonella</i>.</p> <p>2/B. Na meningite, <u>grde todos os mecanismos de resistência às fluoroquinolonas devem ser excluídos</u>, determinar a CIM ou inferir a sensibilidade a partir do teste de triagem com disco de pefloxacino 5 µg.</p> <p>3. Pontos de corte para fluoroquinolonas estão disponíveis para outros agentes.</p> <p>A. Os testes com disco de ciprofloxacino de 5 µg não são confiáveis para <u>excluir todos os mecanismos de resistência às fluoroquinolonas</u> em <i>Salmonella</i> spp. Para triagem de resistência ao ciprofloxacino em <i>Salmonella</i> spp., determinar a CIM para ciprofloxacino ou utilizar discos de pefloxacino 5 µg.</p> <p>C. O teste de triagem com pefloxacino (disco de 5 µg) pode também ser utilizado para detectar mecanismos de resistência às fluoroquinolonas em outras Enterobacterales, como <i>E. coli</i>, <i>K. pneumoniae</i> e <i>Shigella</i> spp.</p> <p>D. O teste de disco-difusão aguarda ação da indústria farmacêutica responsável.</p>
Ciprofloxacino (infecções não meningeas)	0,25	0,5	>0,5	0,5	5	25	22-24	<22	22-24	
Ciprofloxacino (meningite) ²	0,125	-	>0,125			Nota ⁸	Nota ⁸	Nota ⁸		
Pefloxacino (exclusivamente triagem)	NA	NA	NA		5	24 ^{8a,c}	-	<24 ^{8a,c}		
Delafloxacino, <i>E. coli</i>	0,125	-	>0,125			Nota ⁸	Nota ⁸	Nota ⁸		
Levofloxacino	0,5	1	>1		5	23	19-22	<19		
Moxifloxacino, Enterobacterales exceto <i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus</i> spp. e <i>Serratia</i> spp. ³	0,25	-	>0,25		5	22	-	<22		
Ácido nalidixico (exclusivamente triagem)	NA	NA	NA			NA	NA	NA		
Norfloxacino (exclusivamente ITU não complicada)	0,5	-	>0,5		10	24	-	<24		
Oflxacino	0,25	0,5	>0,5		5	24	22-23	<22		

Aminoglicosídeos ^{1,2}	Ponto de corte p/ CIM (mg/L)				Conteúdo do disco (µg)	Ponto de corte p/ diâmetro do halo (mm)				Notas
	S ≤	I	R >	AIT		S ≥	I	R <	AIT	
Amicacina (infecções sistêmicas)	(8) ¹	-	>(8) ¹		30	(16) ²	-	<(16) ²		<p>1. Para obter informações sobre como usar pontos de corte entre parênteses, consultar https://www.eucast.org/eucastguidancedocuments/.</p> <p>2. Os pontos de corte não se aplicam a <i>Plesiomonas shigelloides</i> visto que aminoglicosídeos têm baixa atividade contra esta espécie.</p>
Amicacina (infecções sistêmicas com origem no trato urinário)	8	-	>8		30	16	-	<16		
Gentamicina (infecções sistêmicas)	(2) ¹	-	>(2) ¹		10	(17) ²	-	<(17) ²		
Gentamicina (infecções sistêmicas com origem no trato urinário)	2	-	>2		10	17	-	<17		
Netilmicina	El	El	El			El	El	El		
Tobramicina (infecções sistêmicas)	(2) ¹	-	>(2) ¹		10	(16) ²	-	<(16) ²		
Tobramicina (infecções sistêmicas com origem no trato urinário)	2	-	>2		10	16	-	<16		

Macrolídeos	Ponto de corte p/ CIM (mg/L)				Conteúdo do disco (µg)	Ponto de corte p/ diâmetro do halo (mm)				Notas
	S ≤	I	R >	AIT		S ≥	I	R <	AIT	
Azitromicina ¹	-	-	-			-	-	-		<p>1. A azitromicina tem sido utilizada no tratamento de infecções entéricas, principalmente por <i>Salmonella</i> Typhi e espécies de <i>Shigella</i>. Embora as distribuições de tipo selvagem variem um pouco, isolados com CIM acima de 16 mg/L (diâmetros de halo de inibição <12 mm com disco de azitromicina 15 µg) provavelmente têm mecanismos de resistência à azitromicina.</p>

Enterobacterales

Regras de Especialistas e Fenótipos Esperados

Para abreviações e explicações sobre pontos de corte, ver aba de Notas

Tabela de Pontos de Corte Clínicos do BrCAST-EUCAST, válida a partir de 13-04-2024

Tetraciclina	Ponto de corte p/ CIM (mg/L)				Conteúdo do disco (µg)	Ponto de corte p/ diâmetro do halo (mm)				Notas
	S ≤	I	R >	AIT		S ≥	I	R <	AIT	
Doxiciclina	-	-	-			-	-	-		<p>1. A tetraciclina tem sido utilizada para prevenir a sensibilidade à doxiciclina no tratamento de infecções por <i>Yersinia enterocolitica</i> (CIM de tetraciclina ≤ 4 mg/L para isolados selvagens). O diâmetro de halo correspondente para o disco de 30 µg de tetraciclina é ≥19 mm.</p> <p>2. Para determinação da CIM de tetraciclina por microdiluição, o meio deve ser fresco, preparado no dia do uso.</p> <p>3/A. Para outras Enterobacterales, a atividade de tetraciclina varia de insuficiente em <i>Proteus</i> spp., <i>Morganella morganii</i> e <i>Providencia</i> spp. para variável em outras espécies. Para mais informações, consultar http://www.eucast.org/eucastguidancedocuments/.</p> <p>B. Pontos de corte de diâmetro do halo de inibição validados apenas para <i>E. coli</i>. Para <i>C. koseri</i>, usar um método de determinação da CIM.</p>
Eravaciclina, <i>E. coli</i>	0,5	-	>0,5		20	17	-	<17		
Minociclina	-	-	-			-	-	-		
Tetraciclina ¹	-	-	-			-	-	-		
Tigeciclina, <i>E. coli</i> e <i>C. koseri</i>	0,5 ^{3,4}	-	>0,5 ^{3,4}		15	16 ^{5,6}	-	<16 ^{5,6}		

Agentes diversos	Ponto de corte p/ CIM (mg/L)				Conteúdo do disco (µg)	Ponto de corte p/ diâmetro do halo (mm)				Notas
	S ≤	I	R >	AIT		S ≥	I	R <	AIT	
Cloranfenicol	Nota ⁷	Nota ⁷	Nota ⁷			Nota ⁸	Nota ⁸	Nota ⁸		<p>1. A eficácia contra Enterobacterales é incerta. Os valores de corte de triagem podem ser utilizados para distinguir isolados de tipo selvagem de isolados com resistência adquirida (CIM >16 mg/L; diâmetro do halo <17 mm para o disco de cloranfenicol 30 µg). Para o tratamento de meningites com cloranfenicol, consultar a tabela de dosagens.</p> <p>2. A determinação da CIM de colistina ou polymixina B deve ser realizada por microdiluição em caldo. O controle de qualidade deve ser realizado tanto com uma cepa de CO sensível (<i>E. coli</i> ATCC 25922 ou <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853) quanto com a <i>E. coli</i> NCTC 13846 resistente à colistina (mcr-1 positivo).</p> <p>3. Para obter informações sobre como usar pontos de corte entre parênteses, consultar https://www.eucast.org/eucastguidancedocuments/.</p> <p>4. A diluição em água é o método de referência para testar fosfomicina. A CIM para fosfomicina deve ser determinada na presença de glicose-6-fosfato (25 mg/L no meio para os métodos de diluição em caldo e diluição em água). Seguir as instruções do fabricante caso seja utilizado um sistema comercial.</p> <p>5/E. Atualmente faltam evidências clínicas para apoiar pontos de corte clínicos.</p> <p>6/F. A realização do teste de sensibilidade antimicrobiana não é recomendada. Para obter informações sobre o uso de fosfomicina em terapia combinada em outras Enterobacterales, consultar https://www.eucast.org/eucastguidancedocuments/.</p> <p>7. Sulfametoxazol-trimetoprima na proporção 19:1. Os pontos de corte de CIM estão expressos como concentração de trimetoprima.</p> <p>8. Pontos de corte propostos pelo BrCAST.</p> <p>B. Utilizar um método de determinação da CIM (somente microdiluição em caldo).</p> <p>C. Os discos de fosfomicina de 200 µg devem conter 50 µg de glicose-6-fosfato.</p> <p>D. Pontos de corte para diâmetro de halo aplicáveis apenas a <i>E. coli</i>. Para outras Enterobacterales, determinar a CIM.</p> <p>D. Ignorar colônias isoladas dentro do halo de inibição. Ver figuras abaixo.</p>
Colistina ²	(2) ³	-	>(2) ³			Nota ⁸	Nota ⁸	Nota ⁸		
Polimixina B ^{3,4}	(2) ³	-	>(2) ³			Nota ⁸	Nota ⁸	Nota ⁸		
Fosfomicina iv (infecções com origem no trato urinário), <i>E. coli</i>	8 ⁵	-	>8 ⁵		200 ⁶	24 ⁶	-	<24 ⁶		
Fosfomicina iv (outras indicações), <i>E. coli</i>	Nota ⁷	Nota ⁷	Nota ⁷			Nota ⁸		Nota ⁸		
Fosfomicina iv, outras Enterobacterales	Nota ⁷	Nota ⁷	Nota ⁷			Nota ⁸		Nota ⁸		
Fosfomicina oral (exclusivamente para <i>E. coli</i> , em ITU não complicada)	8 ⁵	-	>8 ⁵		200 ⁶	24 ⁶	-	<24 ⁶		
Nitrofurantoina (exclusivamente ITU não complicada), <i>E. coli</i>	84	-	>84		100	11	-	<11		
Sulfametoxazol-trimetoprima ⁷	2	4	>4		23,75-1,25	14	11-13	<11		

ANEXO B - Tabela para avaliação de halos de inibição relacionados à nitrofurantoína

Tabela 2A. (Continuação)

Teste/ Relatório do Grupo	Agente Antimicrobiano	Conteúdo do Disco	Diâmetro do Halo de Inibição, em mm			CIM Equivalente Pontos de Corte (µg /mL)		Comentários
			R	I	S	R	S	
QUINOLONAS								
U	Cinoxacina	100 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 64	≤ 16	Ver comentário (13). (18) Além de testar isolados urinários, o ácido nalidíxico pode ser usado para testar sensibilidade reduzida a fluoroquinolona em isolados de pacientes com infecções extra-intestinais por <i>Salmonella</i> . Ver comentário (16).
O	Ácido nalidíxico	30 µg	≤ 13	14-18	≥ 19	≥ 32	≤ 8	
INIBIDORES DA VIA METABÓLICA DO FOLATO								
B	Sulfametoxazol-trimetoprim	23,75 µg/ 1,25	≤ 10	11-15	≥ 16	≥ 152/8	≤ 38/2	(19) O disco de sulfisoxazol pode ser usado para representar quaisquer dos preparados de sulfonamida atualmente disponíveis.
U	Sulfonamidas	250 ou 300 µg	≤ 12	13-16	≥ 17	≥ 350	≤ 100	
U	Trimetoprim	5 µg	≤ 10	11-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4	
C	Cloranfenicol	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8	(20) Não reportado rotineiramente para isolados do trato urinário.
NITROFURANTOINAS								
U	Nitrofurantoína	300 µg	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 128	≤ 32	
FOSFOMICINAS								
U	Fosfomicina	200 µg	≤ 12	13-15	≥ 16	≥ 256	≤ 64	(21) Indicado para uso apenas contra <i>E. coli</i> . O disco de 200 µg de fosfomicina contém 50 µg de glicose-6-fosfato.