



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Lucas Cafferati Beltrame

Caracterização do resistoma de amostras provenientes de ambientes de criação
animal e hospitalar do Estado de Santa Catarina, Brasil

Florianópolis

2021

Lucas Cafferati Beltrame

Caracterização do resistoma de amostras provenientes de ambientes de criação animal e hospitalar do Estado de Santa Catarina, Brasil

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rodrigo Zárate Bladés

Coorientadora: Profa. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cafferati Beltrame, Lucas

Caracterização do resistoma de amostras provenientes de ambientes de criação animal e hospitalar do Estado de Santa Catarina, Brasil / Lucas Cafferati Beltrame ; orientador, Carlos Rodrigo Zárate Bladés, coorientadora, Thaís Cristine Marques Sincero, 2021.

157 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Microrganismos Resistentes aos Antimicrobianos. 3. Granjas. 4. Hospitais. 5. Sequenciamento de Nova Geração. I. Zárate Bladés, Carlos Rodrigo. II. Cristine Marques Sincero, Thaís. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Lucas Cafferati Beltrame

Caracterização do resistoma de amostras provenientes de ambientes de criação animal e hospitalar do Estado de Santa Catarina, Brasil

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Carlos Rodrigo Zárate Bladés
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Alessandro Conrado de Oliveira Silveira
FURB - Fundação Universidade Regional de Blumenau

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências.

Prof. Dr. Glauber Wagner
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Carlos Rodrigo Zárate Bladés
Orientador

Florianópolis, 05 de Agosto de 2021

AGRADECIMENTOS

Acredito que um trabalho de tamanha dimensão não possa ser realizado sozinho. Por sorte tive muitas pessoas que me auxiliaram tecnicamente e emocionalmente ao longo desse período. A todas elas dedico este trabalho e demonstro meu imenso agradecimento!

Aos meus orientadores, Prof. Carlos e Profa. Thaís, que me permitiram participar deste lindo projeto o qual me permitiu descobrir o mundo da microbiologia. Agradeço por terem depositado muita confiança no meu trabalho desde o início até o fim e por terem demonstrado paciência ao ensinar as coisas mais simples.

Aos meus pais por me apoiarem nesse caminho, acreditarem no meu potencial e nos meus estudos. Aos meus irmãos por estarem do meu lado e por estarem sempre disponíveis para qualquer necessidade.

À Viviane por ser um grande alicerce ao longo do mestrado. Por me dar apoio emocional diariamente, me aconselhando e compartilhando muito sobre a vida. Por estar nos momentos bons, fazendo de tudo para melhorá-los ainda mais; e nos ruins, minimizando a tristeza.

Aos maiores parceiros de lab que pude ter. À Gabi e à Lívia por me acompanharem desde o início, compartilharem uma forte amizade e me ajudarem tanto com as atividades curriculares quanto às relacionadas ao meu projeto! À Elisa e à Karol por me ajudarem nas atividades do lab e serem grandes amigas. À Carol por ser muito parceira na finaleira do mestrado e pegar pesado nos experimentos. À Caetana, à Clarissa e à Dani pelos milhões de conselhos e ajuda científica. A todas elas eu agradeço imensamente pelo acolhimento quando cheguei no iREG e no MIMA. Aos demais colegas de lab agradeço pela amizade e parceria!

À CCIH, em especial à Patrícia, ao Sérgio e à Taíse por serem incríveis comigo sempre. A ajuda deles foi essencial para que este trabalho acontecesse.

Aos pacientes os quais entrevistei e que, mesmo com a voz trêmula por nunca ter realizado qualquer tipo de abordagem do gênero, me ouviram e aceitaram participar da pesquisa.

Aos Professores Glauber, Gislaine, Jussara e Maria Luiza por dedicarem seu tempo me ajudando ao longo do desenvolvimento do trabalho.

À todos os colegas e amigos do PPG que sempre foram parceiros dentro e fora da Universidade. Aos professores que em diversos momentos demonstraram interesse no trabalho e estiveram disponíveis para me aconselhar. Por serem imprescindíveis na lapidação do meu conhecimento, o papel de vocês é essencial na vida de um aluno.

Ao pessoal do LBMMS, em especial ao Marcos e Fernando, que me auxiliaram muito nos experimentos finais e foram muito gentis e empáticos comigo.

À todo o pessoal da Dance Ímpar por terem preenchido muito da minha vida, principalmente ao longo de 2019 e terem propiciado momentos maravilhosos que ficarão para sempre. A dança foi essencial para conseguir me manter firme durante o mestrado.

Ao Nilo e ao Picolito por todo o afeto que me proporcionaram e pelos infinitos momentos de carinho (e mordidas).

À Fundação Bill e Melinda Gates pelo financiamento, proporcionando o avanço científico.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

O uso indiscriminado de antimicrobianos na criação animal e em hospitais se tornou uma das maiores causas de preocupação para a saúde pública. Os microrganismos resistentes aos antimicrobianos (MRA) são uma das maiores causas de morte em todo o mundo. O aumento da resistência encontrada nesses microrganismos acelerou devido ao uso e à prescrição, muitas vezes indevidos, de antimicrobianos em hospitais e granjas. A mesorregião do oeste catarinense (SC) é reconhecida pelo grande potencial de criação de animais, tendo maior destaque para aves e suínos. Esse trabalho teve como objetivo caracterizar o resistoma dos ambientes de granjas e hospitalares em Santa Catarina, além de avaliar o potencial do sequenciamento baseado em nanoporos (MinION) como ferramenta de vigilância sanitária em relação à presença de MRA em granjas e hospitais. Para tanto, foi realizada a coleta de amostras representativas de granjas de suínos e aves de diversos sistemas de produção, veículos de transportes de pacientes e de pacientes hospitalizados no Hospital Universitário (HU-UFSC-EBSERH) em Florianópolis (SC). As amostras de granjas, veículos e pacientes foram submetidas ao sequenciamento baseado em nanoporos. Foram utilizados os programas EPI2ME e ResistoXplorer para averiguação dos perfis dos resistomas construídos. Além disso, reações de PCR foram realizadas para a detecção dos genes de resistência *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*. Principalmente, foi possível observar uma grande variedade de genes de resistência aos antimicrobianos, destacando-se aqueles relacionados às tetraciclinas, aos aminoglicosídeos e genes que conferem resistência a mais de uma classe de antimicrobianos. Os genes de resistência aos beta-lactâmicos e às fluoroquinolonas apresentaram maior predominância no ambiente hospitalar, devido ao extenso uso clínico desses fármacos. Além disso, foi possível observar maior heterogeneidade dentro dos grupos de granjas de suínos de agricultura familiar (GSAF) e de pacientes no momento da alta quando comparados com as granjas de suínos convencionais (GSC) e os pacientes no momento da internação, respectivamente, realçando o impacto dos diferentes sistemas de produção, o ambiente hospitalar e o uso de antimicrobianos. Foi notável a multiplicidade de configurações dos resistomas de todos os ambientes quanto a composição e diversidade. A plataforma MinION demonstrou grande versatilidade e rapidez na obtenção de resultados, e ainda serão realizados trabalhos futuros para a validação do seu uso como aliado à vigilância sanitária. Dessa forma, pode-se colaborar de forma significativa sobre o entendimento relativo ao resistoma presente nos ambientes hospitalares e de granjas no Estado de Santa Catarina.

Palavras-chave: Resistência aos antimicrobianos. Granjas. Hospitais. Saúde única. Criação animal. MDR. MinION.

ABSTRACT

The indiscriminate use of antimicrobials in animal husbandry and hospitals has become a major cause of concern for public health. Antimicrobial resistant microorganisms (ARM) are one of the biggest causes of death worldwide. The increase in resistance in these microorganisms accelerated due to the inappropriate use and prescription of antimicrobials in hospitals and farms. The mesoregion of western Santa Catarina (SC) is recognized for its great potential for raising animals, with greater emphasis on poultry and swine. This work aimed to characterize the resistome of farm and hospital environments in Santa Catarina, in addition to evaluating the potential of nanopore-based sequencing (MinION) as a health surveillance tool in relation to the presence of ARM in farms and hospitals. To this end, sampling was carried out from representative samples of swine and poultry farms from various production systems, shuttle buses for patients and hospitalized patients at the University Hospital (HU-UFSC-EBSERH) in Florianópolis (SC). The samples of farms, vehicles and patients were submitted to nanopore-based sequencing. EPI2ME and ResistoXplorer programs were used to investigate the profiles of the constructed resistomes. In addition, PCR reactions were performed to detect the resistance genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5*. Mainly, it was possible to observe a wide variety of antimicrobial resistance genes, highlighting those related to tetracyclines, aminoglycosides and genes that confer resistance to more than one class of antimicrobials. Beta-lactam and fluoroquinolone resistance genes are secondary with a predominance in the hospital environment, due to the extensive clinical use of drugs. In addition, it was possible to observe greater heterogeneity within the groups of family farming pig farms (GSAF) and patients at discharge when compared to conventional pig farms (GSC) and patients at admission, respectively, highlighting the impact of different production systems, the hospital environment and the use of antimicrobials. The multiplicity of resistome shapes of all environments was remarkable in terms of composition and diversity. MinION platform showed great versatility and speed in obtaining results, and future work will be carried out to validate its use as an ally with health surveillance. In this way, it was possible to significantly contribute to the understanding of the resistome present in hospital and farm environments in the State of Santa Catarina.

Keywords: Antimicrobial resistance. Farming. Hospitals. One health. Animal husbandry. MDR. MinION.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Histórico dos antimicrobianos.....	12
Figura 2. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos.....	14
Figura 3. A microbiota ambiental e a resistência aos antimicrobianos.....	19
Figura 4. Dinâmica de circulação de genes de resistência aos antimicrobianos, bactérias resistentes aos antimicrobianos e antimicrobianos.....	20
Figura 5. Produção de suínos em Santa Catarina (2014 - 2019).....	25
Figura 6. Produção de aves em Santa Catarina (2014 - 2019).....	26
Figura 7. Dados anuais das mortes atribuídas aos MRA.....	30
Figura 8. Amostragem e fluxograma da metodologia empregada.....	34
Figura 9. Localização geográfica das amostras.....	60
Figura 10. Prevalência da resistência de acordo com as classes de antimicrobianos.....	69
Figura 11. Prevalência da resistência de acordo com o mecanismo de ação.....	71
Figura 12. Análise de composição do resistoma por amostra baseado nas classes de antimicrobianos dos genes.....	78
Figura 13. Análise de composição do resistoma por amostra baseado nos mecanismos de ação dos genes.....	79
Figura 14. Análise de composição do resistoma por grupo amostral a nível de classe.....	80
Figura 15. Análise de composição do resistoma por grupo amostral a nível de mecanismo de ação.....	81
Figura 16. Índice de alfa-diversidade nos grupos amostrais.....	84
Figura 17. Análise de clusterização a nível de classes de antimicrobianos e mecanismos de ação.....	85
Figura 18. Mapas de calor sobre o perfil de resistoma a nível de classes de antimicrobianos e mecanismos de ação.....	88
Figura 19. Análises de Coordenadas Principais (PCoA).....	89
Figura 20. Resultado da PCR para <i>bla</i> _{CTX-M-1}	90
Figura 21. Resultado da PCR para <i>bla</i> _{CTX-M-2}	91
Figura 22. Resultado da PCR para <i>bla</i> _{CTX-M-9}	92

Figura 23. Resultado da PCR para <i>bla</i> _{KPC}	93
Figura 24. Resultado da PCR para <i>bla</i> _{NDM}	94
Figura 25. Resultado da PCR Multiplex para <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{TEM}	95
Figura 26. Resultado da PCR Multiplex para <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> , <i>mcr-4</i> e <i>mcr-5</i> ...	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de iniciadores e tamanho dos fragmentos.....	49
Tabela 2. Amostragem das granjas de suínos convencionais com e sem antimicrobianos.....	57
Tabela 3. Amostragem das granjas de suínos de agricultura familiar.....	58
Tabela 4. Amostragem das granjas de aves convencionais e de agricultura familiar.....	59
Tabela 5. Amostragem dos transportes de pacientes.....	61
Tabela 6. Amostragem dos pacientes internados no HU-UFSC-EBSERH.....	61
Tabela 7. Relatório de qualidade relacionado aos resultados do sequenciamento das amostras.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACC - do inglês, *aminoglycoside acetyltransferase*
- AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta
- ANT - do inglês, *aminoglycoside nucleotidyltransferase*
- APH - do inglês, *aminoglycoside phosphotransferase*
- ARG - do inglês, *antimicrobial resistance gene*
- ARMA - do inglês, *Antibiotic Resistance Mapping Application*
- BAL - Bactérias Ácido Lácticas
- BLAST - do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*
- CARD - do inglês, *Comprehensive Antimicrobial Resistance Database*
- CC - Ciclo Completo
- CCIH - Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
- CM - Clínica Médica
- CRISPR - do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
- EARS - do inglês, *European Antimicrobial Resistance Surveillance*
- EDTA - do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*
- EF-Tu - do inglês, *Elongation Factor Thermo unstable*
- ESBL - do inglês, *Extended-Spectrum Beta-Lactamase*
- FAO - do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
- GAAF - Granjas de Aves de Agricultura Familiar
- GAC - Granjas de Aves Convencionais
- GSAF - Granjas de Suínos de Agricultura Familiar
- GSC - Granjas de Suínos Convencionais
- GSNA - Granjas de Suínos Não-Antimicrobianos
- HU-UFSC-EBSERH - Hospital Universitário - Universidade Federal de Santa Catarina - Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
- iREG - Laboratório de Imunorregulação
- KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
- NARMS - National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria
- MCR - do inglês, *Mobilized Colistin Resistance*
- MFS - do inglês, *Major Facilitator Superfamily*

MIMA - Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada

MRA - Microrganismos Resistentes aos Antimicrobianos

NCBI - do inglês, *National Center for Biotechnology Information*

NDM - do inglês, *New Delhi Metallo Beta-lactamase*

OIE - do inglês, *World Organisation for Animal Health*. Anteriormente, *Office International des Epizooties*

OXA - do inglês, *Oxacillinases*

PBS - do inglês, *Phosphate buffered saline*

PCoA - do inglês, *Principal Coordinates Analysis*

PCR - do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

qPCR - do inglês, *quantitative PCR*

SCIH - Serviço de Controle de Infecção Hospitalar

SDS - do inglês, *Sodium dodecyl sulfate*

SHV - do inglês, *Sulfhydryl Reagent Variable*

TBE - do inglês, *Tris/Borate/EDTA*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGI - Trato Gastrointestinal

TMF - Transplante de Microbiota Fecal

TSA - Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

TSS - do inglês, *Total Sum Scaling*

VBP - Valor Bruto da Produção

VEB - do inglês, *Vietnamese extended-spectrum beta-lactamase*

UIC - Unidade de Internação Cirúrgica

UPD - Unidade Produtora de Leitões Desmamados

UPL - Unidade Produtora de Leitão

UT - Unidade de Terminação

WHO - do inglês, *World Health Organization*

WIMP - do inglês, *What's In My Pot?*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Saúde Única e a Resistência aos Antimicrobianos	17
1.2 Antimicrobianos - Histórico	17
1.3 Microbiota como reservatório de genes de resistência	19
1.4 Dinâmica de disseminação	24
1.5 Uso de antimicrobianos na criação animal	27
1.5.1 Cenário Santa Catarina - Suínos	30
1.5.2 Cenário Santa Catarina - Aves	31
1.6 Contexto hospitalar	33
1.7 Relevância global dos MRA e os esforços internacionais para seu controle	35
1.8 MinION como técnica para detecção de genes de resistência	37
2 JUSTIFICATIVA	38
3 HIPÓTESE	39
4 OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo Geral	39
4.2 Objetivos Específicos	39
5 MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1 Amostras	39
5.2 Núcleo de Granjas	41
5.2.1 Coleta e Armazenamento de Amostras	41
5.3 Núcleo de Transportes	42
5.3.1 Coleta e Armazenamento de Amostras	42
5.4 Núcleo de Pacientes	42
5.4.1 Recrutamento de pacientes	42
5.4.2 Coleta e Armazenamento de Amostras	43
5.4.3 Swabs	43
5.4.4 Amostras de fezes	44
5.4.5 Codificação das amostras de pacientes	44
5.5 Análises de metagenômica	44
5.5.1 Extração de DNA	45
5.5.1.1 Extração de DNA de amostras obtidas por swabs	45
5.5.1.2 Extração de DNA de amostras de fezes	46
5.5.1.3 Extração de DNA de amostras de granjas	48
5.5.2 Análise qualitativa e quantitativa dos DNA extraídos	48
5.5.2.1 Análise de DNA por fluorimetria	48
5.5.2.2 Análise de DNA por espectrofotometria	49
5.5.3 Preparação das bibliotecas para sequenciamento	49

5.5.4 Lavagens da Flow Cell	51
5.5.5 Resultado do Sequenciamento	52
5.5.5.1 Análise do resistoma	52
5.5.5.2 Análise exploratória, estatística e geração de gráficos	53
5.6 Confirmação da presença de ARG clinicamente relevantes por PCR convencional	54
5.6.1 PCR convencional para os genes <i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-9} , <i>bla</i> _{KPC} e <i>bla</i> _{NDM}	54
5.6.2 PCR Multiplex para os genes <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{TEM}	58
5.6.3 PCR Multiplex para os genes <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> , <i>mcr-4</i> e <i>mcr-5</i>	58
5.7 Eletroforese em Gel	59
5.7.1 Análise de produtos de PCR de genes <i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-9} , <i>bla</i> _{KPC} e <i>bla</i> _{NDM}	59
5.7.2 Análise de produtos de PCR de genes <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{TEM}	59
5.7.3 Análise de produtos de PCR de genes <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> , <i>mcr-4</i> e <i>mcr-5</i>	60
5.8 Sequenciamento de Sanger	60
6 RESULTADOS	61
6.1 Coleta de amostras	61
6.1.1 Granjas de suínos	61
6.1.2 Granjas de aves	62
6.1.3 Transportes	62
6.1.4 Pacientes	67
6.2 Resistoma	69
6.3 Genes comuns entre grupos amostrais	76
6.4 Frequência dos genes nos grupos amostrais	80
6.5 Análise de Composição e Alfa-Diversidade	82
6.6 Análises de agrupamento (clusterização)	89
6.7 Análise de coordenadas principais (PCoA)	92
6.8 PCR	95
6.8.1 <i>bla</i> _{CTX-M-1}	95
6.8.2 <i>bla</i> _{CTX-M-2}	96
6.8.3 <i>bla</i> _{CTX-M-9}	96
6.8.4 <i>bla</i> _{KPC}	97
6.8.5 <i>bla</i> _{NDM}	97
6.8.6 <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{TEM}	98
6.8.7 <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> , <i>mcr-4</i> e <i>mcr-5</i>	99
6.9 Sequenciamento de Sanger	99
6.9.1 <i>bla</i> _{CTX-M-1}	99
6.9.2 <i>bla</i> _{CTX-M-2}	100
6.9.3 <i>bla</i> _{CTX-M-9}	100
6.9.4 <i>bla</i> _{KPC}	101
6.9.5 <i>bla</i> _{NDM}	102
6.9.6 <i>bla</i> _{SHV}	102

6.9.7 <i>bla</i> _{TEM}	103
6.9.8 <i>mcr-1</i>	103
6.9.9 <i>mcr-4</i>	103
7 DISCUSSÃO	104
8 CONCLUSÃO	113
9 PERSPECTIVAS	114
10 REFERÊNCIAS	116
11 APÊNDICES	135

1 INTRODUÇÃO

1.1 Saúde Única e a Resistência aos Antimicrobianos

O conceito de Saúde Única refere-se à interconexão que é estabelecida entre diversos ecossistemas na disseminação e emergência de traços que influenciam a saúde humana, animal, vegetal e sua integração ambiental (HERNANDO-AMADO *et al.*, 2019). A resistência aos antimicrobianos é um dos maiores problemas associados à Saúde Única devido à sua forte relação com os microbiomas encontrados nos mais diversos ambientes. A comunicação, ou seja, a transmissão ecológica do resistoma entre microrganismos se deve a três principais aspectos: o espaço onde ocorre, o veículo por onde é transmitido e a interpretação da informação transmitida pelo recipiente, isto é, a recepção do material genético (BAQUERO *et al.*, 2019).

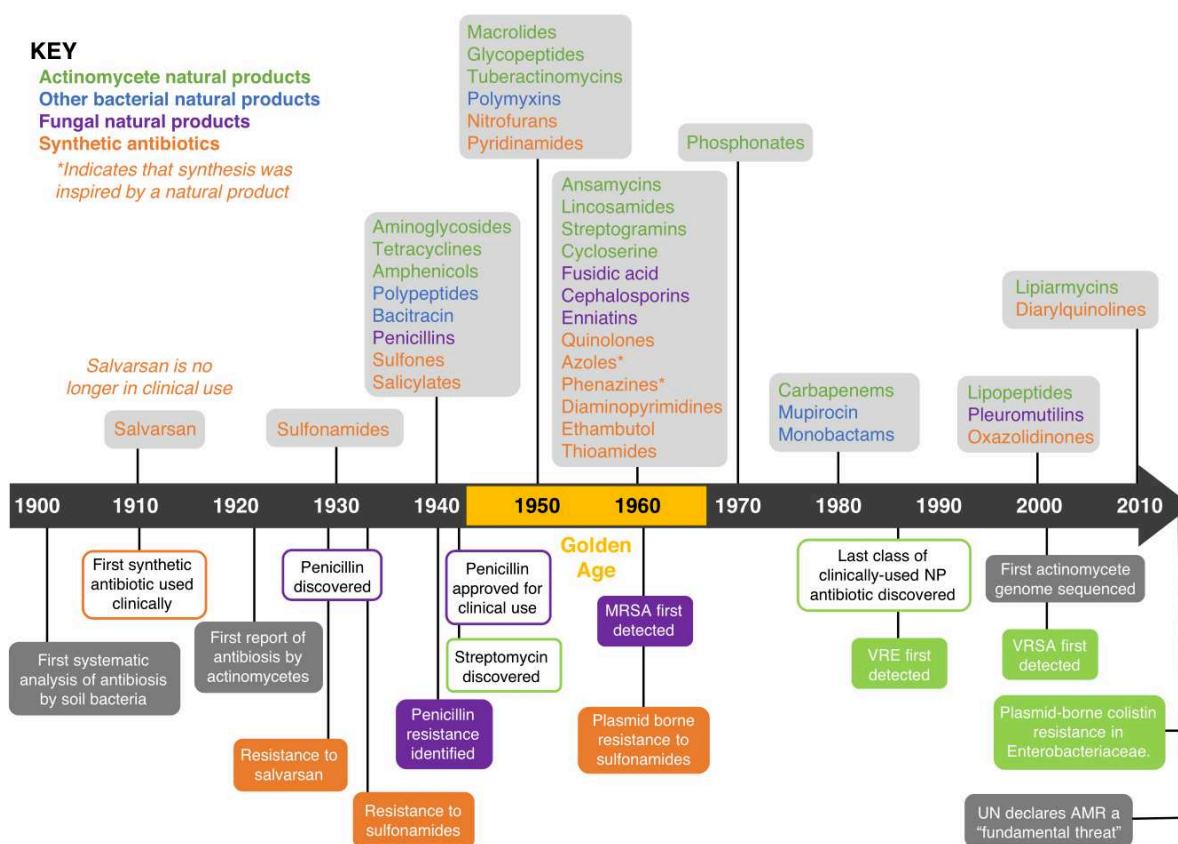
O contexto de Saúde Única apresenta três principais graus de espaço por onde a transmissão de resistência pode ocorrer: (1) redes de comunicação entre humanos, animais e plantas e também com ambientes externos; (2) redes de comunicação entre os microbiomas relacionados aos ambientes apenas citados e seus sub-ambientes; (3) redes de comunicação entre diversas espécies bacterianas pertencentes a esses microbiomas (resultantes da junção desses microbiomas). Da mesma forma, os elementos de transmissão também são relevantes para definir a profundidade do processo de disseminação, o qual é dependente da organização hierárquica dos elementos de resistência aos antimicrobianos e, assim, permite-se a ocorrência da seleção em diversos níveis. Dessa forma, a seleção torna-se um ponto chave para a comunicação já que possibilita a interpretação da informação transmitida (BAQUERO *et al.*, 2019).

1.2 Antimicrobianos - Histórico

A história relacionada ao uso de antimicrobianos tem início em 1910 com a introdução do salvarsan, primeiro antimicrobiano descrito (Figura 1). A introdução dos antimicrobianos foi o maior avanço da medicina do século XX. Assim,

aumentou-se a expectativa de vida humana em 23 anos e diversos procedimentos como transplantes e tratamento de neoplasias se tornaram possíveis. Porém, o uso dessas moléculas acelerou o desenvolvimento de um fenômeno descrito como resistência. Outro momento de destaque é a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, molécula a qual foi amplamente estudada ao longo das décadas seguintes (HUTCHINGS *et al.*, 2019).

Figura 1. Histórico dos antimicrobianos



Linha do tempo de descobertas das diversas classes de antimicrobianos (parte superior) e de acontecimentos importantes na microbiologia clínica (parte inferior).

Fonte: Hutchings et al., 2019

Relações de antibiose já haviam sido descritas, até mesmo por Louis Pasteur, que propunha que os microrganismos eram capazes de secretar substâncias capazes de ocasionar a lise de outras bactérias. No final da década de 1930, Selman Waksman realizou diversos estudos sistemáticos de microrganismos produtores de compostos antimicrobianos. Inclusive, foi ele quem utilizou o termo

antibiótico para definir o “composto feito por um microrganismo para destruir outro microrganismo”, ou seja, que fosse produzido naturalmente (HUTCHINGS *et al.*, 2019).

Entre as décadas de 1940 e 1960, tem-se a “era de ouro” das descobertas de moléculas com propriedades antimicrobianas (Figura 1). Grande parte desses fármacos continuam sendo utilizados diariamente, porém a resistência bacteriana diminuiu sua eficácia. A partir da década de 1970 observa-se um declínio no número de descobertas de novas famílias de antimicrobianos, principalmente tratando-se das classes utilizadas frequentemente na clínica (HUTCHINGS *et al.*, 2019).

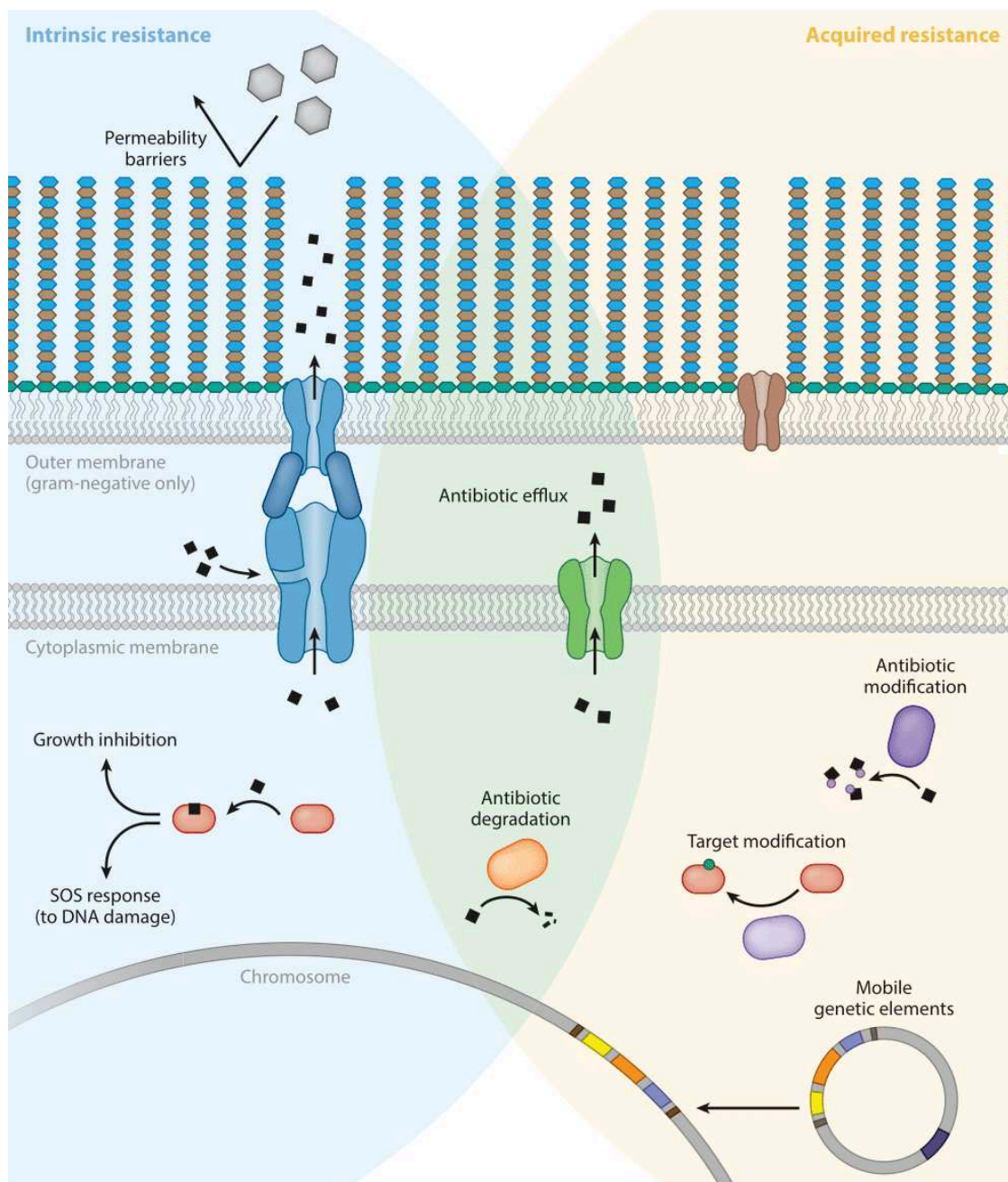
A resistência aos antimicrobianos pode ser expressa através de um grande espectro de mecanismos de ação (Figura 2). Análogo ao sistema imune inato e adaptativo encontrado em humanos, podemos dividir a resistência bacteriana em intrínseca e adquirida. São configurados como mecanismos intrínsecos aqueles que evoluíram como uma resposta geral à moléculas tóxicas. Sendo assim, são incluídos as respostas SOS de reparo ao DNA, bombas de efluxo de amplo espectro, enzimas de inativação codificadas pelo cromossomo bacteriano e barreiras de entrada como porinas e a presença de uma membrana externa nas bactérias gram-negativas. Os mecanismos de resistência adquirida compreendem as contramedidas à antimicrobianos específicos. Dessa forma, incluem-se as bombas de efluxo para compostos específicos, expressão de alvos que não sejam sensíveis ao fármaco e enzimas que modifiquem o alvo ou o antimicrobiano. De forma geral, esses mecanismos são disseminados através da transferência gênica horizontal (SURETTE; WRIGHT, 2017).

1.3 Microbiota como reservatório de genes de resistência

O termo microbioma foi definido pela primeira vez pelo pesquisador Joshua Lederberg referindo-se, principalmente, ao material genético que esse grupo carrega como “Comunidade ecológica de microrganismos comensais, simbióticos e

patogênicos que compartilham nosso espaço corporal e que foram ignorados como determinantes de saúde e doença” (GRICE; SEGRE, 2012; PASCALE *et al.*, 2018).

Figura 2. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos



Distinção entre os diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos conhecidos. Os mecanismos intrínsecos compreendem aqueles relacionados à permeabilidade celular aos antimicrobianos, efluxo, degradação e regulação de mutações genômicas. A resistência adquirida inclui os mecanismos de alteração de alvo, inativação enzimática do antimicrobiano e efluxo, muitas vezes adquiridos através da transferência genética horizontal.

Fonte: Surette e Wright, 2017

Dentro desse complexo ecossistema, podem-se encontrar diversas espécies de bactérias, vírus, fungos, arqueas e protozoários. Esses microrganismos são capazes de habitar diferentes partes do corpo humano, podendo ser citados o trato gastrointestinal (TGI), a boca, a pele, o sistema respiratório e geniturinário inferior. A literatura indica que mais de 70% da microbiota é encontrada no TGI, possuindo um gradiente de concentração que se estende do lúmen gástrico até o cólon/reto, onde se alcança o maior número. Além disso, a microbiota pode atuar de modo benéfico em um relacionamento denominado de mutualismo com o hospedeiro (BARKO *et al.*, 2018; PASCALE *et al.*, 2018).

É reconhecido o importante papel desempenhado pela microbiota quanto à saúde humana. Sabe-se que a microbiota está relacionada com a produção de diversas substâncias que o organismo não seria capaz de produzir sozinho. O fornecimento de nutrientes, síntese de vitaminas, promoção da angiogênese, digestão de polissacarídeos e atuação nas funções de nervos entéricos são alguns exemplos nos quais a microbiota possui estrita relação de colaboração (ZHANG *et al.*, 2015a; PASCALE *et al.*, 2018). Sabe-se que todos os mamíferos são habitados por comunidades microbianas, mas a ciência ainda não foi capaz de definir e caracterizar todos os componentes, relações e atividades que a microbiota pode exercer junto ao seu hospedeiro. Para se ter uma ideia da complexidade desse sistema, estima-se que o microbioma humano possui cerca de 250-800 vezes mais genes que o próprio genoma humano (BARKO *et al.*, 2018; PASCALE *et al.*, 2018).

Tendo em vista o que foi citado até o momento, é possível fazer uma analogia do corpo humano como um grande condomínio para esses microrganismos. Alguns desses, inclusive, colaboram com a manutenção do local onde vivem. Em contraponto, outros não contribuem, mas também não prejudicam o andamento das atividades. Temos, também, aqueles que, em situação de disbiose, possuem grande potencial patogênico, desfavorecendo a conservação do habitat onde estão alocados. Além disso, deve-se considerar a microbiota como algo dinâmico, bem como o funcionamento deste condomínio. Alguns moradores, como as espécies colonizadoras, são mais persistentes e capazes de permanecer por maior tempo nesse ambiente. Por outro lado, ao longo do tempo o perfil dessa

microbiota pode alterar por diversos fatores ambientais como a alimentação e o uso de antimicrobianos (ADAK; KHAN, 2018; FASSARELLA *et al.*, 2020).

O uso de antimicrobianos de maneira extensiva tem sido uma grande preocupação e diversas são as consequências observadas sobre a saúde humana. O estudo do microbioma possibilitou observar as modificações que ocorrem em detrimento do tratamento com antibióticos, como a drástica alteração da microbiota de adultos e crianças, bem como efeitos negativos a longo prazo. Essas mudanças são denominadas de disbiose. Diversos pesquisadores foram capazes de relacionar quadros de disbiose a casos clínicos de desnutrição, patologias autoimunes e metabólicas, entre outros (KARAKAN *et al.*, 2021). Alguns estudos também demonstram que a disbiose ocasionada pelo uso de antibióticos pode levar a, adicionalmente, ganho de peso e desequilíbrio metabólico (NEUMAN *et al.*, 2018).

Os antimicrobianos, além de causarem danos à microbiota humana, podem levar a um problema ainda maior: a geração de resistência. Seu uso de maneira indevida, como sua administração em doses subterapêuticas potencializa a seleção dos chamados Microrganismos Resistentes a Antimicrobianos (MRA). A prevenção ou cura de infecções e a promoção do crescimento de animais são as principais finalidades da utilização de antimicrobianos na criação desses. Tal ação fez com que os MRA fossem encontrados em alimentos fermentados derivados de carne e leite, produtos de grande consumo pelos seres humanos. Tendo em vista as consequências negativas dessa prática, a partir da década de 1980 houve uma maior preocupação acerca dos efeitos colaterais desses medicamentos (WEGENER, 2003; DEVIRGILIIS; BARILE; PEROZZI, 2011).

Elementos genéticos móveis são componentes de grande relevância quando se trata da propagação de genes de resistência a antimicrobianos. A transferência horizontal pode ocorrer tanto inter quanto intra-espécies e, referindo-se ao genoma bacteriano, plasmídeos, transposons e sequências de inserção são os principais personagens envolvidos na disseminação desses elementos (ALEKSHUN; LEVY, 2007; ANDERSSON; HUGHES, 2014). São diversos os casos que reportam a presença de genes de resistência a antimicrobianos e elementos genéticos móveis associados, inclusive, a bactérias ácido-láticas (BAL). Vale ressaltar que estudos demonstram que a plasticidade observada em genomas bacterianos leva a uma

maior variedade de contextos genômicos o que implica em uma maior eficiência em realizar a mobilidade de elementos genéticos entre diferentes espécies e gêneros (DEVIRGILIIS; BARILE; PEROZZI, 2011; VERMA *et al.*, 2019).

A maior ameaça relacionada aos genes de resistência associados a bactérias comensais não-patogênicas é o risco da transferência de determinantes de resistência para organismos patogênicos. Assim, podemos encontrar cenários em que o tratamento com antibióticos são prejudicados para controle ou cura de infecções comuns. Tendo em vista tal panorama, a microbiota comensal pode se tornar, por conseguinte, num reservatório de genes de resistência, podendo estes se propagarem para microrganismos com potencial patogênico e levando pacientes a quadros graves. O fato de que o TGI seja um ambiente repleto de microrganismos, faz com que favoreça compartilhamentos genéticos entre componentes da microbiota residentes e transientes neste espaço. (MATHUR; SINGH, 2005; DEVIRGILIIS; BARILE; PEROZZI, 2011). A literatura científica já traz relatos de bactérias do gênero *Bifidobacterium*, muito empregado como probiótico devido suas propriedades benéficas, carreando genes de resistência como *tetM*, *tetW* e *tetO* (LIM; CHO; RHO, 2018).

Partindo do princípio da precaução, o uso de antimicrobianos na indústria animal foi, de maneira progressiva, banido em alguns países Europeus nos últimos 30 anos. No entanto, ainda são relatados níveis baixos, porém consistentes, de espécies resistentes no ambiente, incluindo produtos alimentares. Algumas investigações clínicas indicam, inclusive, a persistência de algumas espécies que apresentam resistência a antimicrobianos na microbiota intestinal mesmo na ausência de pressão seletiva, o que seria um indício de que a exposição a medicamentos induz, a longo prazo, alterações dentro de comunidades microbianas complexas (JERNBERG *et al.*, 2010; DEVIRGILIIS; BARILE; PEROZZI, 2011).

Em termos gerais, uma citação de 1996 por George A. Jacoby que ilustra o contexto da resistência bacteriana, pode ser traduzida como “Bactérias são alvos em movimento e que tivemos que aprender repetidamente que nossos projéteis mágicos podem perder sua magia com seu uso repetido.” Faz-se, assim, uma necessidade urgente de novas abordagens para o tratamento de infecções bacterianas. Sendo isso uma consequência da mudança de padrões observados em

doenças infecciosas e da emergência de linhagens resistentes aos antibióticos modernos (TAYLOR; STAPLETON; LUZIO, 2002).

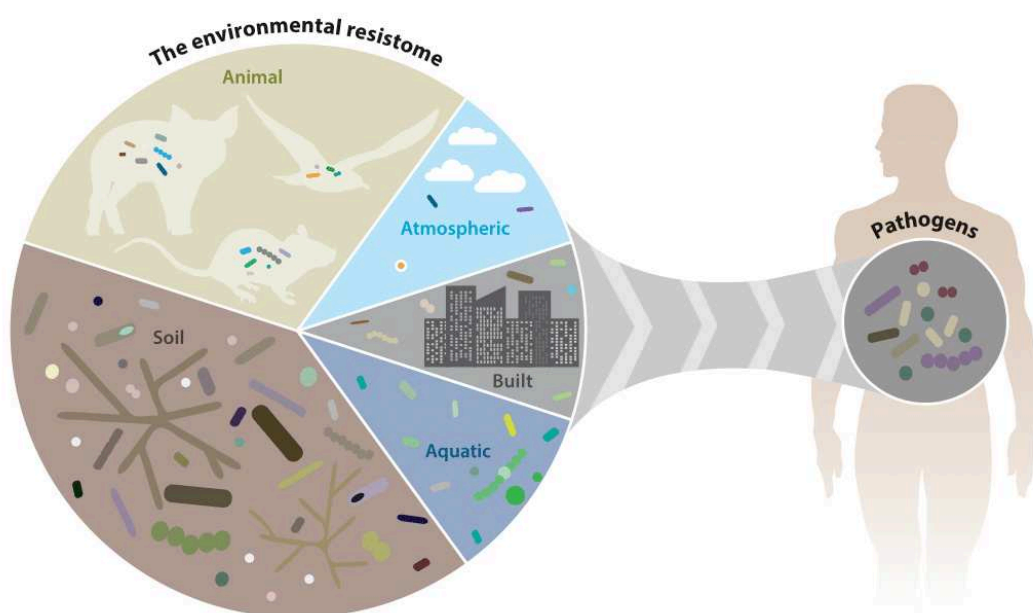
1.4 Dinâmica de disseminação

Reportam-se as primeiras aparições de linhagens bacterianas resistentes aos antimicrobianos dentro de hospitais, locais de extenso uso desses fármacos. Posteriormente, observou-se a presença dessas linhagens resistentes em diversos ambientes como água, solo e ar (Figura 3) (LEVY, 1998; WANG *et al.*, 2020a). A contínua evolução e propagação de genes de resistência em patógenos humanos é um grande desafio clínico. Diversos são os casos relatados de microrganismos com potencial patogênico que são encontrados tanto em humanos infectados quanto no ambiente. Diversos isolados de bactérias patogênicas, como *Kluyvera* e *Shewanella*, já foram documentados em vida livre em cenários ambientais, os quais possuíam genes de resistência com alta identidade quando comparados com os de outros patógenos. Tais evidências fazem a comunidade científica levantar questionamentos quanto à presença de resistência em comunidades microbianas ambientais, sobretudo por serem poucos exemplos relatados (FORSBERG *et al.*, 2012).

O trabalho de Forsberg e colaboradores (2012) também levanta outros dados relacionados à microbiota encontrada no solo, especialmente por se tratar de uma das maiores e mais diversas comunidades microbianas do planeta. Além disso, já é reconhecido como um vasto repositório de genes de resistência aos antimicrobianos (WILLMS *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2021). O solo é um ambiente de contato direto com antibióticos utilizados tanto na criação animal quanto na agricultura. Adicionalmente, o solo é o habitat natural de Actinomicetos do gênero *Streptomyces*, grupo de bactérias conhecido por produzir naturalmente um grande número de antibióticos (FORSBERG *et al.*, 2012). Tais evidências podem indicar o porquê de serem encontrados tantos genes de resistência em um ambiente tão complexo.

A consolidação do conhecimento acerca dos meios pelos quais os ARGs e MRAs podem circular entre ambientes levou à construção de modelos elucidativos que indicam os principais atuantes na transmissão desses microrganismos (Figura 4). Qualquer lugar onde haja uso de antimicrobianos será considerado um reservatório de resistência. Os humanos e os animais, bem como os ambientes onde estão inseridos como hospitais e a própria sociedade, granjas e locais de aquicultura são enquadrados como peças-chaves na disseminação de resistência. Além disso, as águas, o solo e diversos outros nichos ecológicos estão sujeitos à contaminação através dos descartes e poluição da indústria farmacêutica e os dejetos das granjas de produção animal (MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

Figura 3. A microbiota ambiental e a resistência aos antimicrobianos



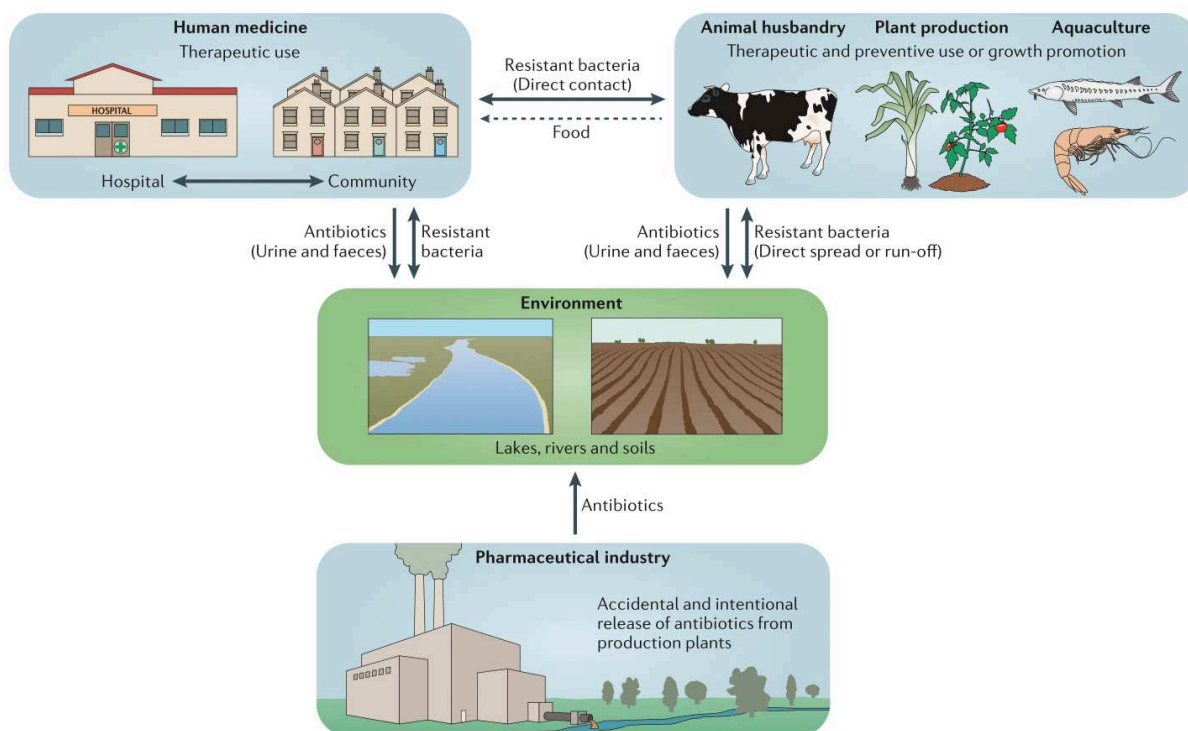
Representação e dimensionamento estimado do resistoma de diversos ambientes.

Fonte: Surette e Wright, 2017

Outro elemento de grande preocupação é a própria velocidade com que a resistência pode ser gerada pela pressão seletiva. Um experimento realizado por pesquisadores da Universidade de Harvard demonstrou como a evolução bacteriana e a adaptação a um desafio ambiental ocorrem de maneira rápida. O teste consistia no uso de uma grande placa de Petri com meio de cultivo e um

gradiente de concentração de antibiótico (0, 1, 10, 100 e 1000 vezes). O que se observa é o crescimento bacteriano do ponto de menor concentração ao de maior concentração de antibiótico durante apenas 11 dias. Nota-se a fácil e rápida adaptação bacteriana, além de ser possível identificar onde surgiram as novas cepas mais resistentes (BAYM *et al.*, 2016).

Figura 4. Dinâmica de circulação de genes de resistência aos antimicrobianos, bactérias resistentes aos antimicrobianos e antimicrobianos



Representação esquemática das diversas rotas de circulação entre diversos ambientes de antimicrobianos, genes de resistência aos antimicrobianos e microrganismos resistentes aos antimicrobianos.

Fonte: Anderson e Hughes, 2014

O desenvolvimento e disseminação de resistência aos antimicrobianos pode se dar de várias formas. As comunidades microbianas e seus respectivos resistomas encontrados nos mais diversos ambientes podem ser modelados de acordo com vários fatores. Intervenções sanitárias, uso abusivo de antimicrobianos e até mesmo a administração de moléculas com diferentes propriedades, como os adoçantes não-nutritivos, podem estar assimiladas às modificações encontradas

nesses ecossistemas. Estudos já evidenciam mecanismos pelos quais os adoçantes não-nutritivos podem promover a disseminação de ARGs (YU *et al.*, 2021). Por outro lado, o uso de produtos contendo ativos biológicos, como probióticos, aparenta apresentar vantagens sobre a manutenção de populações microbianas potencialmente patogênicas (CASELLI *et al.*, 2016).

1.5 Uso de antimicrobianos na criação animal

As preocupações quanto ao uso de antimicrobianos na criação animal se estendem à sua utilização como promotor de crescimento, especialmente quando se discute sobre sua administração rotineira e em subdoses. O trabalho de Cho e colaboradores (2012) busca elucidar o mecanismo pelo qual os antibióticos em doses subterapêuticas agem levando ao ganho de peso em animais. Observam-se modificações na microbiota intestinal do grupo tratado com antimicrobianos, sendo selecionado um grupo taxonômico de microrganismos com metabolismo favorável ao aumento dos níveis de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC) e que, ao mesmo tempo, leva a alterações na regulação dos metabolismos de lipídeos e colesterol.

Já foram reportados os efeitos de ganho de massa através do uso de antibióticos em subdoses entre diversas espécies de vertebrados como bovinos, suínos, ovinos e aves (BUTAYE; DEVRIESE; HAESBROUCK, 2003). A administração geralmente é realizada através da água ou do próprio alimento desses animais e pode levar a um ganho de massa de até 15%. Diversas classes de antibióticos foram colocadas sob experimentação e, de maneira geral, observa-se o mesmo efeito independente do agente utilizado. Porém, o mesmo não pode ser dito quanto à utilização de antivirais e antifúngicos (CHO *et al.*, 2012).

O uso incorreto e descontrolado dos antibióticos, além de levar a um aumento de resistência, alterar rotas metabólicas e prejudicar a integridade da microbiota humana, animal e ambiental, pode levar à ineficiência desses medicamentos. Ou seja, o antibiótico, cujo objetivo é controlar e/ou evitar uma infecção, pode perder seu efeito devido ao mau uso (TYRELL *et al.*, 2019). Por

exemplo, o impacto relacionado ao uso da colistina em animais se tornou evidente em 2016, quando foi identificado um plasmídeo carreando um gene de resistência a esse fármaco (LIU et al., 2016). Assim, esse antimicrobiano amplamente utilizado em humanos ficou ameaçado pela transferência horizontal de genes de resistência. De fato, o fenômeno caracterizado pela proliferação de bactérias multirresistentes e pela diminuição de antimicrobianos efetivos conduziu o planeta a uma crise de saúde global que pode levar ao retorno de uma era pré-antibióticos, onde pequenos infecções podem levar a grandes catástrofes (LOW et al., 2021).

A relação entre a microbiota e a resistência a antimicrobianos se torna, cada vez mais, um maior alvo de estudos, pois se trata de uma questão multifatorial envolvendo interações complexas entre o ambiente, humanos, animais e plantas. Busca-se entender melhor como a atividade humana e as práticas da agropecuária podem atingir e influenciar na transferência de genes de resistência a antibióticos e nas relações entre os diversos sistemas citados, bem como afetar o resistoma encontrado no ambiente. Da mesma forma, aplica-se o mesmo raciocínio em relação a quanto os genes de resistência ambientais podem implicar em prejuízos na saúde humana (TYRELL *et al.*, 2019).

Entende-se por resistoma qualquer conjunto de genes responsável por conferir resistência aos antimicrobianos, antissépticos e metais pesados em um dado ecossistema microbiano (HO *et al.*, 2019).

Ainda é incerto o mecanismo de como ocorre a transferência de elementos que conferem resistência entre diversos sistemas (humanos, animais, ambiente, etc.). A literatura indica a possibilidade de ocorrer tal contaminação através de dois meios: o contato direto e por meio indireto. O contato direto pode ser exemplificado por profissionais que trabalham na agropecuária e que lidam com criação de animais frequentemente. O contato com fluidos como fezes, sangue e urina gerados por esses animais pode levar à disseminação de bactérias resistentes e, conseqüentemente, genes de resistência aos antimicrobianos. Quanto ao contato indireto, podem ser citados os casos de contaminação através do consumo de alimentos contendo esses microrganismos. Muitos trabalhos científicos já demonstraram que carnes e seus produtos derivados contaminados podem ser a causa de ocorrências de infecções em humanos, pois sabe-se que os animais são

um grande reservatório de bactérias resistentes a antibióticos. Logo, há preocupação que ocorra, através de transferência gênica horizontal, a integração desses elementos que conferem resistência e que possuem relevância clínica no microbioma humano (HO *et al.*, 2019).

A incerteza sobre como circulam genes de resistência e bactérias resistentes faz com que os cientistas busquem maiores respostas quanto aos maiores facilitadores da transmissão desses fatores. Estudos já indicam que a reutilização das camas dos animais na agropecuária pode ser uma prática que implica na maior dispersão desses elementos de resistência, podendo fazer com que animais não colonizados por essas bactérias resistentes sejam contaminados pelos colonizados. Além disso, as práticas modernas da agropecuária como o confinamento dos animais nas granjas contribui em grande escala com a disseminação de resistência (TYRRELL *et al.*, 2019).

Vem sendo estudado, também, o papel do uso do chorume e do estrume na produção agrícola em relação ao fluxo de genes resistência entre humanos, animais, plantas, ambientes aquáticos e terrestres. Trabalhos mostraram que cerca de 58% dos antibióticos utilizados na medicina veterinária chegam ao ambiente, transferindo-se a maioria para o solo. O estrume, por exemplo, já é visualizado com um importante reservatório de genes de resistência e, principalmente, se refere àquele não tratado (TYRELL *et al.*, 2019). Os antibióticos possuem a capacidade de, no TGI dos animais, gerar um ambiente seletivo, favorecendo o desenvolvimento e proliferação de microrganismos resistentes. Sendo assim, esse cenário acaba propiciando a contaminação do solo através do uso do estrume na produção agrícola. O estrume, muitas vezes, possui alguns contaminantes como metais pesados, que atuam como promotores de crescimento bacteriano e que aumentam ainda mais a seletividade de bactérias resistentes (YAZDANKHAH; RUDI BERNHOFT, 2014; PATEL *et al.*, 2020).

Analisando a rota do antimicrobiano desde a administração a um animal e pela aplicação do estrume gerado na produção agrícola, até o consumo de plantas por um ser humano, seria possível estabelecer a disseminação dos ARG (THANNER; DRISSNER; WALSH, 2016). O antibiótico consumido pelos animais é metabolizado ao longo do TGI por meio da atividade hepática e pela ação dos

microrganismos presentes por todo o intestino. Assim, ao final do TGI obtém-se tanto moléculas antibióticas sem qualquer alteração, quanto aquelas que sofreram modificações estruturais a ponto de perder parte de sua capacidade antimicrobiana. Por conseguinte, a geração de estrume contaminado leva a consequências severas pelo seu uso no cultivo agrícola. A aplicação do adubo acarreta na propagação de contaminantes para as plantas uma vez que os fármacos são absorvidos do solo e conduzidos para os mais diversos tecidos vegetais. Considerando que, muitas vezes, os humanos consomem boa parte das plantas ainda na sua forma crua, as pessoas podem se contaminar através da alimentação. Vale ressaltar que a presença dos antimicrobianos e seus derivados em todas as etapas favorece o estabelecimento de um ambiente seletivo para microrganismos resistentes (TYRELL *et al.*, 2019).

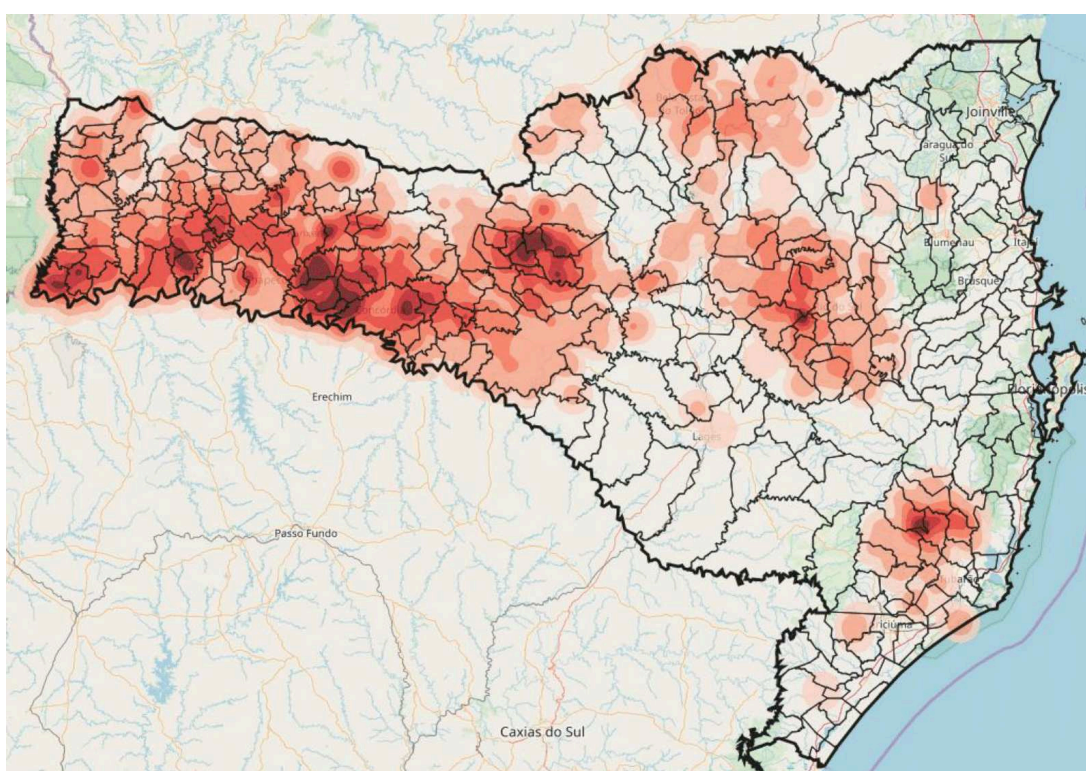
Outra questão que deve ser considerada é a contaminação das águas superficiais decorrente do fenômeno de lixiviação pelas águas subterrâneas, ou até mesmo pelo escoamento de terras agrícolas (TYRELL *et al.*, 2019). De fato, ambientes aquáticos são considerados importantes reservatórios de MRA. O tratamento inadequado e ausência de saneamento básico em sistemas hídricos são facilitadores da proliferação de diversos microrganismos resistentes (ALVES *et al.*, 2020).

1.5.1 Cenário Santa Catarina - Suínos

A atividade suinícola catarinense se mostra predominante nas atividades agropecuárias em Santa Catarina e no Brasil (Figura 5). Em relação ao mercado externo, a produção de suínos catarinense respondeu em 2018 por cerca de 50% das exportações nacionais. Além disso, 17,7% do VPB da agropecuária catarinense é proveniente da produção da carne suína. Por isso, a suinocultura de Santa Catarina encontra-se como líder no cenário nacional. Essa atividade, estabelecida no território estadual desde meados do século XIX devido a colonização de origem europeia na mesorregião Oeste Catarinense, foi responsável por 78,3% da produção em Santa Catarina em 2018 (GIEHL; MONDARDO, 2019).

Pouco se tem sobre dados de uso de antimicrobianos na criação de suínos. Estatísticas relativas à administração de antimicrobianos para porcos nos EUA apontou a prevalência do método oral via alimentação ou água. Além disso, algumas moléculas se destacam pela suas altas taxas de uso como os beta-lactâmicos (45 mg/kg de massa viva comercializada), macrolídeos (12 mg/kg de massa viva comercializada) e tetraciclina (110 mg/kg de massa viva comercializada) somente em 2017 (DAVIES; SINGER, 2020).

Figura 5. Produção de suínos em Santa Catarina (2014 - 2019)



Heatmap indicando a densidade populacional de suínos e divisas municipais em SC.

Fonte: IMA-SC, granjas em operação licenciadas entre 2014 e 2019

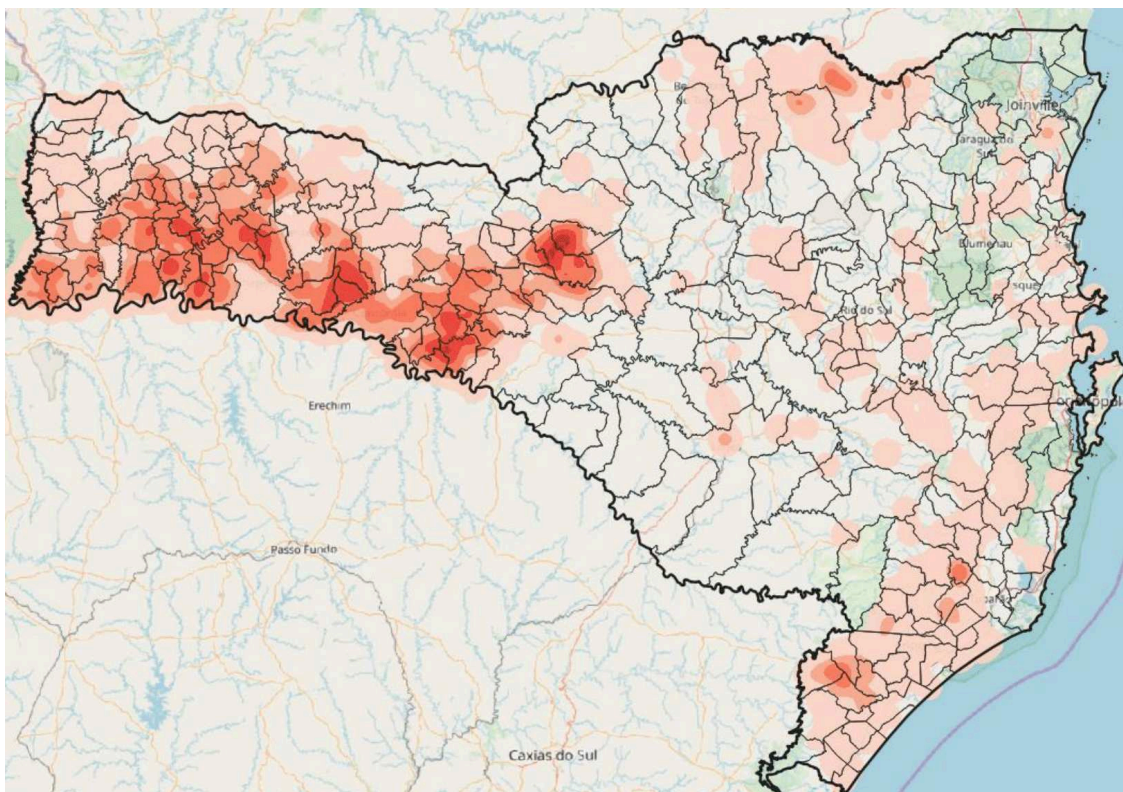
Autor: Rodrigo S. Nicoloso, Embrapa Suínos e Aves

1.5.2 Cenário Santa Catarina - Aves

Santa Catarina apresenta um cenário de liderança quanto à produção de aves (Figura 6). A Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri, 2020) aponta que a produção de frango é a principal atividade agropecuária do Estado. Em âmbito nacional, Santa Catarina também apresenta posição de destaque sendo o segundo maior produtor do Brasil. Cerca de 19,59%

do Valor Bruto da Produção (VBP) agropecuário estadual é representado pela produção de carne de frango (R\$ 6,05 bilhões). Referente ao mercado externo, em 2019, Santa Catarina exportou cerca de 1,27 milhão de toneladas, o que representou um faturamento de 31,66% da receita nacional referente a esse produto (GIEHL; MONDARDO, 2020).

Figura 6. Produção de aves em Santa Catarina (2014 - 2019)



Heatmap indicando a densidade populacional de aves e divisas municipais em SC.

Fonte: IMA-SC, granjas em operação licenciadas entre 2014 e 2019.

Autor: Rodrigo S. Nicoloso, Embrapa Suínos e Aves.

Apesar da produção de aves se estender por todo o território catarinense, a mesorregião do Oeste Catarinense é responsável por conter uma grande concentração dessa indústria. Aproximadamente 80% da produção avícola de Santa Catarina provém do Oeste Catarinense, região reconhecida por ser o berço da indústria moderna de avicultura (GIEHL; MONDARDO, 2020).

Os dados e registros disponíveis acerca do uso de antimicrobianos nesta atividade em Santa Catarina é muito escasso. Estatísticas dos EUA entre os anos

de 2013 e 2017 mostram o uso de antimicrobianos em granjas de aves em seu território nacional. Altas quantidade de antimicrobianos como penicilinas (18.000 kg), tetraciclinas (10.000 kg), bacitracinas (5.000 kg) e sulfonamidas (2.000 kg) foram administrados em água para as aves durante o ano de 2017 (SINGER *et al.*, 2020).

1.6 Contexto hospitalar

O ambiente hospitalar encontra-se na rede principal de disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos (ROBAKOWSKA *et al.*, 2021). Entretanto, o entendimento sobre a ecologia microbiana desse ambiente se mantém desconhecido, tornando alvo de muitos estudos epidemiológicos e microbiológicos (CHNG *et al.*, 2020). Assim como há a dispersão de patógenos e genes de resistência através dos contatos entre humanos, as superfícies também são grandes reservatórios de microrganismos e, conseqüentemente, genes de resistência aos antimicrobianos. Estima-se que ao menos 50% das superfícies dos quartos dos hospitais não são adequadamente desinfectadas e limpas quando utilizados germicidas químicos (CASELLI *et al.*, 2016). Apesar dos esforços levantados acerca da prevenção da aquisição de infecções hospitalares, muitas abordagens são baseadas no uso de reagentes químicos que reduzem efetivamente a presença de patógenos, porém não impedem sua reincidência (CHNG *et al.*, 2020; CASELLI *et al.*, 2016).

O processo de urbanização fez com que o ser humano passasse, ao longo dos anos, cada vez mais dentro de espaços fechados (até 90% do tempo). Inclusive, proporcionou novos tipos de configurações microbianas encontradas nas nossas casas e espaços de trabalho, por exemplo (MORA *et al.*, 2016). Os hospitais, por se tratarem de ambientes fechados, são facilitadores na dispersão dos genes de resistência a antimicrobianos. O conhecimento sobre a dinâmica de circulação de MRA e ARG ainda é escasso, porém alguns pesquisadores revelam que as rotas principais de transmissão ocorrem através das roupas da equipe de saúde, estetoscópios, telefones, teclados, entre outros (LAX; GILBERT, 2015; LI *et*

al., 2021). O próprio ar que circula nos hospitais pode ser um agente importantíssimo na circulação desses microrganismos uma vez que os equipamentos de ar-condicionado acumulam ao longo do tempo diversos patógenos e, conseqüentemente, genes de resistência a antimicrobianos (LI *et al.*, 2021).

O impacto das atitudes e atividades antropogênicas no resistoma vem sendo muito estudado, principalmente sobre o papel dos efluentes na disseminação dos ARG. Antimicrobianos conseguem chegar ao ambiente, muitas vezes através dos rejeitos hospitalares (O' NEILL, 2016). Estudos indicam que efluentes oriundos de locais de uso de antimicrobianos e que desembocam em rios atuam fortemente na dispersão dos ARG (VERLICCHI, 2020). Não bastando, esses genes encontram-se em maior abundância em relação a uma posição a montante da desembocadura do efluente. Assim é possível entender melhor a importância clínica e ambiental da liberação de efluentes hospitalares (ROWE *et al.*, 2017).

As atitudes necessárias para conter a disseminação de MRA e ARG são bem estabelecidas, principalmente para postos de saúde e hospitais. Tendo como princípio a prevenção, os protocolos essenciais e recomendados se baseiam na higienização apropriada das mãos especialmente da equipe médica e de enfermagem. Além disso, a limpeza adequada dos equipamentos e acessórios necessários durante o atendimento médico são essenciais para evitar maior dispersão de MRA. Não obstante, já são reportados casos de resistência a diversos agentes utilizados na sanitização de superfícies e ambientes como o digluconato de clorexidina (KAMPF, 2016). Em contrapartida, muitas vezes programas de prevenção e controle de infecções são vistos unicamente como um custo, sem ponderar os benefícios e melhores resultados fornecidos aos pacientes (O' NEILL, 2016).

Em Santa Catarina, tem-se como uma grande referência em saúde e medicina o Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC-EBSERH). Trata-se de um hospital de nível 3 em acreditação hospitalar e conta com 200 leitos. Além disso, atua como uma instituição Federal, compreendendo um grande centro de assistência médica e de pesquisa científica. O HU-UFSC-EBSERH possui estrutura capaz de receber indivíduos de diversas regiões do estado e do país e os serviços oferecidos não possuem custos para a

população. Em relação ao uso de antimicrobianos no HU-UFSC-EBSERH, a primeira Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) formalizou-se em 1985. Em 1992 foi criado um órgão executor (Serviço de Controle de Infecção Hospitalar, SCIH) das ações idealizadas pela Comissão. O setor é responsável por realizar capacitações, orientar e distribuir informativos para os funcionários do hospital, buscando a redução das taxas de infecções nosocomiais, com grande enfoque nas bactérias multirresistentes. Além disso, o setor atua com programas de vigilância visando a detecção de surtos que possam estar acometendo os pacientes e funcionários (<http://www.hu.ufsc.br/setores/ccih/>)

1.7 Relevância global dos MRA e os esforços internacionais para seu controle

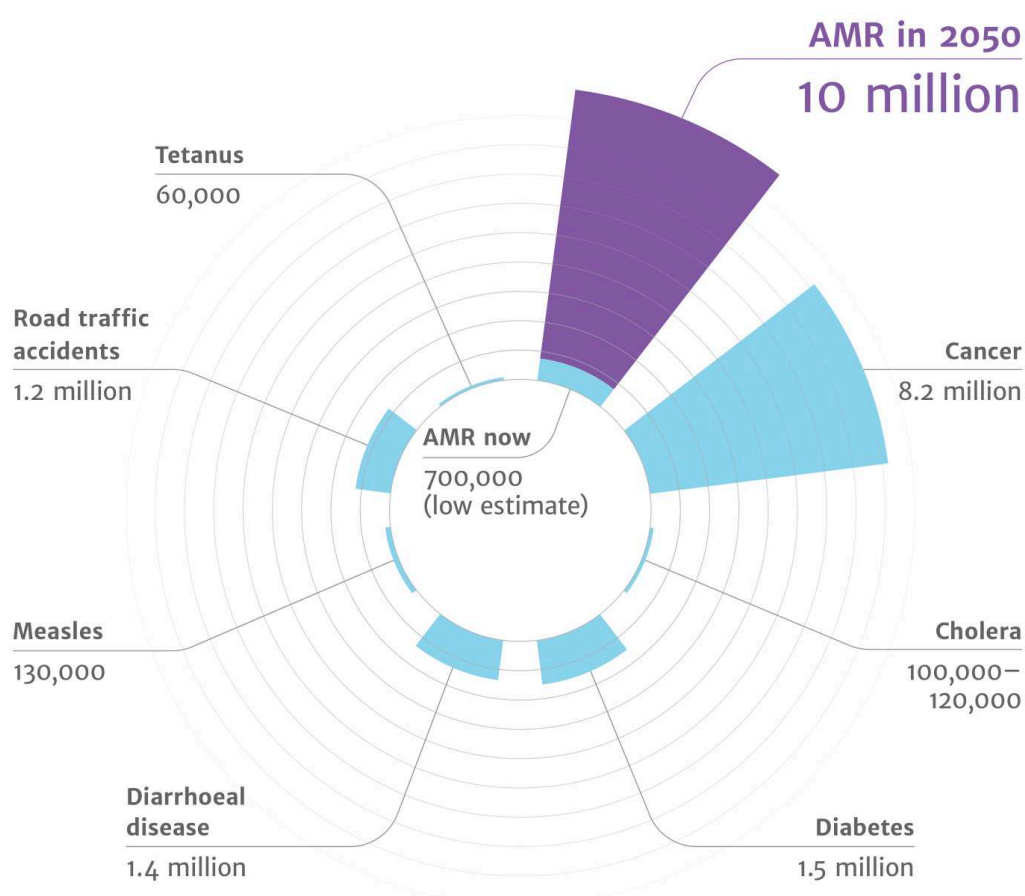
Em relação à problemática da dispersão dos MRA em diversos ambientes, um relatório presidido por Jim O'Neill (2016) traz diversas propostas para o combate às infecções causadas por MRA no mundo. O trabalho busca trazer, além da visão científica e sanitária, a perspectiva econômica em relação às consequências acarretadas pela transmissão de MRA. Quanto às sugestões para o controle das infecções, podem-se citar a consciência pública, saneamento e higiene, rápido diagnóstico, fundos globais de inovação, entre outros.

Estima-se que, atualmente, as mortes relacionadas aos MRA anuais estão em cerca de 700.000. Comparativamente, não ultrapassa valores relativos a acidentes de trânsito (1,2 milhões) ou diabetes (1,5 milhões) e fica longe do número de mortes causadas por câncer (8,2 milhões). Porém, a perspectiva que se tem em relação a esses dados preocupa tendo em vista que, para 2050, estima-se que o número de mortes relacionadas aos MRA alcance os 10 milhões (Figura 7). Sua concretização depende de como a sociedade pretende agir em relação ao uso de antimicrobianos, higienização e outros fatores relativos à dispersão dos MRA. Além disso, o cenário previsto representa uma morte a cada 3 segundos em virtude do aumento da incidência dos MRA. Do ponto de vista econômico, estima-se um custo

global de 100 trilhões de dólares relacionado ao aumento de demanda hospitalar e gastos da área da saúde (O'NEILL, 2016).

Países como a Dinamarca baniram o uso de antimicrobianos como a avoparcina em animais desde 1995. Assim, em cinco anos já foram observadas reduções significativas na detecção de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina entre aves e suínos de 72,7% e 20,0% para 5,8% e 6,0%, respectivamente (LIM *et al.*, 2018).

Figura 7. Dados anuais das mortes atribuídas aos MRA



Infográfico representando o número estimado de mortes anuais no mundo por diversas causas. A imagem também traz a estimativa dada para o número de mortes causada por microrganismos resistentes aos antimicrobianos em 2050. Fonte: O'Neill, 2016

De forma geral, esforços globais no combate aos MRA estão sendo feitos por diversos órgãos como o *National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria* (NARMS - EUA) e o *European Antimicrobial Resistance*

Surveillance Network (EARS-Net) na busca por informações relacionadas ao consumo e resistência aos antimicrobianos (GRUNDMANN *et al.*, 2011). Além disso, a *Food and Agriculture Organization* (FAO) e a *World Organisation for Animal Health* (OIE) e a *World Health Organization* (WHO) atuam buscando o controle do uso de antimicrobianos em animais (MARON; SMITH; NACHMAN, 2013; XIONG; SUN; ZENG, 2018). A Fundação Bill e Melinda Gates (<https://www.gatesfoundation.org/>) é responsável por financiar diversos trabalhos relacionados ao estudo da resistência aos antimicrobianos em diversos aspectos ao redor do mundo. O projeto-chapéu, do qual este trabalho faz parte, foi selecionado para financiamento no edital *Grand Challenges Explorations - Brazil - New Approaches to characterize the global burden of antimicrobial resistance* da Fundação Gates.

1.8 MinION como técnica para detecção de genes de resistência

Na prática clínica as técnicas e suas aplicações evoluem e são otimizadas constantemente. A detecção de microrganismos através do cultivo microbiológico ainda é considerado padrão ouro dentre diversas técnicas com aplicações semelhantes. Entretanto, demanda tempo, material e limita-se à detecção de microrganismos cultiváveis. A identificação taxonômica, a montagem de genomas e a possibilidade de análises de mutações, por exemplo, se fazem cada vez mais necessárias. Dessa forma, dá-se espaço às técnicas de sequenciamento de DNA, mais precisamente ao sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *Next-Generation Sequencing*; ZHU *et al.*, 2020).

Em 2014, a empresa *Oxford Nanopore Technologies* lançou o MinION, um sequenciador de pequeno porte capaz de sequenciar fragmentos de DNA com cerca de centenas de milhares de pares de bases. Ao ser inserida no mercado, a tecnologia apresentou diversas vantagens: desde sua portabilidade, possibilitando análises em campo até sua versatilidade, permitindo estudos genômicos, metagenômicos, transcriptômicos, entre outros. Apesar das diversas possibilidades de inovações proporcionadas pela nova tecnologia, ela apresenta acurácia inferior

(85% - 90%) àquelas apresentadas por sequenciadores convencionais (99,999%, sequenciamento de Sanger; 99,92%, Illumina). Em virtude do seu tamanho e peso reduzido (105 mm x 33 mm x 23 mm e 90 g) e o seu baixo custo de insumos, o aparelho torna-se atrativo para pesquisas na área genômica e metagenômica (LAMB *et al.*, 2020; LU; GIORDANO; NING, 2016).

O sequenciamento baseado em nanoporos tem sido muito adotado em estudos relacionados com a resistência aos antimicrobianos devido a sua capacidade em montar genomas, estruturas plasmidiais e a própria detecção de gene de resistência em contextos diagnósticos (LEMON *et al.*, 2017). Além disso, é reconhecida a importância do sequenciamento por nanoporos utilizando *long-reads*, o qual permite a identificação e caracterização de estruturas gênicas com mais de um gene de resistência e as regiões nucleotídicas flanqueadoras. Essas configurações facilitam, além da montagem, o entendimento acerca do hospedeiro que porta consigo esses elementos gênicos (KAMATHEWATTA *et al.*, 2019).

2 JUSTIFICATIVA

O cenário catarinense em relação à produção animal apresenta grande importância social, econômica, ambiental e sanitária no âmbito estadual e nacional. O uso de antimicrobianos nesses ambientes, bem como em unidades de saúde tem grande impacto no contexto de Saúde Única. Além disso, a dinâmica de circulação dos ARG são grandes ameaças ao arsenal farmacoterapêutico que a sociedade usa no dia a dia para tratar diversas infecções. Tendo em vista a importância dos ambientes hospitalares e de criação animal para a geração e dispersão de ARG, é essencial o melhor entendimento e elucidação da dinâmica de circulação dos ARG no Estado de Santa Catarina, sendo esse o principal objetivo do projeto-chapéu no qual este trabalho está inserido. Buscando, além disso, o desenvolvimento de novas estratégias para combater o aumento e disseminação dos MRA e ARG. Em consequência, fica evidenciada a importância de caracterizar o perfil de resistência aos antimicrobianos dos focos principais relacionados ao uso desses fármacos no estado de Santa Catarina.

3 HIPÓTESE

Existe um conjunto de genes de resistência aos antimicrobianos comum presente em granjas de criação animal do oeste catarinense, transportes de pacientes e pacientes internados no HU-UFSC-EBSERH.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar o resistoma do Estado de Santa Catarina através do estudo de amostras de granjas, pacientes e veículos de transporte de pacientes.

4.2 Objetivos Específicos

- 1) Determinar o resistoma bacteriano proveniente das amostras coletadas utilizando sequenciamento de nova geração por metagenômica;
- 2) Avaliar parâmetros de diversidade e similaridade/distância dos resistomas a nível de classe de antimicrobiano e mecanismo de resistência;
- 3) Avaliar o uso de sequenciamento por nanoporos para identificação de genes de resistência visando seu potencial como método de vigilância e controle de infecções;

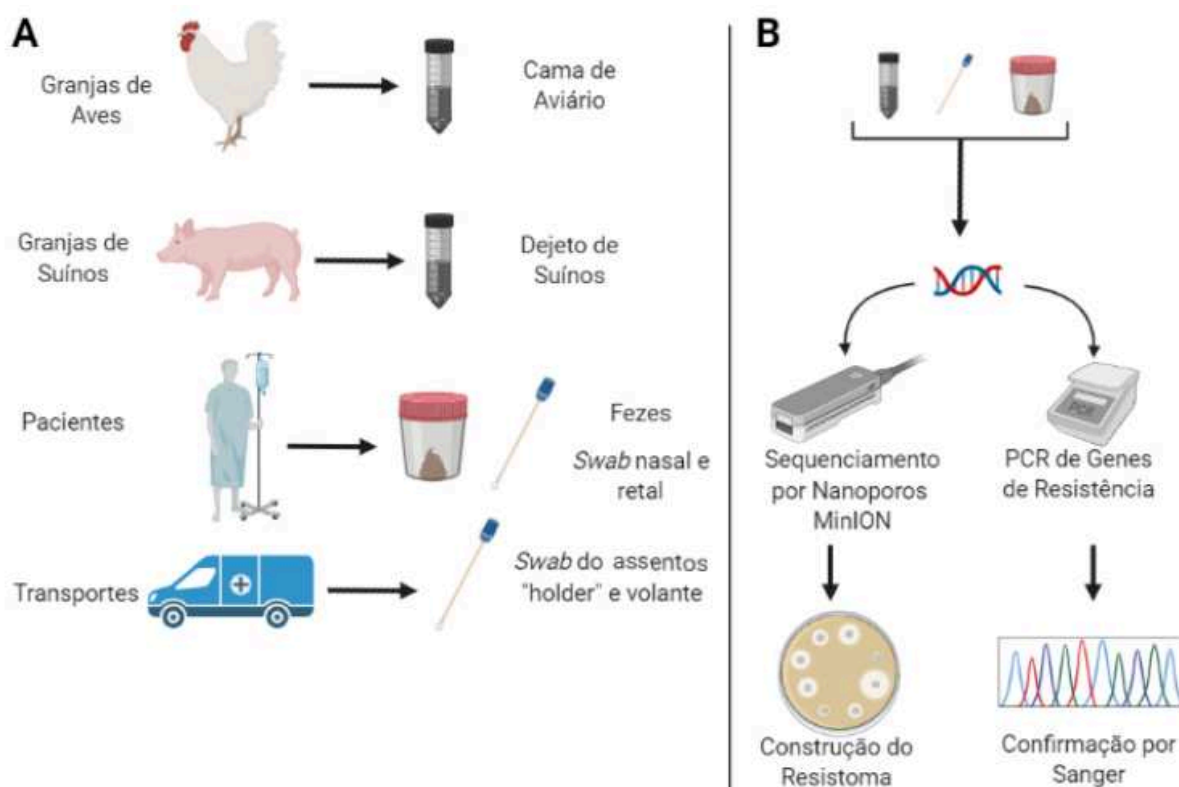
5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostras

O presente projeto definiu a coleta de amostras de diversos locais que tenham uso importante de antimicrobianos e ainda pudessem informar a respeito da circulação dos MRA entre os locais analisados. Assim, foram definidos três núcleos principais: a) núcleo de granjas de produção animal do oeste catarinense; b) núcleo

de pacientes atendidos no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC-EBSERH) e provenientes da região de localização das granjas; e c) núcleo de transportes que conduzem os pacientes dos municípios do oeste catarinense ao HU-UFSC-EBSERH (Figura 8A).

Figura 8. Amostragem e fluxograma da metodologia empregada



Diferentes fontes e tipos de amostras obtidas no trabalho, A. Fluxograma de trabalho partindo da coleta de amostras (topo), as duas diferentes abordagens aplicadas às amostras (centro) e o resultado obtido de cada técnica (base), B. Imagem gerada através da ferramenta BioRender.

Fonte: Próprio autor.

5.2 Núcleo de Granjas

5.2.1 Coleta e Armazenamento de Amostras

As amostras provenientes das granjas foram coletadas em localidades de criação de suínos ou de aves do oeste catarinense, local de intensa produção industrial de produtos desses animais no Estado. As diferentes amostras de granjas de suínos trabalham com animais de corte empregando diferentes sistemas de produção: granjas convencionais (GSC) que fazem uso de antimicrobianos de modo profilático, granjas convencionais que não utilizam antimicrobianos (GSNA) como profilaxia e granjas de agricultura familiar (GSAF) que também não utilizam antimicrobianos. Os aviários participantes da pesquisa trabalhavam somente com aves de corte fazendo uso ou não de antimicrobianos, diferenciando-se por dois diferentes sistemas de produção: granjas convencionais (GAC) que fazem uso de antimicrobianos e granjas de agricultura familiar (GAAF) que não fazem uso de antimicrobianos. Foram utilizados tubos Falcon de 50 mL para auxiliar na coleta, transporte e armazenamento dos dejetos de suínos e das camas de aviários. Foi adicionado volume suficiente de *DNA Shield* (Zymo Research, Estados Unidos) até a total submersão da amostra e, então, foram mantidas em geladeira a 4 °C até seu processamento. Para cada granja foram realizadas duas coletas em dois momentos distintos (os códigos das amostras receberam “C1” ou “C2” de acordo com a coleta). As GSAF passaram por uma limpeza no local de criação dos animais entre as duas coletas constituída por uma raspagem com pás das superfícies e lavagem com água coletada da chuva. Somente para este grupo, a segunda coleta (C2) refere-se ao momento pós limpeza. Foram coletados dados de número médio de animais nas unidades, número de lotes, fonte de água da propriedade, sistema de tratamento de dejetos aplicado na granja.

5.3 Núcleo de Transportes

5.3.1 Coleta e Armazenamento de Amostras

O núcleo de transportes foi composto por *swabs* flocados de superfície constituídos por material de fibras curtas perpendiculares de Nylon[®] (Copan, Itália). Os *swabs* foram umedecidos com solução salina 0,9% estéril previamente ao momento da coleta. As coletas foram realizadas através de dez passagens de cada lado da ponta do *swab* no volante, encostos de assentos e apoio para entrar no veículo - “holder”. As amostras relacionadas aos encostos foram realizadas em duplicata em razão do grande número de assentos nos veículos. O material então foi direcionado ao laboratório MIMA para armazenamento a -20 °C até o seu processamento.

5.4 Núcleo de Pacientes

5.4.1 Recrutamento de pacientes

Foi desenvolvido um sistema interno junto ao HU-UFSC-EBSERH para que fosse possível a triagem dos pacientes de maneira integrada com todos os setores de internação do hospital. O sistema contou com o elenco de pacientes internados atualizado em tempo real e ordenado de acordo com suas cidades de origem. De acordo com os objetivos da pesquisa, buscaram-se pacientes que fossem provenientes de qualquer município pertencente à mesorregião do Oeste Catarinense, região de localização das granjas de produção animal. Diariamente esse sistema foi consultado para que, a partir da triagem, os pacientes que se encaixavam nos critérios de origem fossem convidados a participar da pesquisa.

Foram entrevistados todos os pacientes triados, explicitando os pontos envolvidos em relação à sua possível participação na pesquisa. Foi dado a cada paciente um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE; Apêndice A) para leitura que continha todos os objetivos assim como foram proporcionados todos os esclarecimentos quanto ao trabalho científico. Em casos de pacientes analfabetos, o TCLE era lido juntamente com o indivíduo a fim de que houvesse total compreensão

da importância do estudo e das consequências de sua eventual participação. A partir do consentimento do paciente, iniciou-se a etapa seguinte: a coleta das amostras.

Foram coletados dados clínicos dos pacientes como idade, sexo, motivo da internação, procedimentos realizados e uso de antimicrobianos para complementação de dados do estudo. Outras informações como culturas positivas detectadas por exames de rotina hospitalar também foram avaliadas.

5.4.2 Coleta e Armazenamento de Amostras

Foram coletadas amostras de fezes e *swab* nasal no momento da internação (com limite de 72 h a partir do momento da entrada do paciente no hospital) e no momento da alta. Caso houvesse o impedimento da coleta de fezes, era proposto ao paciente a possibilidade de realizar, alternativamente, a coleta de *swab* retal. Todas as coletas foram realizadas com o auxílio de um médico ou enfermeiro do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) e participantes do projeto de pesquisa.

5.4.3 Swabs

Os *swabs*, independente se nasal ou retal, possuíam as mesmas especificações citadas no item 5.3.1. Os *swabs* nasais possuíam hastes mais finas e maleáveis para melhor execução da coleta. Os *swabs* retais, de outra forma, possuíam hastes mais espessas e rígidas para facilitar a introdução no local de coleta.

O procedimento de coleta da secreção nasal iniciou-se com a introdução do *swab* na cavidade nasal. Em seguida, realizaram-se dez movimentos circulares suaves. A coleta anorretal foi realizada a partir da introdução do *swab* alcançando o reto. Em seguida, foram feitos dez movimentos circulares e a amostra foi encaminhada ao laboratório. As amostras de *swabs* foram congeladas em freezer -20 °C até o seu processamento.

5.4.4 Amostras de fezes

As amostras de fezes foram coletadas pelos pacientes em frascos plásticos estéreis grandes tendo sido previamente instruídos para a coleta de forma efetiva e sem contaminação de outros elementos. Posteriormente, em laboratório, as amostras foram transferidas para frascos estéreis menores, e mantidas em geladeira a 4 °C até o momento do seu processamento. Após o processamento das fezes, o restante das amostras foi direcionado ao congelamento em freezer - 20 °C para armazenamento. As amostras de fezes foram direcionadas tanto para análises de biologia molecular e sequenciamento.

5.4.5 Codificação das amostras de pacientes

Para facilitar o entendimento do trabalho e identificação no momento de manipulação das amostras, foi desenvolvido um código referente às informações das amostras de pacientes. O código inicia com o número relativo à ordem na qual os pacientes foram recrutados. Assim, o primeiro paciente recrutado recebeu, em todas as amostras, o número 1 (um) no início do código. Em seguida, o segundo caráter refere-se ao momento da coleta: caso ela tenha sido coletada no momento da internação hospitalar receberá um “i” ou, se for na alta, terá um “a”. Por fim, indica-se o sítio de coleta da amostra. Para isso utiliza-se “f” para amostras fecais, “n” para coleta de *swab* nasal e “r” para *swab* retal. O código “4ar”, por exemplo, indica uma amostra do quarto paciente recrutado, no momento da alta hospitalar e de *swab* retal.

5.5 Análises de metagenômica

Para a identificação das espécies e obtenção do resistoma encontrado nas comunidades microbianas das amostras, foi realizado a extração do DNA e seu respectivo sequenciamento. Utilizou-se o dispositivo minION (Oxford Nanopore Technologies), uma tecnologia baseada no sequenciamento de ácidos nucleicos por nanoporos.

5.5.1 Extração de DNA

Cada tipo de amostra foi submetido a um protocolo de extração de DNA distinto, e para todas as amostras de *swabs* e fezes foram utilizados kits comerciais, citados a seguir.

5.5.1.1 Extração de DNA de amostras obtidas por *swabs*

Para a obtenção do DNA total dos *swabs* flocados, fez-se uso do kit comercial *ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit* (Zymo Research, Estados Unidos) conforme as recomendações do fabricante. Para tanto, os *swabs* foram descongelados e acondicionados em microtubos denominados *ZR BashingBead™ Lysis Tubes* contendo 750 μL de solução *ZymoBIOMICS™ Lysis Solution*. As amostras foram colocadas em um *bead beater* para homogeneizá-las eficientemente sob velocidade máxima durante 5 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 1 min. Após essa etapa, iniciou-se a etapa de colunas de purificação *Zymo-Spin™ III-F Filter* com 400 μL do sobrenadante obtido anteriormente acondicionadas em tubos coletores (*Collection Tube*) e, então, centrifugados a 8.000 x g por 1 min. As colunas utilizadas foram descartadas e foram adicionados 1.200 μL do tampão de ligação *ZymoBIOMICS™ DNA Binding Buffer* aos filtrados dos tubos. As soluções foram agitadas e, em seguida, 800 μL da mistura foram transferidas para coluna *Zymo-Spin™ IICR Column* com um novo tubo coletor. Os microtubos foram centrifugados a 10.000 x g por 1 min. Descartou-se o filtrado e repetiu-se a etapa anterior com o restante de amostra. Após a centrifugação, foram adicionados 400 μL do tampão de lavagem *ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 1* à última coluna utilizada em um novo tubo coletor. O microtubo foi centrifugado por 1 min a 10.000 x g e foi descartado o filtrado. Posteriormente, na mesma coluna, foram colocados 700 μL do tampão de lavagem *ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 2* e, novamente, centrifugou-se as amostras durante 1 min a 10.000 x g. Descartou-se o filtrado e foram adicionados mais 200 μL do tampão de lavagem *ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 2* às

colunas. As amostras foram mais uma vez centrifugadas a 10.000 x g por 1 min e a coluna foi transferida para um microtubo novo de 1,5 mL. Foram adicionados 50 µL de água livre de DNase/RNase (*ZymoBIOMICS™ DNase/RNase Free Water*) diretamente na matriz da coluna e foi incubado por 1 min. Para a eluição do DNA, os tubos foram centrifugados por 1 min a 10.000 x g. O DNA ainda foi tratado em uma última coluna preparada no momento do uso. Para tanto, foram utilizados 600 µL de uma solução de preparação (*ZymoBIOMICS™ HRC Prep Solution*) em uma coluna *Zymo-Spin™ III-HRC Filter* em um novo tubo coletor. A coluna em preparação foi centrifugada por 3 min a 8.000 x g. Com a coluna pronta, o volume total de DNA eluído anteriormente foi transferido para a coluna acondicionada em um novo microtubo de 1,5 mL. Por fim, a amostra foi centrifugada a 15.100 x g por 3 min. O DNA foi armazenado em geladeira a 4 °C por no mínimo 24 h após o fim do processo de extração para posterior quantificação.

5.5.1.2 Extração de DNA de amostras de fezes

As amostras de fezes foram submetidas ao processo de extração de DNA através do kit comercial *Quick-DNA™ HMW MagBead Kit* (Zymo Research, Estados Unidos) seguindo as recomendações do fabricante. O protocolo é baseado em duas grandes etapas: a preparação e a purificação. Todos os passos foram executados à temperatura ambiente. Inicialmente, foi preparada a proteinase K adicionando 1.140 µL do tampão de estocagem em cada tubo de Proteinase K (20 mg) anterior ao seu uso (concentração final de 20 mg/mL). Os tubos preparados foram armazenados a -20 °C até o seu uso. Para o início do protocolo, primeiramente, parte do material coletado foi amostrado em microtubos. Foram adicionados 200 µL de *DNA Shield* na amostra, agitada e incubada por 5 min em um rotor de tubos (*HulaMixer* - Thermo Fischer Scientific). Em seguida, para a fase de lise microbiana, as amostras foram centrifugadas a 5.000 x g por 1 min, e então o sobrenadante (aproximadamente 180 µL) foi transferido para um novo tubo e reservou-se tanto o sedimento quanto o sobrenadante. Foram adicionados 100 µL de PBS ao sedimento e a mistura foi ressuspensa. Os tubos foram centrifugados a 5.000 x g durante 1 min e uniu-se o sobrenadante resultante àquele já reservado

(volume total de aproximadamente 280 μL). Foi adicionado um volume de 1 mL de PBS ao sedimento e, novamente, ressuspendeu-se a mistura. O tubo foi centrifugado novamente utilizando os mesmos parâmetros anteriores e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se no sedimento 100 μL de tampão TE (Tris-HCl e EDTA) e, também, 25 μL de lisozima (100 mg/mL), misturando bem e incubando a solução por 30 min a 37 °C em banho seco. Após, misturou-se o sobrenadante anteriormente reservado e a amostra recém digerida. Adicionou-se 20 μL de SDS 10% e 10 μL de proteinase K ao tubo e agitou-se rapidamente. Os tubos foram dispostos em banho seco a 55 °C por 10 min e, ao fim da incubação, as amostras foram centrifugadas a 5.000 g por 1 min e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos. Para finalizar a parte de preparação, foram adicionados 800 μL do tampão *Quick-DNA™ MagBinding* e misturou-se bem.

Para a etapa de purificação, foram adicionados 33 μL de *MagBinding Beads* em cada amostra e a mistura foi agitada por pipetagem por 5 vezes. As amostras foram colocadas em um rotor *HulaMixer* para agitação durante 5 min e, em seguida, os microtubos foram posicionados na estante magnética e foram mantidos até a separação total das *beads* da solução. Após, removeu-se o sobrenadante, sendo então descartado. A partir disso, todos os tubos foram removidos da estante magnética e foram adicionados 500 μL do tampão *Quick-DNA™ MagBinding Buffer*. A solução foi novamente misturada com o auxílio da micropipeta e foi submetida a agitação em *HulaMixer* por 5 min. As amostras foram colocadas na estante magnética para separação das *beads* e, após a completa separação, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram retirados da estante magnética. Foram adicionados 500 μL do tampão *DNA Pre-Wash Buffer*, as *beads* foram ressuspendidas através de pipetagem e as amostras foram depositadas na estante magnética até a total separação das *beads* para que fosse descartado o sobrenadante. Os tubos, já fora da estante magnética, foram acrescidos de 900 μL do tampão de lavagem *g-DNA Wash Buffer* e a solução foi ressuspendida por pipetagem. Todo o líquido foi transferido para um novo microtubo e as amostras foram posicionadas na estante magnética. O sobrenadante foi descartado e os últimos passos para lavagem foram realizados novamente. Após a segunda lavagem, as amostras foram colocadas em estufa a 35 °C (± 2 °C) para secagem

por 10 min e, após, foram adicionados 50 μL do tampão *DNA Elution*. Em seguida, as amostras foram misturadas 20x com o auxílio de uma pipeta e incubadas por 5 min a temperatura ambiente. A amostra foi colocada na estante magnética até total separação das *beads* e o que foi eluído foi transferido para um novo tubo que foi armazenado em geladeira por, no mínimo, 24 h para posterior quantificação de DNA.

5.5.1.3 Extração de DNA de amostras de granjas

Os dejetos de animais foram submetidos ao mesmo processo de extração de DNA estabelecido para as amostras de fezes. Assim, utilizou-se o kit comercial *Quick-DNA™ HMW MagBead Kit* (Zymo Research, Estados Unidos) com base no mesmo protocolo citado anteriormente.

5.5.2 Análise qualitativa e quantitativa dos DNA extraídos

A partir do DNA extraído, todas as amostras foram quantificadas utilizando dois equipamentos distintos: o Qubit (Invitrogen/Thermo Fischer), baseado em fluorimetria, e o NanoVue (BioChrom), baseado em espectrofotometria.

5.5.2.1 Análise de DNA por fluorimetria

Para a quantificação de DNA utilizando o *Qubit® fluorometer* foram seguidas as diretrizes apontadas pelo fabricante. Foi utilizado o kit comercial *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit*. O equipamento foi calibrado com padrões S1 e S2 (*Standard 1* e *Standard 2*) novos preparados cada vez que se quantificava um novo conjunto de amostras. Primeiramente, foi preparado um Mix denominado *Quant-iT™ Working Solution* contendo 199 μL do tampão *Quant-iT™ Buffer* e 1 μL da solução *Quant-iT™ Reagent* (agente fluorescente). Para cada amostra e para cada padrão foi preparado uma solução de 200 μL de *Quant-iT™ Working Solution*. Após a preparação do Mix comum, foi distribuído o volume unitário para microtubos fornecidos pelo fabricante específicos para o uso no Qubit, sendo utilizado 190 μL

de *Quant-iT™ Working Solution* para cada um dos padrões e 198 μL para cada amostra. Em cada tubo foi adicionado 2 μL de DNA correspondente a cada amostra. Para os padrões, foram utilizados 10 μL de cada solução padrão já fornecida pelo kit. Em seguida, todos os tubos passaram por vortex por 2-3 segundos e, então, foram incubados por 2 min à temperatura ambiente. Após, os tubos foram colocados, um a um, no fluorômetro para leitura e o ajuste nas configurações foi feito para o cálculo de concentração de DNA relativo ao uso de 2 μL de amostra.

5.5.2.2 Análise de DNA por espectrofotometria

Para esta análise foi empregado o aparelho NanoVue, primeiramente, calibrou-se o branco utilizando 2 μL de água livre de DNase/RNase ou da solução *DNA Elution* fornecida pelos kits comerciais correspondente ao tipo de amostra a ser quantificado. Em seguida, foram lidas todas as amostras, uma a uma, coletando os dados de concentração em $\text{ng}/\mu\text{L}$ e as razões de absorbância A260/A280 para verificar a qualidade do DNA conforme contaminação por lipídeos ou proteínas e A280/A230 para avaliar a contaminação por agentes orgânicos. Para a leitura, foram utilizados 2 μL de cada amostra. Após cada leitura, fez-se uso de um lenço para limpeza do laser e evitar a contaminação entre as amostras.

5.5.3 Preparação das bibliotecas para sequenciamento

Para a preparação das bibliotecas metagenômicas foi utilizado o kit comercial específico da Oxford Nanopore Technologies denominado *Rapid Barcoding Kit (SQK-RBK004)* que exige um *input* mínimo de 400 ng de gDNA de grande peso molecular (*long-reads*), e cuja fragmentação é baseada na ação de uma transposase. O kit contempla 12 diferentes *barcodes*, permitindo o sequenciamento simultâneo de 12 amostras, e as *reads* produzidas foram do tipo unidirecional (1D). A partir dos dados obtidos das quantificações de cada amostra, calculou-se o volume necessário para submeter 400 ng de DNA total ao sequenciamento. Para normalizar os volumes, foi adicionada a quantidade suficiente de água livre de nucleases para obter um volume final de 7,5 μL por amostra. Foram acrescentados

2,5 μL de *Fragmentation Mix RB 1-12* (RB01-12) em cada um dos tubos, sendo cada um dos *barcodes*, de 1 a 12, direcionado à amostra correspondente. Com um volume final de 10 μL , os tubos foram agitados manualmente e foi dado um *spin* em todas as amostras. As soluções foram incubadas em termociclador a 30 °C por 1 min e, em seguida, a 80 °C durante 1 min. Ao fim da incubação, as amostras foram resfriadas em gelo e misturadas em um único tubo de 2,0 mL, obtendo-se um *pool* contendo os 12 diferentes *barcodes*. Foi acrescentado o mesmo volume ao *pool* de *beads* magnéticas (AMPure XP - A63881, Beckman Coulter) e a mistura foi levada ao *HulaMixer* para agitação durante 5 min. Após a agitação, foi realizado um *spin* e o microtubo foi colocado na estante magnética por, aproximadamente, 2 min, o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado duas vezes com etanol 70% novo. Após as lavagens, foi retirado o máximo do volume do etanol 70% com o auxílio de uma micropipeta, em seguida o tubo foi mantido aberto na estante magnética a temperatura ambiente para total secagem do sedimento. Fora da estante magnética, o *pellet* foi ressuspensionado em 10 μL de tampão Tris-HCl a 10 mM (com NaCl a 50 mM - pH = 8,0). Novamente o tubo foi posicionado na estante magnética para total separação da solução contendo o DNA purificado e das *beads*. Foi adicionado à biblioteca 1 μL da solução *Rapid Adapter* (RAP) e a mistura foi incubada por 5 min a temperatura ambiente e, então, colocada em gelo.

Para as próximas etapas, foi necessário descongelar, agitar em vortex, aplicar *spin* e colocar em gelo sequencialmente os reagentes *Sequencing Buffer* (SQB) e somente um microtubo de *Flush Buffer* (FLB ou FB). Para o uso do reagente *Flush Tether* (FLT) foi feito *spin* após seu descongelamento e, em seguida, misturado com uma micropipeta para ser colocado em gelo. Por fim, o reagente *Loading Beads* (LB) foi descongelado e colocado em gelo. Após a preparação dos reagentes, foram colocados 30 μL de FLT ao tubo de FLB ou FB. A solução foi misturada por pipetagem e iniciou-se a manipulação do dispositivo MinION. Com uma nova *Flow Cell* (FLO-MIN106D, R9.4.1) disposta no equipamento, sua *Priming Port* foi aberta para exposição e retirada de líquido através do uso de uma micropipeta. Para tanto, ajustou-se a pipeta (P1000) em 200 μL , introduziu-se a ponteira na abertura e lentamente o volume foi ajustado até 220-230 μL . Na mesma abertura, foram adicionados 800 μL da solução de FLT com FLB ou FB lentamente

para evitar a formação de bolhas. Durante os 5 min de incubação, foi finalizada a preparação da biblioteca. Para tanto, os 11 μL da biblioteca purificada foram acrescidos de 4,5 μL de água livre de nucleases, 34 μL de SQB e 25,5 μL de LB. Posteriormente, foi aberta a porta *SpotON* e foram adicionados 200 μL da mistura entre FLT e FLB ou FB na *Priming Port*. Por fim, foram colocados 75 μL da biblioteca preparada na porta *SpotON*, gota a gota, com a *Priming Port* aberta. Todas as portas da *Flow Cell* foram fechadas, inclusive a do dispositivo MinION.

Com o equipamento conectado ao computador, antes de iniciar o sequenciamento, fez-se a contagem de poros disponíveis na *Flow Cell*. Em seguida, verificaram-se as configurações da corrida sendo todas mantidas em *default* com exceção do tempo de corrida que foi estabelecido para ocorrer durante 24 h. Para cada corrida foram executados dois métodos de *basecalling*: *fast* (desempenhado pelo próprio MinION ao fim da corrida) e o *high* (processado pela ferramenta offline Guppy, v3.4.5).

5.5.4 Lavagens da *Flow Cell*

Para utilizar uma *Flow Cell* para duas corridas sequenciais, foi necessário realizar a lavagem das mesmas, tal como recomendado pelo fabricante. Utilizou-se o kit comercial *Flow Cell Wash Kit* (Oxford Nanopore Technologies). Para tanto, retirou-se todo o tampão através da *Waste Port* e, com o auxílio de uma micropipeta P1000, foi ajustado até o volume de 200 μL . Então, com a ponteira encaixada na abertura da *Priming Port*, aumentou-se o volume até aproximadamente 220-230 μL . Foram inseridos 150 μL da solução A (*Wash Solution A*) na *Priming Port* e aguardaram-se 10 min. Na mesma abertura foram adicionados 150 μL da solução B (*Wash Solution B*) tendo, assim, o dispositivo pronto para receber uma nova corrida.

Após o sequenciamento, caso a *Flow Cell* fosse armazenada, deveria ser realizado um procedimento distinto utilizando o mesmo kit comercial citado anteriormente (*Flow Cell Wash Kit*). Inicialmente, utilizou-se uma micropipeta P1000 ajustada em 200 μL , introduziu-a na *Waste Port* e retirou-se todo o volume ali contido aumentando o volume da pipeta. Na *Priming Port* foram adicionados 150 μL de tampão A (*Wash Solution A*) e aguardar 10 min. Na mesma abertura foram

inseridos 500 μ L do tampão S (*Storage Buffer*). Por fim, foi contabilizado o número de poros restantes e, então, a *Flow Cell* foi armazenada.

5.5.5 Resultado do Sequenciamento

Ao final de cada sequenciamento, obtiveram-se arquivos em formato FASTQ contendo as sequências geradas e pontuações de qualidade. Esses mesmos arquivos foram direcionados para posteriores análises de identificação de genes de resistência.

5.5.5.1 Análise do resistoma

Os resultados do sequenciamento foram submetidos ao fluxo de trabalho de identificação de genes de resistência aos antimicrobianos disponível na plataforma EPI2ME (v.2019.7.9, ONT, <https://epi2me.nanoporetech.com/>). Esse fluxo de trabalho é baseado no uso das ferramentas WIMP (*What's In My Pot*) e ARMA (*Antibiotic Resistance Mapping Application*) para identificação taxonômica e de determinantes de resistência. O WIMP utiliza o classificador *Centrifuge* para identificação de microrganismos e o ARMA utiliza o banco de dados CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) o qual possui sequências de genes de resistência aos antimicrobianos e dados de ontologia.

Inicialmente, todas as *reads* foram reconhecidas pelo seu respectivo *barcode* e foi realizada uma verificação da qualidade média das *reads* por base. *Reads* com *q-score* inferiores a 7 foram filtradas. Dados de controle de qualidade como tamanho médio das *reads* e número de *reads* analisadas foram tabulados. Amostras com rendimento (*Total Yield*) inferior a 1,0 Mb foram excluídas do estudo devido a sua baixa representatividade em termos de detecção de genes de resistência. Tal decisão foi tomada baseada na observação dos nossos próprios resultados, correlacionando os genes de resistência identificados nas amostras com o rendimento gerado pelo sequenciamento. Os dados de resistoma obtidos através do ARMA foram exportados e analisados com base em diversas classificações e filtros. O CARD foi utilizado para consulta e aprofundamento das análises. Foram levadas

em consideração informações relativas à classificação dos antimicrobianos aos quais os genes conferem resistência e estudos epidemiológicos fornecidos pelo banco de dados.

5.5.5.2 Análise exploratória, estatística e geração de gráficos

Os dados do sequenciamento foram organizados em matrizes binárias Amostra x Gene indicando a ausência (0) ou a presença (1) de cada gene nas amostras (CHE *et al.*, 2019). A ferramenta *online Draw Venn Diagram* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) foi utilizada para verificar genes únicos e comuns entre os diferentes grupos amostrais. Os gráficos e as análises estatísticas foram gerados e realizados utilizando o *programa ResistoXplorer* (DHARIWAL *et al.*, 2021; <http://www.resistoxplorer.no/>). Os filtros relacionados às contagens de genes e variâncias foram configurados para não excluir qualquer elemento ou contagem. Não foi realizado nenhum processo de rarefação e transformação dos dados. Os dados foram normalizados utilizando o *Total Sum Scaling* (TSS) (PEREIRA *et al.*, 2018).

A análise de composição do resistoma foi realizada com base nos dados de frequência absoluta e percentual dos genes detectados por amostra. Foram gerados *box plots* para avaliar o índice de alfa-diversidade observado. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R 4.1 (R CORE TEAM, 2020) através do teste de Shapiro-Wilk para acessar a normalidade dos grupos. Foram empregados os testes de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos e teste de Dunn para comparações múltiplas. Para a geração dos dendrogramas foi selecionada a medida de distância *Bray-Curtis Index* e o algoritmo de clusterização Ward. Os *heatmaps* foram gerados utilizando o algoritmo de *clusterização* Ward e a *clustering distance Bray-Curtis Index*. Para os gráficos de PCoA (*Principal Coordinates Analysis*) foram selecionados o método de distância *Bray-Curtis Index* e o método estatístico.

5.6 Confirmação da presença de ARG clinicamente relevantes por PCR convencional

Com o objetivo de confirmar a presença de ARG nas amostras pela sua relevância clínica foram realizadas PCRs (do inglês: Reação em Cadeia da Polimerase). Para os genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} foi realizada PCR convencional do tipo *singleplex*. Já para os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} e os genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* foram analisados em duas reações diferentes por PCR do tipo *Multiplex*. Todos os iniciadores utilizados estão indicados na Tabela 1.

Apenas parte das amostras coletadas de granjas e pacientes foram submetidas à repetição do processo de extração de DNA e subsequente PCR. Somente amostras de fezes de paciente e de granjas armazenadas em DNA Shield foram utilizadas nessa etapa, ou seja, as amostras referentes à coleta 1 de suínos convencionais (com ou sem uso de antimicrobianos), todas as amostras de granjas de suínos de agricultura familiar (coleta 1 e 2) e somente as amostras de aves convencionais e de agricultura familiar da coleta 1.

5.6.1 PCR convencional para os genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}

Os *primers* para *bla*_{CTX-M-1} amplificam os tipos: CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-12, CTX-M-15, CTX-M-22, CTX-M-23, CTX-M-28, CTX-M-29, CTX-M-33, CTX-M-42, CTX-M-52, CTX-M-54, CTX-M-55, CTX-M-60, CTX-M-62, CTX-M-66, CTX-M-69, CTX-M-72, CTX-M-79, CTX-M-80, CTX-M-82, CTX-M-96, CTX-M-101, CTX-M-103, CTX-M-114, CTX-M-116, CTX-M-117, CTX-M-132, CTX-M-136, CTX-M-139, CTX-M-142, CTX-M-144, CTX-M-150, CTX-M-155, CTX-M-156, CTX-M-157, CTX-M-162, CTX-M-163, CTX-M-164, CTX-M-167, CTX-M-170, CTX-M-172, CTX-M-173, CTX-M-176, CTX-M-179, CTX-M-180, CTX-M-181, CTX-M-182, CTX-M-183 e CTX-M-184.

Tabela 1. Lista de iniciadores e tamanho dos fragmentos

Genes	Sequências dos iniciadores	Tamanho dos fragmentos	Referências
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	F 5'-GCA AAC TCT GCG GAA TCT GAC G-3' R 5'-CCG CGA TAT CGT TGG TGG TG-3'	182 pb	TARTARI, 2020
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	F 5'-GAT GGC GAC GCT ACC CCT GC-3' R 5'-GCG GCC GCC ATC ACC TTA CT-3'	204 pb	TARTARI, 2020
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	F 5'-AAT CCG ATT GCC GAA AAA CAC G-3' R 5'-AGC CGT CAC GCC TCC CG-3'	135 pb	TARTARI, 2020
<i>bla</i> _{KPC}	F 5'-GCC GCT GGC TGG CTT TTC TG-3' R 5'-GCG CCT GAG CCG GTA TCC AT-3'	120 pb	TARTARI, 2020
<i>bla</i> _{NDM}	F 5'-GGT TTC GGG GCA GTC GCT TC-3' R 5'-CCA TAC CGC CCA TCT TGT CCT G-3'	184 pb	TARTARI, 2020
<i>bla</i> _{TEM}	F 5'-TTC CGT GTC GCC CTT ATT C-3' R 5'-CCT GAC TCC CCG TCG TGT A-3'	782 pb	Modificado de DALLEENNE <i>et al.</i> , 2010
<i>bla</i> _{SHV}	F 5'-GCA AAT TAA ACT AAG CGA AAG CC-3' R 5'-GTA TCC CGC AGA TAA ATC ACC AC-3'	705 pb	Modificado de DALLEENNE <i>et al.</i> , 2010
<i>mcr-1</i>	F 5'-ATG CCA GTT TCT TTC GCG TG-3' R 5'-TCG GCAAAT TGC GCT TTT GGC-3'	502 pb	LESCAT, POIREL e NORDMANN, 2018

<i>mcr-2</i>	F	5'-GAT GGC GGT CTA TCC TGT AT-3'	379 pb	LESCAT, POIREL e NORDMANN, 2018
	R	5'-AAG GCT GAC ACC CCA TGT CAT-3'		
<i>mcr-3</i>	F	5'-ACC AGT AAA TCT GGT GGC GT-3'	296 pb	LESCAT, POIREL e NORDMANN, 2018
	R	5'-AGG ACA ACC TCG TCA TAG CA-3'		
<i>mcr-4</i>	F	5'-TTG CAG ACG CCC ATG GAA TA-3'	207 pb	LESCAT, POIREL e NORDMANN, 2018
	R	5'-GCC GCA TGA GCT AGT ATC GT-3'		
<i>mcr-5</i>	F	5'-GGA CGC GAC TCC CTA ACT TC-3'	608 pb	LESCAT, POIREL e NORDMANN, 2018
	R	5'-ACA ACC AGT ACG AGA GCA CG-3'		

Os *primers* para *bla*_{CTX-M-2} amplificam as variantes: CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20, CTX-M-31, CTX-M-35, CTX-M-43, CTX-M-44, CTX-M-56, CTX-M-59, CTX-M-76, CTX-M-77, CTX-M-92, CTX-M-95, CTX-M-97, CTX-M-115, CTX-M-124, CTX-M-131, CTX-M-141, CTX-M-165 e CTX-M-171.

Os *primers* para *bla*_{CTX-M-9} amplificam os tipos: CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-24, CTX-M-27, CTX-M-38, CTX-M-46, CTX-M-47, CTX-M-48, CTX-M-49, CTX-M-50, CTX-M-51, CTX-M-65, CTX-M-73, CTX-M-81, CTX-M-83, CTX-M-84, CTX-M-85, CTX-M-87, CTX-M-90, CTX-M-93, CTX-M-98, CTX-M-99, CTX-M-102, CTX-M-104, CTX-M-105, CTX-M-112, CTX-M-113, CTX-M-122, CTX-M-125, CTX-M-126, CTX-M-129, CTX-M-130, CTX-M-132, CTX-M-134, CTX-M-137, CTX-M-147, CTX-M-148, CTX-M-159, CTX-M-168 e CTX-M-174.

Os *primers* para o gene *bla*_{KPC} amplificam as variantes: KPC-1, KPC-2, KPC-3, KPC-4, KPC-5, KPC-6, KPC-7, KPC-8, KPC-10, KPC-11, KPC-12, KPC-13, KPC-14, KPC-15, KPC-16, KPC-17, KPC-18, KPC-19, KPC-21, KPC-22, KPC-24 e KPC-25.

Os *primers* para o gene *bla*_{NDM} amplificam os tipos: NDM-1, NDM-2, NDM-3, NDM-4, NDM-5, NDM-6, NDM-7, NDM-8, NDM-9, NDM-10, NDM-11, NDM-12, NDM-13, NDM-14, NDM-15 e NDM-16.

Independente do gene de interesse, todas as reações foram preparadas da mesma maneira. As reações foram preparadas para um volume final de 10 μ L, sendo 5 μ L de GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega[®]), 2 μ L de água ultra-pura, 1 μ L de cada *primer* e 50 ng de DNA. O programa empregado em termociclador (Veriti 96-well, Applied Biosystems[®]) foi de desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos dividido em três etapas: desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 63 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s. Ao fim, as reações foram submetidas à 72 °C por 7 min para a extensão final dos produtos.

5.6.2 PCR *Multiplex* para os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}

A PCR *Multiplex* teve como objetivo amplificar fragmentos relativos às β -lactamases SHV e TEM. Os *primers* para *bla*_{SHV} amplificam os tipos: SHV-1, SHV-2, SHV-5, SHV-7, SHV-8, SHV-10, SHV-11, SHV-12, SHV-13, SHV-18, SHV-19, SHV-24, SHV-25, SHV-26, SHV-27, SHV-28, SHV-29, SHV-30 - 38, SHV-40 - 44, SHV-46, SHV-48, SHV-49, SHV-50, SHV-51, SHV-55, SHV-56, SHV-57, SHV-59, SHV-60 - 71, SHV-73, SHV-83, SHV-85, SHV-86, SHV-89, SHV-92, SHV-93 - 109, SHV-120 - 126, SHV-129, SHV-132 - 137, SHV-140, SHV-141, SHV-142, SHV-144, SHV-145, SHV-147, SHV-148, SHV-150 - 163, SHV-165, SHV-167, SHV-168.

Os iniciadores para *bla*_{TEM} amplificam os tipos: TEM-1, TEM-19, TEM-52, TEM-116, TEM-135, TEM-143, TEM-153, TEM-177, TEM-183, TEM-185, TEM-186, TEM-188, TEM-189, TEM-190, TEM-193, TEM-194, TEM-195, TEM-196, TEM-197, TEM-199, TEM-201.

As reações foram preparadas em volume final de 10 μ L com 4,2 μ L de água ultra-pura, 2,0 μ L de tampão comercial 5x (5X Green GoTaq[®] Reaction Buffer, Promega[®]), 0,6 μ L de MgCl₂ (1,5 mM), 1,0 μ L de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP; 200 μ M), 0,5 μ L de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*; 1 μ M), 0,2 μ L (1 U) de enzima (GoTaq[®] DNA Polymerase, Promega[®]; 5 U/ μ L) e 1 μ L de DNA.

O programa utilizado em termociclador (Veriti 96-well, Applied Biosystems[®]) para a amplificação foi de um ciclo único a 95 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos dividido em três etapas (desnaturação: 95 °C por 30 s; anelamento: 56 °C por 40 s; e extensão: 72 °C por 1 min). Ao fim, as reações foram submetidas à 72 °C por 7 min.

5.6.3 PCR *Multiplex* para os genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*

Para tanto, foram utilizados cinco diferentes pares de *primers* para as cinco variantes a serem amplificadas: *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*. O volume final estabelecido para a reação foi de 25 μ L, sendo essa composta por 12,5 μ L de

GoTaq® qPCR Master Mix (Promega®), 1,1 µL de cada um dos 10 *primers*, 0,5 µL de água ultra-pura e 50 ng de DNA.

Em termociclador Veriti 96-well (Applied Biosystems®) as amostras foram submetidas às seguintes condições de tempo e temperatura: desnaturação inicial a 94 °C por 15 min seguido por 25 ciclos divididos em três etapas (desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 58 °C por 1 min e 30 s, extensão a 72 °C por 1 min. Por fim, as amostras passaram por um processo de extensão final a 72 °C por 1 min.

5.7 Eletroforese em Gel

5.7.1 Análise de produtos de PCR de genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}

Os fragmentos relativos aos genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} foram aplicados em gel de agarose 2% em tampão TBE (Tris 89 mM, Borato 89 mM e EDTA 2 mM) com brometo incorporado (0,5 µg/mL). Foi utilizado o tampão de corrida (5X Green GoTaq® Flexi Reaction Buffer; Promega®) na proporção 3:5 (tampão:amostra) e marcador de tamanho molecular comercial 100 bp DNA Ladder (Promega®). A diferença de potencial estabelecida para a corrida foi de 80 V nos primeiros 10 min, seguido por 40 min adicionais a 100 V.

5.7.2 Análise de produtos de PCR de genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}

Os amplicons para *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} foram aplicados em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris 89 mM, Borato 89 mM e EDTA 2 mM) com brometo incorporado (0,5 µg/mL) para visualização dos fragmentos obtidos. Todo o resto do procedimento foi similar ao item 5.7.1.

5.7.3 Análise de produtos de PCR de genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*

Os produtos das reações de PCR para *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* foram aplicados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (Tris 89 mM, Borato 89 mM e EDTA 2 mM) com brometo incorporado (0,5 µg/mL) para visualização dos fragmentos obtidos. Todo o resto do procedimento foi similar ao item 5.7.1.

5.8 Sequenciamento de Sanger

Buscando confirmar a identidade dos produtos de PCR gerados e possíveis variantes, amostras representativas de cada gene foram submetidas ao sequenciamento utilizando o método de Sanger. Primeiramente, foram realizadas novas reações de PCR seguindo os protocolos citados anteriormente relativos a cada gene. Com o objetivo de obter volume suficiente para verificar o sucesso da reação em gel de agarose e realizar a purificação dos fragmentos, todas as PCRs foram delineadas com volume final de 50 µL. Reações anteriormente executadas como *Multiplex* foram reformuladas para amplificar um único gene por tubo, ou seja, cada microtubo possuía apenas um par de iniciadores.

Após a amplificação por PCR, os fragmentos gerados foram purificados. Amostras que apresentaram mais de uma banda no gel de eletroforese foram purificadas utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®) seguindo os protocolos e indicações do fabricante. Essas amostras foram quantificadas utilizando o equipamento NanoVue e submetidas ao sequenciamento. Por outro lado, amostras que apresentaram banda única no gel de eletroforese foram purificadas utilizando o kit ExoSAP.

Os procedimentos de purificação com o kit ExoSAP e as reações de sequenciamento foram executadas pela empresa ACTGene - Análises Moleculares (Rio Grande do Sul - Brasil). Os sequenciamentos foram realizados na plataforma AB 3.500 (Applied Biosystems). As reações foram preparadas em 5 µL de volume

final, consistindo de 1 μ L de um dos *primers* (*forward* ou *reverse*), 30 a 60 ng de DNA e, se necessário, água ultra-pura para completar o volume.

Os resultados foram gerados em arquivos com extensão .txt (texto) e .ab1 (eletroferograma). Os eletroferogramas de cada sequência obtida foram visualizados utilizando o programa Chromas (Technelysium; <http://technelysium.com.au/wp/chromas/>). Foram realizadas análises utilizando os programas Phred/Phrap/Consed (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>) (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998) para verificar a qualidade do sequenciamento e montagem dos fragmentos através das fitas *forward* e *reverse*. As bases com *score* igual a zero foram excluídas da análise. As sequências finais foram utilizadas como *query* para a construção de um banco de dados local, baseado em identidade, a partir da plataforma *Gene* do NCBI (National Center for Biotechnology Information; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para validação da identidade das sequências. O *software* Aliview (versão 1.27; LARSSON, 2014) foi utilizado para visualização dos alinhamentos entre as sequência do banco de dados local e o fragmento gerado previamente. Com o auxílio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foram acessados informações referente à identidade, cobertura e similaridade dos fragmentos sequenciados quando comparado com as variantes encontradas no banco de dados.

6 RESULTADOS

6.1 Coleta de amostras

6.1.1 Granjas de suínos

No total, 14 granjas participaram do estudo, sendo oito com sistema de produção convencional e com uso de antimicrobianos; uma com sistema convencional, porém sem utilizar antimicrobianos; e cinco granjas com sistema de agricultura familiar. As amostras das granjas convencionais (com ou sem antimicrobianos) foram coletadas em dois momentos distintos (Coleta 1 em Outubro

de 2019 e coleta 2 em Janeiro de 2020). Os dejetos das granjas de agricultura familiar foram coletados antes e após uma limpeza nos locais de criação desses animais. Os municípios de origem das amostras foram: Capinzal, Concórdia, Joaçaba, São Miguel do Oeste, Seara, Videira e Xavantina (Figura 9). Informações relativas ao tipo de granja, animais criados, número médio de animais, número de lotes, fonte de água da propriedade e o sistema de tratamento de dejetos são apresentados nas Tabelas 2 e 3.

6.1.2 Granjas de aves

Oito diferentes granjas de aves convencionais que utilizam antimicrobianos e uma granja de agricultura familiar participaram do estudo, totalizando nove granjas de aves. As coletas de cada granja foram realizadas em dois momentos distintos (Coleta 1 em Outubro de 2019 e coleta 2 em Janeiro de 2020). Os municípios de origem das granjas foram: Capinzal, Chapecó, Concórdia, Jaborá, Joaçaba e Xanxerê (Figura 9). Os dados referentes ao tipo de granja, animais criados, número médio de animais, número de lotes, fonte de água da propriedade e o sistema de tratamento de dejetos são apresentados na Tabela 4. O número médio de animais variou entre 60 (agricultura familiar) e 16000 animais (granjas convencionais). As fontes de água das unidades de criação se tratavam de fontes superficiais, podendo ser com cloração em pastilha ou sem. Os sistemas de tratamento de dejetos consistiam em tratamentos baseados em compostagem (agricultura familiar) ou fermentação em lona (granjas convencionais).

6.1.3 Transportes

Foi coletado um total de quatro amostras de transportes (Tabela 5). Os veículos eram provenientes dos seguintes municípios: Concórdia, Erval Velho, São Miguel do Oeste e Videira (Figura 9).

Tabela 2. Amostragem das granjas de suínos convencionais com e sem antimicrobianos

Código da granja	Tipo de material de Coleta	Cidade da Coleta	Tipo de Granja	Animal	Número médio de animais	Água da propriedade	Sistema de tratamento de dejetos	Antimicrobianos Mais Utilizados
GSC1	Dejeto de suíno	Concórdia	UPL - leitões	Suínos leitões (crechário)	800	Poço artesiano	Esterqueira - fermentação	
GSC2	Dejeto de suíno	Concórdia	UPDs - desmamados	Suínos desmamados	850	Poço artesiano	Biodigestor	Tratamento = penicilinas; cefalosporina; tetraciclina; macrolídeos; lincosamidas; pleuromutilinas; sulfonamidas (sulfametoxazol-trimetoprim); quinolonas; rifampicina.
GSC3	Dejeto de suíno	Xavantina	UPDs - desmamados	Suínos desmamados	600	Poço artesiano	Biodigestor	
GSC4	Dejeto de suíno	Seara	UPL - leitões	Suínos leitões (crechário)	650	Poço artesiano	Biodigestor	
GSC5	Dejeto de suíno	Seara	UPDs - desmamados	Suínos desmamados	650	Poço artesiano	Esterqueira - fermentação	
GSC6	Dejeto de suíno	São Miguel do Oeste	UT - Unidade de terminação	Suínos engorda	600	Poço artesiano	Biodigestor	
GSC7	Dejeto de suíno	Joaçaba	UT - Unidade de terminação	Suínos engorda	600	Poço artesiano	Biodigestor	
GSC8	Dejeto de suíno	Videira	Ciclo completo (CC)	Suínos totais	10000	Poço artesiano	Biodigestor	
GSNA1	Dejeto de suíno	Capinzal	Ciclo completo (CC) sem antibiótico	Suínos totais	25	Fonte superficial, sem cloração	Esterqueira - fermentação	

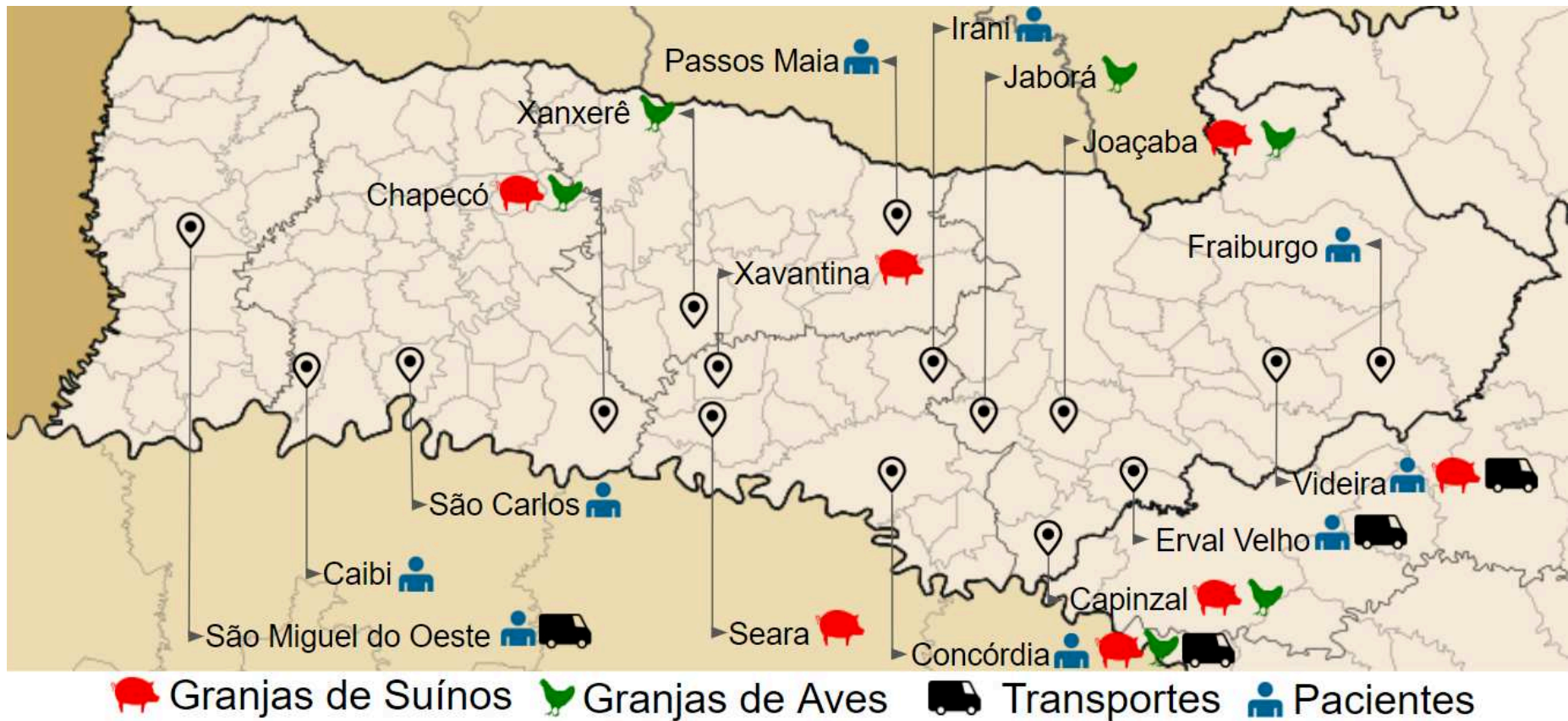
Tabela 3. Amostragem das granjas de suínos de agricultura familiar

Código da granja	Cidade da Coleta	Tipo de Granja	Animal	Número médio de animais	Água da propriedade	Sistema de tratamento de dejetos	Disposição do dejetos
GSAF1	Concórdia	UPDs - desmamados	Suínos desmamados	650	Fonte superficial, cloração	Biodigestão anaeróbia	Biofertilizante
GSAF2	Concórdia	UPDs - desmamados	Suínos desmamados	650	Poço artesiano	Biodigestão anaeróbia	Biofertilizante
GSAF3	Concórdia	UPDs - desmamados	Suínos desmamados	650	Poço artesiano	Biodigestão anaeróbia	Biofertilizante
GSAF4	Concórdia	UPL - leitões	Suínos leitões (crechário)	650	Poço artesiano	Biodigestão anaeróbia	Biofertilizante
GSAF5			Não foram fornecidos os dados restantes desta granja				

Tabela 4. Amostragem das granjas de aves convencionais e de agricultura familiar

Código da granja	Tipo de material de Coleta	Cidade da Coleta	Tipo de Granja	Número médio de animais	Água da propriedade	Sistema de tratamento de dejetos	Antimicrobianos Mais Utilizados
GAC1	Cama de aviário	Jaborá	Aves de corte	16000	Fonte superficial	Fermentação em lona	Tratamento = cefalexina.
GAC2	Cama de aviário	Jaborá	Aves de corte	12000	Fonte superficial com cloração em pastilha	Fermentação em lona	Aumento de conversão alimentar = lincomicina
GAC3	Cama de aviário	Concórdia	Aves de corte	12000	Fonte superficial com cloração em pastilha	Fermentação em lona	Outros: sulfacorpiridazida sódica; trimetropim;
GAC4	Cama de aviário	Xanxerê	Aves de corte	11000	Fonte superficial com cloração em pastilha	Fermentação em lona	macrolídeos; lincosamidas tilosina; lincomicina;
GAC5	Cama de aviário	Xanxerê	Aves de corte	15000	Fonte superficial com cloração em pastilha	Fermentação em lona	beta-lactâmicos (penicilina, amoxicilina, ceftiofur);
GAC6	Cama de aviário	Chapecó	Aves de corte	15000	Fonte superficial com cloração em pastilha	Fermentação em lona	aminoglicosídeos (gentamicina, neomicina);
GAC7	Cama de aviário	Joaçaba	Aves de corte	10000	Fonte superficial com cloração em pastilha	Fermentação em lona	fluoroquinolonas (enrofloxacin, danofloxacin); tetraciclina (tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina);
GAC8	Cama de aviário	Capinzal	Aves de corte	14000	Fonte superficial com cloração em pastilha	Fermentação em lona	estreptograminas (virginiamicina); polipeptídeos (bacitracina); anfenicóis (florfenicol); pleuromutilina.
GAAF1	Cama de aviário	Capinzal	Aves de corte sem antibiótico	60	Fonte superficial, sem cloração	Compostagem	Não faz uso de antimicrobianos

Figura 9. Localização geográfica das amostras



Localização geográfica de todas as amostras incluídas no estudo. As amostras de pacientes estão evidenciadas levando em conta o seu município de origem. O mapa corresponde ao oeste do Estado de Santa Catarina

Tabela 5. Amostragem dos transportes de pacientes

Código da Amostra	Cidade	Data de Coleta
TVI	Videira	19/02/2020
TEV	Ervál Velho	19/02/2020
TSMO	São Miguel do Oeste	07/03/2020
TCON	Concórdia	18/08/2020

6.1.4 Pacientes

Foram recrutados 14 pacientes provenientes de nove municípios distintos. Os municípios correspondentes, em ordem alfabética, foram: Caibi, Concórdia, Erval Velho, Fraiburgo, Irani, Passos Maia, São Carlos, São Miguel do Oeste e Videira (Figura 9). A relação referente à quantidade de amostras coletadas por paciente e o sítio de coleta estão expostos na Tabela 6. A coleta de amostras fecais ou de *swab* retal variaram de acordo com a condição clínica e o consentimento de cada paciente. Em alguns casos, não foi possível realizar a coleta de todas as amostras previstas no momento da alta hospitalar em virtude de mudanças no plano médico relacionado ao motivo da internação do paciente. O período de internação médio foi de 16,1 dias, sendo a internação mais curta de somente 2 dias e a mais longa de 43 dias. Em função da pandemia de COVID-19 estabelecida ao longo do ano de 2020, a coleta na casa dos pacientes foi impossibilitada. O período de coletas previsto seria de Março a Maio de 2020, o que coincidiu com os decretos de isolamento social e confinamento estabelecidos no Brasil.

Tabela 6. Amostragem dos pacientes internados no HU-UFSC-EBSERH

Paciente	Cidade de Origem	Data da internação	Data da alta	Código da amostra	Data da coleta	Unidade de internação no momento da coleta
1	Caibi	13/08/2019	07/09/2019	1ir	16/08/2019	CM I
				1in	16/08/2019	CM I

2	Videira	02/09/2019	15/10/2019	2if	04/09/2019	E. REP
				2in	05/09/2019	E. REP
				2af	11/10/2019	CM I
				2an	11/10/2019	CM I
3	São Miguel do Oeste	18/09/2019	26/09/2019	3if	20/09/2019	UIC II
				3in	20/09/2019	UIC II
				3an	25/09/2019	UIC II
4	Erval Velho	21/09/2019	01/10/2019	4ir	24/09/2019	UIC II
				4in	24/09/2019	UIC II
				4ar	30/09/2019	UIC II
				4an	30/09/2019	UIC II
5	Concórdia	30/09/2019	15/10/2019	5in	30/09/2019	UIC I
				5if	30/09/2019	UIC I
				5an	15/10/2019	UIC I
6	Fraiburgo	17/10/2019	19/10/2019	6in	17/10/2019	UIC II
				6if	18/10/2019	UIC II
7	Caibi	18/10/2019	25/10/2019	7in	21/10/2019	E. REP
				7ir	22/10/2019	E. REP
				7an	24/10/2019	E. REP
				7ar	24/10/2019	E. REP
8	Concórdia	22/10/2019	28/10/2019	8if	22/10/2019	UIC I
				8in	23/10/2019	UIC I
				8af	28/10/2019	UIC I
				8an	28/10/2019	UIC I
9	Irani	22/10/2019	12/11/2019	9in	23/10/2019	CM II
				9ir	24/10/2019	CM II
				9an	30/10/2019	CM II
				9ar	30/10/2019	CM II
10	Passos Maia	06/11/2019	20/11/2019	10in	08/11/2019	UIC II
				10if	10/11/2019	UIC II
				10an	20/11/2019	UIC II
				10al	20/11/2019	UIC II

				11in	11/11/2019	UIC I
				11if	12/11/2019	UIC I
11	São Miguel do Oeste	11/11/2019	19/11/2019	11an	18/11/2019	UIC I
				11ar	18/11/2019	UIC I
				11al	18/11/2019	UIC I
12	São Carlos	22/11/2019	26/11/2019	12in	22/11/2019	UIC I
				12ir	22/11/2019	UIC I
				12il	22/11/2019	UIC I
13	Concórdia	07/01/2020	07/02/2020	13in	08/01/2020	CM II
				13ir	08/01/2020	CM II
				13il	08/01/2020	CM II
				13an	07/02/2020	CM II
				13ar	07/02/2020	CM II
				13al	07/02/2020	CM II
14	Fraiburgo	17/02/2020	19/03/2020	14in	19/02/2020	E. REP
				14il	19/02/2020	E. REP

6.2 Resistoma

Através do sequenciamento por nanoporos de todas as amostras incluídas neste trabalho, foi possível identificar 504 diferentes genes que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos. Os dados de qualidade e rendimento do sequenciamento constam na Tabela 7. Utilizando o banco de dados CARD, foi possível atribuir a uma parte desses genes a caracterização de relevância clínica (187, 37%). Os resultados foram expressos levando em conta tanto os genes considerados clinicamente relevantes quanto aqueles que não apresentavam relevância clínica de acordo com o banco de dados. A relação de genes detectados foi organizada de acordo com a classe de antimicrobianos cujo gene confere resistência e o mecanismo de ação atribuído a esse mesmo gene. As Tabelas que relacionam os genes detectados por amostras foram divididas em três seções: (1) genes considerados clinicamente relevantes, (2) genes não considerados

cl clinicamente relevantes e (3) mutações genéticas que conferem resistência aos antimicrobianos.

Foram excluídas das análises as amostras de pacientes dos quais não foi possível coletar uma ou mais das quatro amostras mínimas. Assim, foram construídos os resistomas a partir das amostras de sete dos 14 pacientes recrutados. Além disso, as amostras das granjas de aves C1GAC1, C1GAC2, C1GAC7, C1GAC8 e C2GAC7 foram excluídas por não atingirem níveis suficientes de rendimento no sequenciamento (inferior a 1,0 kb). Dessa forma, foram detectados nas 73 amostras restantes (GSC, n=16; GSNA, n=2; GSAF, n=10; GAC, n=11; GAAF, n=2; Pacientes, n=28 e Transportes, n=4) 462 diferentes genes de resistência a antimicrobianos.

No total, os genes identificados conferem resistência a 29 diferentes classes de antimicrobianos, sendo eles: ácido fusídico, ácidos graxos livres antibacterianos, aminocumarinas, aminoglicosídeos, anfenicóis, beta-lactâmicos, corante acridina, diaminopirimidinas, elfamicinas, estreptograminas, fluoroquinolonas, fosfomicina, glicilciclinas, glicopeptídeos, isoniazida, lincosamidas, macrolídeos, mupirocina, nitrofurano, nitroimidazol, nucleosídeos, outros, pactamicina, peptídeos, poliaminas, rifamicina, sulfonamidas, tetraciclinas e triclosan. Neste estudo, por questões de representação gráfica e de relevância científica, optou-se por considerar em um grupo denominado “Outros” aqueles genes relacionados às classes: ácido fusídico, ácidos graxos livres antibacterianos, aminocumarinas, corante acridina, elfamicinas, glicilciclinas, isoniazida, mupirocina, nitrofurano, nitroimidazol, nucleosídeos, outros, pactamicina, poliaminas e rifamicina. Genes responsáveis por conferir resistência a mais de uma classe de antimicrobianos foram categorizados como “Multiclasse”.

Em relação à gama de genes detectados, as classes às quais esses conferem resistência mais encontradas foram: multiclasse (22,8%), aminoglicosídeos (17,5%), beta-lactâmicos (17,3%), fluoroquinolonas (10,1%),

Tabela 7. Relatório de qualidade relacionado aos resultados do sequenciamento das amostras.

Controle de Qualidade e Barcoding						ARMA			
Amostra	Reads com qscore >7 (%)	Reads Analisadas	Tamanho Médio (pb)	Rendimento Total	qscore Médio	Reads Analisadas	Alinhamentos	Genes Detectados	Acurácia Média (%)
Granjas de Suínos									
C1GSC1	99,8	11932	3759	44,9 Mb	11,04	3295	94	56	78,2
C1GSC2	99,9	50918	768	39,1 Mb	10,85	3136	112	58	82
C1GSC3	99,9	34059	936	31,9 Mb	10,91	5703	107	65	81,6
C1GSC4	99,7	5140	780	4,0 Mb	10,47	449	8	10	78,8
C1GSC5	99,9	29734	522	15,5 Mb	10,85	2374	61	116	87,5
C1GSC6	99,9	83719	727	60,9 Mb	10,97	4244	165	71	84,9
C1GSC7	99,6	5248	2091	11,0 Mb	10,57	554	26	28	82,2
C1GSC8	99,8	8766	778	6,8 Mb	10,79	508	11	13	84,3
C2GSC1	99,8	55570	1854	103,1 Mb	10,4	3682	59	44	76
C2GSC2	99,9	690807	1000	691,2 Mb	10,66	112105	1198	107	85,9
C2GSC3	99,9	413877	2547	1,1 Gb	10,59	92528	2470	158	82,7
C2GSC4	99,9	207172	492	102,0 Mb	10,5	11138	301	108	88,3
C2GSC5	99,9	600761	850	510,7 Mb	10,66	34613	1120	101	87,3
C2GSC6	99,9	729875	1790	1,3 Gb	10,86	62080	2246	158	83,1
C2GSC7	99,9	549989	1904	1,0 Gb	10,6	40031	985	103	81
C2GSC8	99,9	710049	1328	943,4 Mb	10,81	74128	2321	173	84,6
C1GSNA1	99,9	59684	1002	59,8 Mb	10,98	4941	169	59	83,4

C2GSNA1	99,9	290261	627	182,1 Mb	10,55	14743	389	114	86,1
C1GSAF1	99,6	3692	421	1,6 Mb	10,42	102	8	5	90,7
C1GSAF2	99,7	2207	2776	6,1 Mb	10,79	369	37	29	89,8
C1GSAF3	99,8	944	2580	2,4 Mb	10,63	129	6	9	79,9
C1GSAF4	100	20358	5121	104,3 Mb	11,66	6571	562	115	84,3
C1GSAF5	99,9	18871	1350	25,5 Mb	11,26	3100	47	38	81,8
C2GSAF1	99,9	14885	1779	26,5 Mb	11,07	1346	27	28	85,3
C2GSAF2	99,4	1454	6794	9,9 Mb	10,64	329	14	20	81,4
C2GSAF3	99,9	10371	1832	19,0 Mb	11,13	1062	36	27	81,8
C2GSAF4	99,3	4819	441	2,1 Mb	9,88	262	2	3	79,3
C2GSAF5	99,6	5998	2417	14,5 Mb	10,54	795	17	13	73,9

Granjas de Aves

C1GAC1	99,6	1905	265	506,0 kb	10,24	27	2	2	90,9
C1GAC2	99,7	2659	284	755,7 kb	10,28	48	4	6	86,6
C1GAC3	99,8	3889	2470	9,6 Mb	10,97	1264	20	19	86,1
C1GAC4	100	31347	3160	99,1 Mb	11,3	13840	490	129	86,3
C1GAC5	100	61486	4021	247,3 Mb	11,33	25457	1255	136	87,1
C1GAC6	100	24302	4260	103,5 Mb	11,16	11358	375	86	84,7
C1GAC7	99,5	1152	488	562,4 kb	10	56	4	4	85,3
C1GAC8	99,3	585	444	260,1 kb	9,88	22	0	0	0
C2GAC1	99,3	3050	409	1,2 Mb	9,64	76	1	1	71,5
C2GAC2	99,6	12122	309	3,8 Mb	10,05	236	7	8	85,3
C2GAC3	99,5	8016	1805	14,5 Mb	10,51	2030	31	31	85,1

C2GAC4	99,9	94518	2200	208,0 Mb	11,07	28720	1057	143	83,9
C2GAC5	99,7	3777	2860	10,8 Mb	10,84	1307	37	24	85,4
C2GAC6	99,9	1467	925	1,4 Mb	10,52	172	14	11	88,1
C2GAC7	99,4	1760	204	359,6 kb	9,9	7	0	0	0
C2GAC8	99,7	2970	2593	7,7 Mb	10,74	716	35	31	85,1
C1GAAF1	100	484236	3585	1,7 Gb	11,56	260149	15075	196	88,1
C2GAAF1	99,7	2497	1839	4,6 Mb	10,53	346	32	36	88,1

Pacientes

2if	99,9	43668	475	20,8 Mb	10,79	12236	50	35	88,9
2af	99,6	2234	1151	2,6 Mb	10,34	691	13	13	81,9
2in	96,6	259691	1599	415,2 Mb	11,01	208878	8	28	81,5
2an	96,3	436323	955	416,7 Mb	10,88	318772	3	9	76,3
4ir	97,1	305934	1536	470,0 Mb	10,99	199244	1133	161	85,9
4ar	95,5	293276	1089	319,6 Mb	10,5	182788	314	68	81,4
4in	95,9	127528	1019	130,1 Mb	10,7	79660	3	6	80,2
4an	95,6	203100	999	203,1 Mb	10,56	160584	30	15	80,9
7ir	96,4	240514	1676	403,1 Mb	10,79	49393	1415	226	86,3
7ar	95,3	156596	1459	228,5 Mb	10,38	32592	919	156	87,1
7in	96,2	155357	1610	250,2 Mb	10,62	136505	16	14	83,9
7an	96,5	454687	1760	800,7 Mb	10,77	404601	9	8	89,9
8if	100	39266	1820	71,5 Mb	10,67	10605	160	70	78,7
8af	100	291765	2105	614,4 Mb	10,75	111248	1448	174	79
8in	96,6	342966	1444	495,4 Mb	10,72	290801	35	24	79,2

8an	96,2	204269	1173	239,7 Mb	10,63	175429	12	12	81,4
9ir	99,9	729354	1600	1,2 Gb	11,31	638547	105	64	81
9ar	99,9	233856	1926	450,6 Mb	11,17	108352	1313	153	80,7
9in	92,8	10281	308	3,2 Mb	9,92	1151	5	6	85,6
9an	99,8	37992	535	20,3 Mb	10,67	17886	2	2	87,3
11if	100	48469	673	32,6 Mb	10,81	8169	56	38	83,8
11ar	99,9	264027	1873	494,7 Mb	11,28	228142	53	42	81,4
11in	99,8	27513	470	12,9 Mb	10,37	5061	13	18	84,5
11an	99,9	26206	1181	31,0 Mb	11,01	19693	9	9	84,2
13ir	99,9	8454	1191	10,1 Mb	10,71	3794	39	40	85,3
13ar	100	418692	1845	772,6 Mb	11,3	356497	51	40	85,1
13in	100	12036	1784	21,5 Mb	10,89	10430	9	10	85,6
13an	99,9	23269	873	20,3 Mb	10,94	18272	1	1	67,7
Transportes									
TEV	99,9	17983	1082	19,5 Mb	10,69	9396	17	17	80,8
TVI	99,8	4721	972	4,6 Mb	10,58	2395	4	4	75,5
TSMO	100	84626	439	37,2 Mb	9,76	53309	61	45	85,5
TCON	100	129756	262	34,1 Mb	9,65	91234	40	27	87,3

outros (7,1%) e tetraciclina (6,5%). Considerando somente a categoria “Outros”, destacaram-se os genes que conferem resistência às aminocumarinas (27,8%), elfamicinas (22,2%), rifamicina (11,1%) e nucleosídeos (8,3%). Quanto à categoria de genes classificados como multiclasse, 84,3% conferem resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (Figura 10).

Figura 10. Prevalência da resistência de acordo com as classes de antimicrobianos

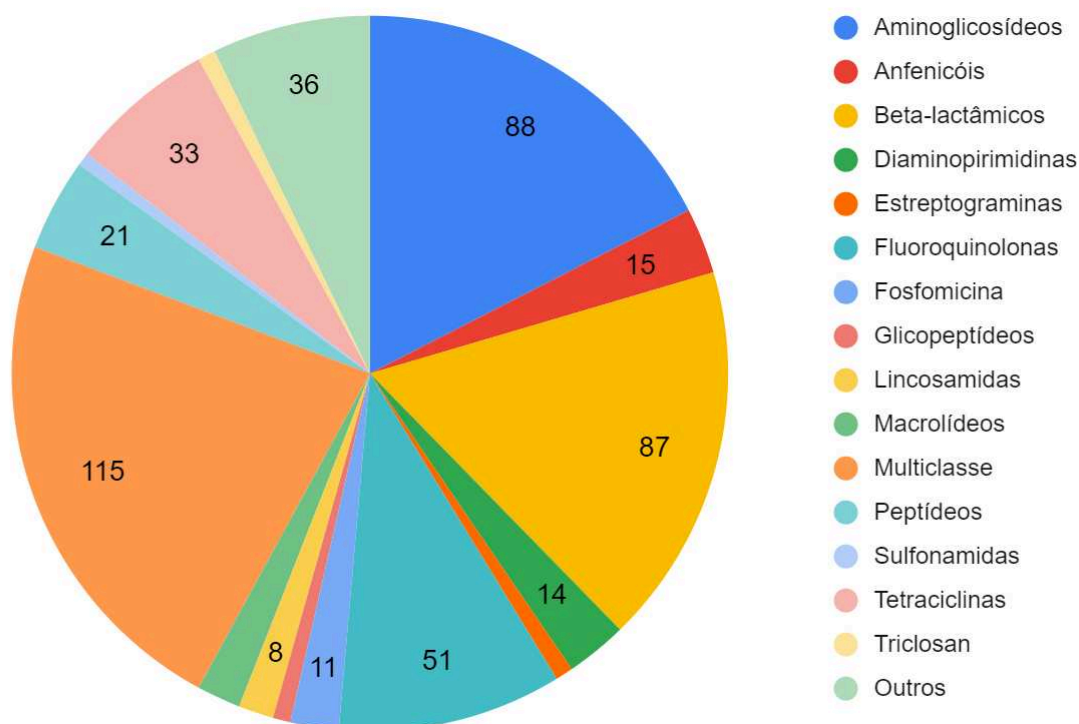


Figura representando a quantidade (número absoluto) de genes de resistência identificados de acordo com as classes de antimicrobianos

Referente aos mecanismos de ação, foram identificados sete diferentes mecanismos com base no banco de dados CARD: alteração do alvo do antibiótico, efluxo do antibiótico, inativação do antibiótico, outros, proteção do alvo do antibiótico, redução da permeabilidade ao antibiótico e substituição do alvo. Por motivos de visualização e relevância científica, foram utilizados os termos “Alteração”, “Efluxo”, “Inativação” e “Outros” para confecção dos gráficos dos resultados do trabalho. Para tanto, genes classificados através do mecanismo de

resistência como “Alteração do Alvo do Antibiótico”, “Alteração do Alvo do Antibiótico, Efluxo do Antibiótico”, “Alteração do Alvo do Antibiótico, Substituição do Alvo”, “Proteção do Alvo do Antibiótico” e “Substituição do Alvo” foram categorizados pelo termo “Alteração”. O grupo determinado por “Efluxo” é composto pelos genes classificados pelos mecanismos de “Efluxo do Antibiótico”, “Efluxo do Antibiótico, Redução da Permeabilidade ao Antibiótico” e “Redução da Permeabilidade ao Antibiótico”.

Em relação aos genes detectados, 42,1% atuam através de mecanismos de alteração, 31,3% estão relacionados a mecanismos de inativação e 25,8% relacionam-se a mecanismos de efluxo (Figura 11). Quanto aos mecanismos de alteração, 67,9% dos genes estão relacionados a mecanismos exclusivos de alteração do alvo do antibiótico, 15,6% atuam protegendo o alvo do antibiótico e 8,5% relacionam-se com a substituição do alvo. Por fim, 96,2% dos genes de efluxo possuem mecanismo de ação exclusivo de efluxo do antimicrobiano.

A amostra 7ir é composta pelo maior resistoma com 226 diferentes genes detectados. Destacaram-se, além disso, as amostras C1GAAF1, 8af e C2GSC8 com um montante de genes de resistência consideravelmente grande (196, 174 e 173 genes, respectivamente).

Como esperado, os *swabs* nasais em geral apresentaram resistomas menores comparados com aqueles construídos referentes à microbiota fecal/retal. Da mesma forma, os *swabs* de superfície coletados nas vans de transporte de pacientes também apresentaram pequeno volume de genes de resistência identificados. As amostras de granjas apresentaram resistomas relativamente grandes em comparação aos transportes e *swabs* nasais. Pode-se dizer que os resistomas gerados em volume de dados foram condizentes e proporcionais à quantidade de DNA sequenciado.

6.3 Genes comuns entre grupos amostrais

Ao analisar os oito grupos amostrais foram observados 17 diferentes elementos que foram detectados em todos esses ambientes. Cerca de 65% desses

genes conferem resistência aos aminoglicosídeos, sendo a maior parte (10 genes) composta por mutações gênicas e uma fosfotransferase (APH(6)-Id). Três genes detectados conferem resistência à elfamicina devido a mutações no fator de alongamento EF-Tu. Também foram detectadas duas mutações gênicas que conferem resistência às tetraciclinas e o gene *sul1* responsável pela resistência às sulfonamidas.

Figura 11. Prevalência da resistência de acordo com o mecanismo de ação

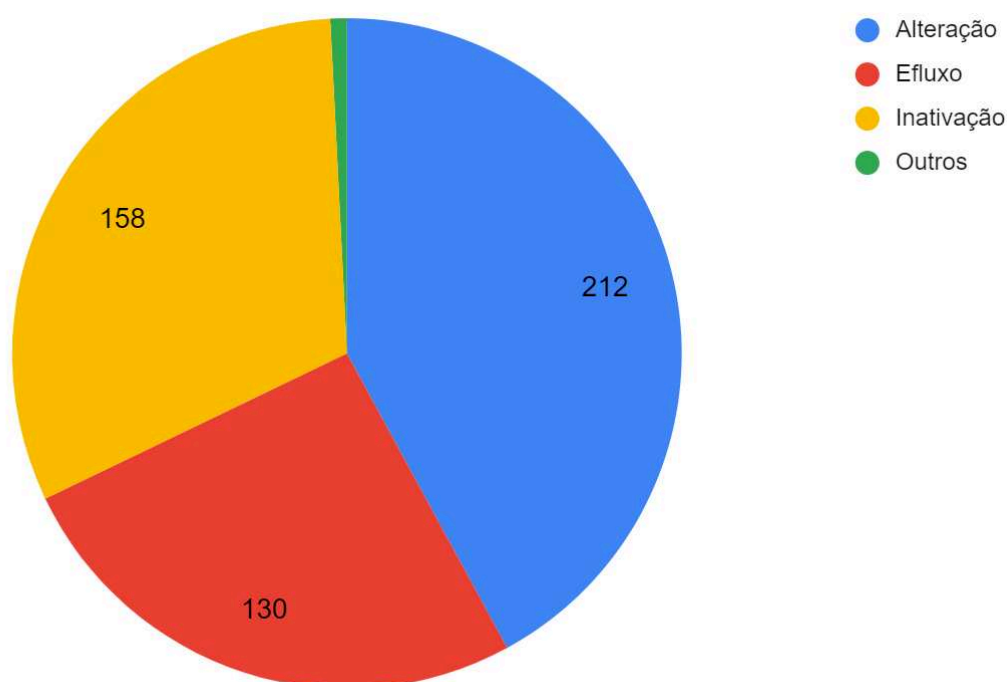


Figura mostrando a quantidade (número absoluto) de genes de resistência identificados de acordo com os mecanismos de ação.

Identificaram-se 57 diferentes elementos relacionados a todos os grupos, exceto os transportes. Aproximadamente 60% desse genes conferem resistência aos aminoglicosídeos, sendo dois deles relacionados a nucleotidiltransferases (ANT(6)-Ia e ANT(6)-Ib), uma fosfotransferase (APH(3')-IIIa), e 31 mutações em subunidades ribossomais bacterianas. Os genes *ermA* e *ermB* também foram detectados ao longo de todos esses grupos amostrais, bem como os genes *mefA*, *mel* e *sul2*. Sete genes da família gênica *tet*, responsável por conferir resistência às tetraciclinas, foram detectados nesses mesmos grupos. Dentre esses, um pertence

à superfamília de facilitadores principais (MFS, do inglês *Major Facilitator Superfamily*), cinco atuam como proteínas de proteção ribossômica e somente uma é caracterizada como enzima de inativação. Além disso, duas mutações gênicas relacionadas à resistência às tetraciclinas foram encontradas nesses grupos amostrais. Levando em consideração o estabelecimento da família gênica *tet* ao longo dos grupos de amostras, observou-se a alta frequência dos sete genes anteriormente citados dentre as granjas de suínos e nas sete amostras fecais/retais de pacientes tanto na internação, quanto na alta. Em relação às amostras de granjas de aves, em poucas foi detectada a presença desses genes. Dentre elas, somente em duas foi possível detectar a presença de todos os sete genes e em outras duas amostras foram identificados cinco dos sete genes. Apesar de ser notavelmente uma família gênica amplamente distribuída nos diversos grupos amostrais, não foi possível detectá-los nas amostras de transportes.

Ao analisar genes que foram identificados somente nas amostras de granjas de suínos e aves, observaram-se 130 genes detectados nesses ambientes e que não estavam presentes nas amostras de pacientes ou transportes. Percebeu-se uma predominância de genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos e em maior abundância as enzimas de inativação que atuam como nucleotidiltransferases (famílias gênicas *aadA* e *ANT(3'')*), fosfotransferases (famílias gênicas *APH(2'')*, *APH(4)* e *APH(3')*) ou acetiltransferases (famílias gênicas *AAC(3)* e *AAC(6')*). Entre as granjas de suínos, a resistência aos aminoglicosídeos se encontrou predominante nas granjas de suínos convencionais quando comparado aos demais sistemas de produção. Além disso, a resistência aos beta-lactâmicos mediada pelos genes *CARB* foi encontrada somente em amostras de suínos convencionais e de agricultura familiar. Algumas variantes de outras beta-lactamases também se mostraram predominantes ao longo das amostras de granjas de suínos convencionais, suínos convencionais sem antimicrobianos e granjas de aves convencionais (*TEM*, *OXA* e *VEB*). Duas variantes da família *CMY* foram encontradas somente em uma amostra de granjas de aves convencionais e somente uma variante dos genes *AER* e *ROB* foram detectadas dentre as amostras de granjas de agricultura familiar.

Buscando interações e rotas de disseminação entre animais e pacientes observaram-se 25 diferentes genes comuns entre o momento de internação dos pacientes e pelo menos um grupo amostral de animais (suínos e/ou aves). Os dados mostraram relativa predominância da resistência aos aminoglicosídeos, sendo encontradas três nucleotidiltransferases e uma acetiltransferase. Mutações gênicas em *parE* e *gyrA* que conferem resistência às fluoroquinolonas também foram identificadas, além do gene *qnrB62* que foi identificado na internação de pacientes e nas granjas de aves convencionais. Genes de grande relevância clínica como *bla*_{OXA-15} e *bla*_{CTX-M-8} foram detectados nas granjas de suínos convencionais e de aves convencionais, respectivamente, além das amostras de internação de pacientes. Resistência a outras classes como as lincosamidas, estreptograminas, peptídeos, tetraciclina também foram observados entre esses grupos amostrais.

Buscando aumentar o conhecimento relacionado ao impacto do ambiente hospitalar no resistoma humano, observaram-se 26 genes exclusivos entre os pacientes no momento da alta hospitalar. Notou-se que grande parcela desses genes adquiridos durante a internação hospitalar conferem resistência aos beta-lactâmicos (27%), às fluoroquinolonas (23,1%) ou a mais de uma classe de antimicrobianos (34,6%). Os demais genes conferem resistência aos aminoglicosídeos (7,7%), anfencóis (3,8%) e fosfomicina (3,8%). Outro aspecto importante é que todos estes genes foram detectados exclusivamente em amostras únicas de pacientes. Destacou-se o paciente 8, o qual apresentou 18 desses genes demonstrando uma grande aquisição de genes de resistência tanto na microbiota fecal (90%) quanto na microbiota nasal (10%). Em menor proporção observou-se o paciente 7, cujo resistoma mostrou-se enriquecido por cinco genes de resistência exclusivos: *amrB*, *bla*_{TEM-126}, *qnrB10*, *qnrB61* e *msrC*. O gene *bla*_{OXA-161}, foi identificado somente na amostra 4a. Foi detectada a presença de uma mutação no gene *parC* conferindo resistência às fluoroquinolonas pertencente ao resistoma fecal do paciente 9. No paciente 13 foi identificado a presença do gene *mexL*.

Genes que conferem resistência a outras classes como diaminopirimidinas, lincosamidas, macrolídeos e tetraciclina ou até mesmo possuem fenótipo MLS também foram detectados ao longo dos diferentes grupos. As famílias *dfr*, *Inu/lin*, *mph*, *tet* e *erm* que conferem as resistências anteriormente citadas,

respectivamente, se apresentaram bastante disseminadas dentre os diversos grupos amostrais. Resumidamente, foram encontradas em pelo menos um grupo amostral 14 variantes de *dfr*, 7 variantes de *Inu/lin*, 5 variantes de *mph*, 16 variantes de *erm* e 27 variantes de *tet*. De forma geral, observou-se o compartilhamento, seja de genes ou de famílias gênicas, entre amostras pertencentes ao mesmo grupo ou de grupos distintos.

De forma geral, observaram-se altas frequências relacionadas às mutações gênicas que conferem resistência ao longo de todos os grupos. Destacaram-se as mutações em genes ribossômicos que conferem resistência aos aminoglicosídeos, aos peptídeos e às tetraciclinas encontradas principalmente entre os grupos GSC, GSNA, GSAF, GAC, GAA e amostras fecais de pacientes. Mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* que conferem resistência às fluoroquinolonas foram menos frequentes, porém predominantes entre as amostras dos grupos GSC, GAC, GAAF e fezes de pacientes.

6.4 Frequência dos genes nos grupos amostrais

De forma geral, notou-se a alta frequência de genes relacionados à resistência aos aminoglicosídeos considerando tanto todos os grupos amostrais quanto dentro de cada grupo de amostras. Cerca de 67% das amostras do trabalho tiveram no seu resistoma uma mutação no gene *rrsD* a qual confere resistência à espectinomicina, um aminoglicosídeo. Em maior frequência, independente do grupo de amostras, notou-se um padrão semelhante no qual se mostraram prevalentes elementos genéticos que conferem resistência aos aminoglicosídeos e, também, estavam em maior quantidade independente de classe, as mutações gênicas. Em relação ao mecanismo de resistência, os genes mais frequentes atuam através da alteração do alvo. Quando visualizados dentro de cada grupo amostral, notou-se praticamente a mesma predominância dos genes de resistência a essa classe e mecanismo de ação.

Alguns genes que possuem relevância clínica, como aqueles da família *tet*, apresentaram grande disseminação entre as amostras. O gene *tetW*, por exemplo,

foi detectado em 37 das 73 amostras analisadas. Genes da família *erm* e as diversas transferases que atuam sobre os aminoglicosídeos também apresentaram larga dispersão. Praticamente todos os grupos apresentaram genes *tet*, *erm* (fenótipo MLS) e de resistência aos aminoglicosídeos (*aac*, *ant* e *aph*) em altas frequências.

A resistência aos anfenicóis, proveniente principalmente pela ação das acetiltransferases *cat*, encontrou-se prevalentemente nas amostras de suínos e de microbiota fecal/retal de pacientes, não sendo detectada em outros grupos. Por outro lado, os genes de resistência da família *dfr* foram identificados em frequências mais altas entre suínos e aves. Essas enzimas alternativas resistentes (diidrofolato redutase) à trimetoprima foram pouco detectadas em suínos de agricultura familiar, pacientes e transportes. Os genes *sul1* e *sul2* foram encontrados em todos os grupos e em maior frequência dentre os suínos convencionais. A família *sul* é responsável por codificar uma diidropterato sintetase alternativa atuante menos suscetível à ação das sulfonamidas. Clinicamente, o sulfametoxazol e a trimetoprima são frequentemente administrados em associação com o objetivo de inibir as diferentes enzimas da rota metabólica do ácido fólico. As acetiltransferases *vat* relacionadas a resistências às estreptograminas foram encontradas em amostras de suínos, aves e pacientes, porém em todos os casos em baixas frequências. A família *Fos*, grupo de tioltransferases que conferem resistência à fosfomicina, foram encontrados somente em amostras de granjas de aves e de pacientes.

A família das beta-lactamases *cfxA*, responsável pela resistência às cefamicinas (beta-lactâmicos), apresentou grande destaque nas amostras de pacientes, principalmente relacionado ao resistoma da microbiota intestinal. Apesar de ter se mostrado presente em algumas amostras de suínos e aves, essa família se mostrou prevalente e bem estabelecida em resistoma de humanos.

A resistência às fluoroquinolonas mediada pelas proteínas *qnr* se mostrou presente entre as aves, suínos de agricultura familiar, pacientes e transportes. Destacaram-se as amostras de *swab* retal do paciente 7, nas quais foi possível detectar quatro de suas variantes no momento da internação e cinco no momento da alta. Mutações gênicas em *gyr* e *par* capazes de conferir resistência às

fluoroquinolonas foram encontradas em todos os grupos amostrais. No grupo GSAF, somente três amostras apresentaram uma dessas mutações cada. Nos demais grupos foram detectadas diferentes mutações e muitas vezes em uma única amostra. A resistência aos antimicrobianos peptídicos se mostrou bastante presente, principalmente entre aves e pacientes. Alguns genes da família das fosfoetanolaminatransferases (majoritariamente os genes *mcr* e *Pmr*) foram identificados em todos os grupos amostrais com maior destaque em relação às granjas de aves e aos pacientes. O gene *mcr-1*, de grande relevância clínica, foi detectado nas amostras C2GAC4, 9ir e 9ar.

Somente dois genes foram detectados conferindo resistência aos glicopeptídeos, sendo eles *D-Ala-D-Ala ligase* e *vanC*. Esses genes foram identificados somente em amostras de pacientes e transportes. Genes de resistência ao triclosan foram detectados somente em pacientes através dos genes *TriB* e *TriC*. A resistência aos macrolídeos foi representada pelas famílias *mph* (fosfotransferases) e *mef* (bombas de efluxo). A família *mph* foi identificada principalmente nas amostras de granjas de suínos e aves. As bombas de efluxo *mef* apresentaram-se em maior abundância entre as granjas de suínos e amostras fecais/retais de pacientes. Por outro lado, genes de resistência às lincosamidas *lin/lnu* apresentaram-se em todos os tipos de amostras, exceto transportes.

6.5 Análise de Composição e Alfa-Diversidade

Em abundância absoluta, cerca de 26% das amostras apresentaram um resistoma composto por 100 ou mais genes (Figura 12B). Em termos percentuais, destacaram-se na maior parte, independente do grupo amostral, a presença de genes de resistência aos aminoglicosídeos, tetraciclinas ou daqueles que atuam contra mais de uma classe de antimicrobianos (Figura 12A). As diversas amostras de granjas de suínos convencionais apresentaram grande relevância em virtude da grande quantidade de genes detectados, aproximadamente 1500, em todas as amostras desse grupo (Figura 14B). O sequenciamento das amostras de *swab* superficial de transportes foi capaz de identificar menos de 100 genes dentro desse

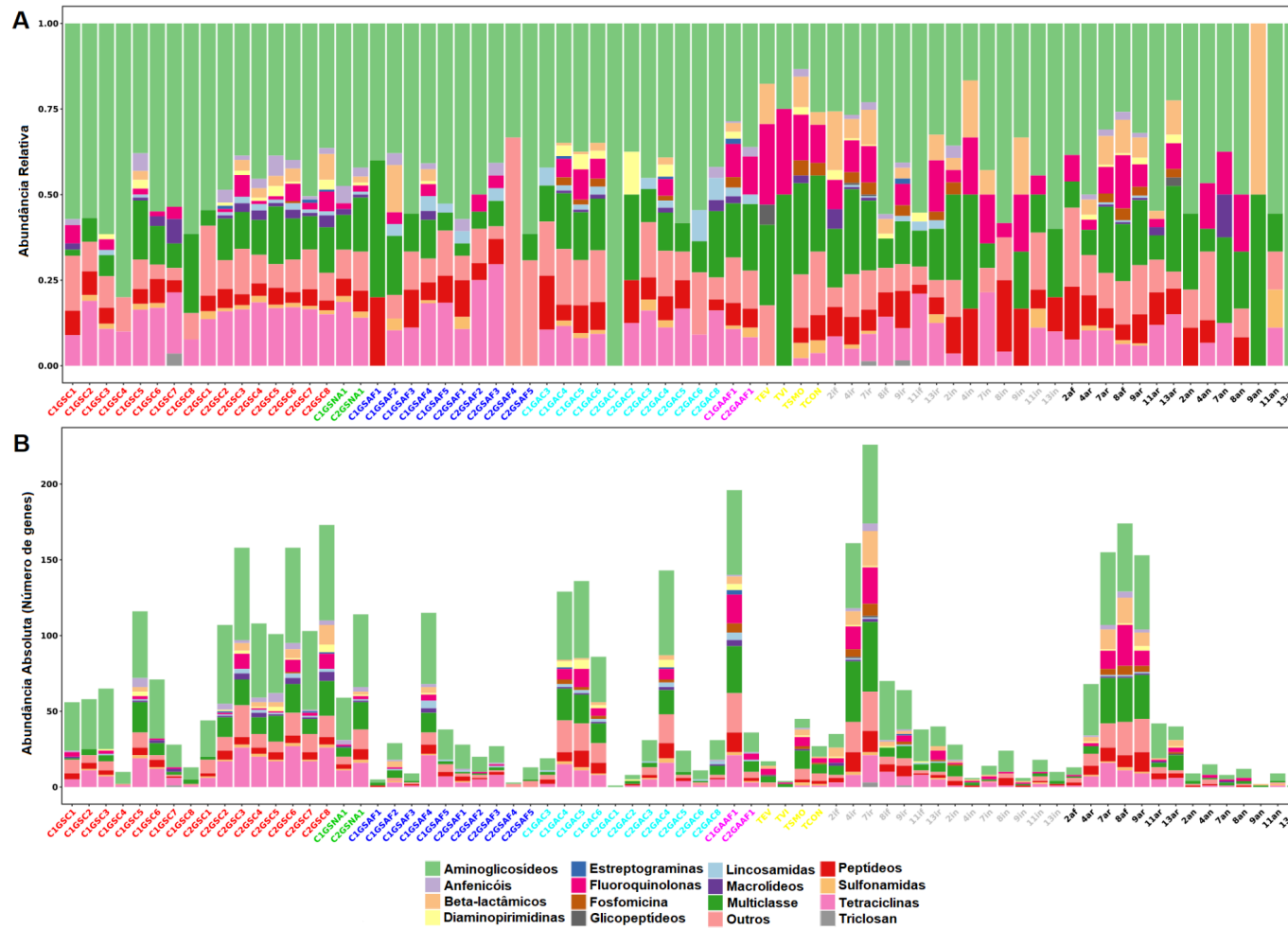
grupo. Os grupos de pacientes (internação e alta) apresentaram quantidades semelhantes de genes detectados, porém com tendência de diminuição das amostras de alta em relação à internação.

Em relação aos mecanismos de resistência, os genes que atuam através da alteração do alvo se mostraram em maior abundância em todas as amostras (Figura 13). Em seguida, notou-se a predominância de mecanismos de efluxo nas amostras de pacientes e transportes, enquanto foi notável a prevalência da inativação enzimática ao longo das amostras de aves e suínos. Poucos foram os genes classificados como “Outros” e, conseqüentemente, foram pouco detectados nas amostras. Destacaram-se, porém, nas amostras de transportes, pacientes e granjas de aves de agricultura familiar. Ao agrupar as amostras e construir um perfil médio, observaram-se proporções semelhantes dos diferentes mecanismos entre os grupos amostrais (Figura 15A). Somente as amostras de transportes apresentaram maior discrepância quando analisado em termos percentuais, devido à alta detecção de genes que atuam através de bombas de efluxo.

As amostras de *swab* nasal apresentaram baixo número total de genes de resistência detectados comparado aos demais grupos e, em especial, às amostras fecais e retais (Figuras 12 e 13). Grande parte das amostras de granjas de suínos apresentaram altos níveis de genes identificados, independente de classe e mecanismo de ação. As amostras de superfície de transportes apresentaram poucos genes identificados por amostras comparado com os outros grupos. Poucas amostras de granjas de aves apresentaram níveis altos de identificação de genes de resistência, semelhantes àqueles de granjas de suínos.

Ao agrupar os resistomas das amostras individuais, de forma a observar um perfil geral do resistoma, observou-se o destaque das classes de beta-lactâmicos, fluoroquinolonas e fosfomicinas nas amostras de pacientes, transportes e aves (Figura 14). As amostras de transportes apresentaram destaques sobre as classes de glicopeptídeos, sulfonamidas e os genes multiclasse. As granjas, por outro lado, apresentam a prevalência sobre os genes de resistência aos aminoglicosídeos, lincosamidas e tetraciclina. Evidenciou-se, também, a semelhança entre os perfis das granjas de suínos e seus diversos sistemas de criação. Entre as aves, foi possível visualizar a diferença das proporções das resistências relacionadas aos

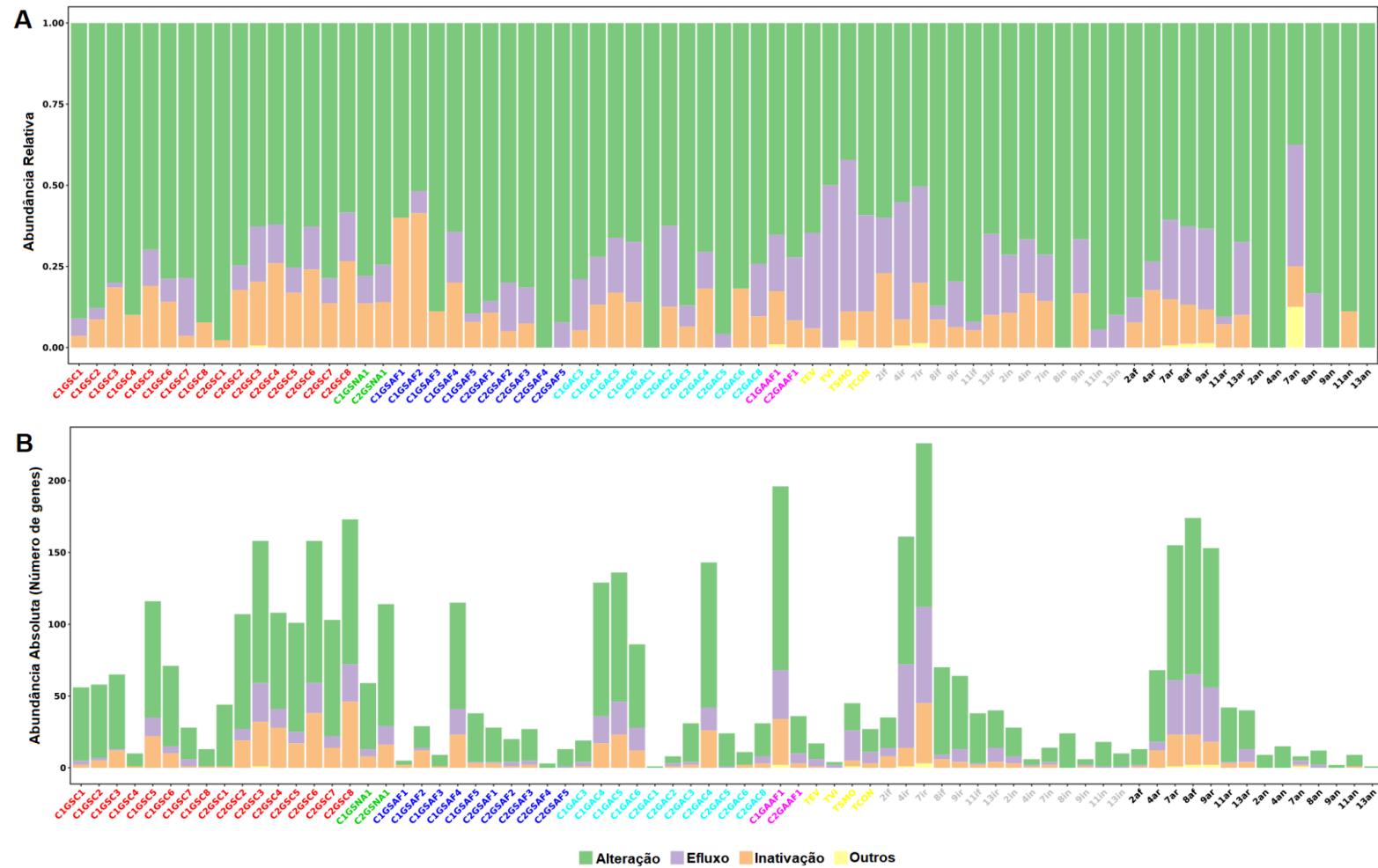
Figura 12. Análise de composição do resistoma por amostra baseado nas classes de antimicrobianos dos genes



Perfil do resistoma relativo (A) e absoluto (B) baseado nas classes de antimicrobianos. Cada barra vertical representa uma amostra, agrupadas por cores.

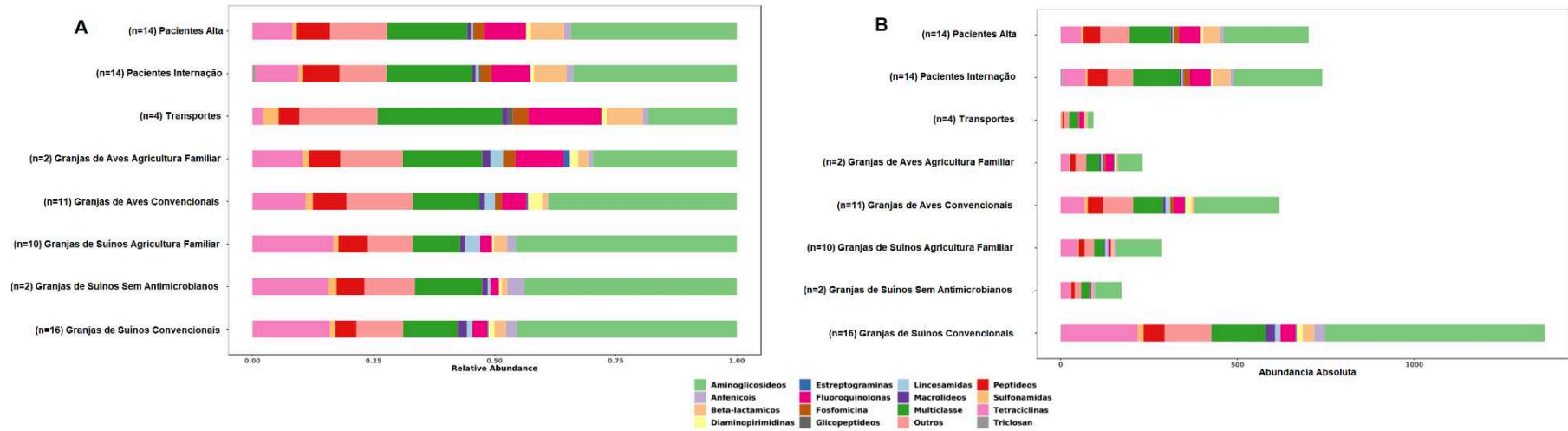
Vermelho: GSC; Verde: GSNA; Azul: GSAF; Azul Ciano: GAC; Rosa: GAAF; Amarelo: Transportes; Cinza: Pacientes Internação; Preto: Pacientes Alta.

Figura 13. Análise de composição do resistoma por amostra baseado nos mecanismos de ação dos genes



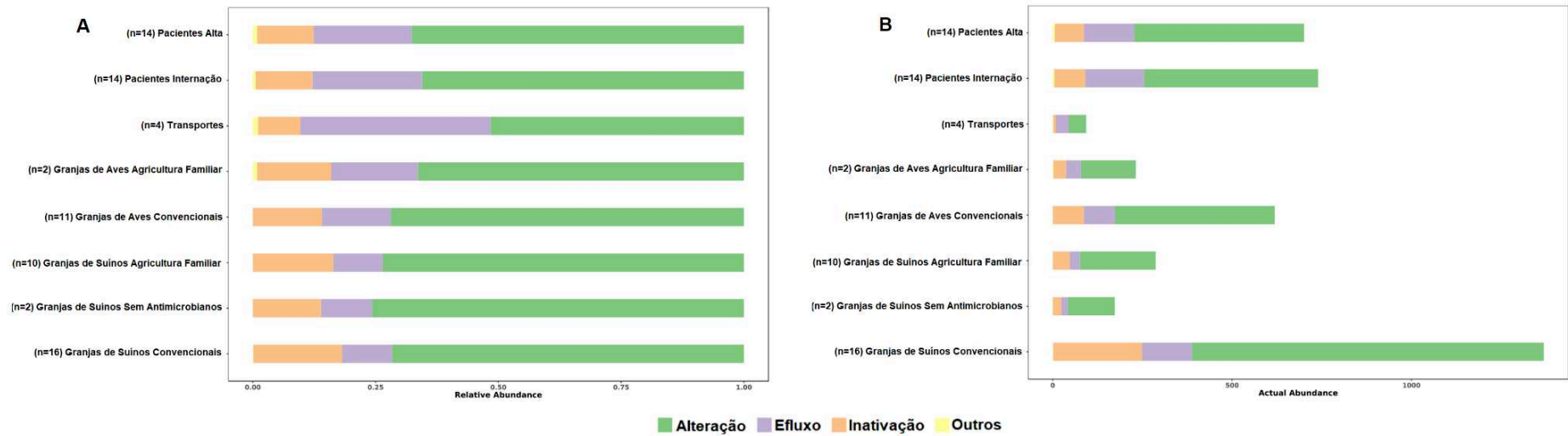
Perfil do resistoma relativo (A) e absoluto (B) baseado nos mecanismos de ação. Cada barra vertical representa uma amostra, agrupadas por cores. Vermelho: GSC; Verde: GSNA; Azul: GSAF; Azul Ciano: GAC; Rosa: GAAF; Amarelo: Transportes; Cinza: Pacientes Internação; Preto: Pacientes Alta.

Figura 14. Análise de composição do resistoma por grupo amostral a nível de classe



Perfil do resistoma relativo e absoluto baseado nas classes de antimicrobianos (A e B, respectivamente).

Figura 15. Análise de composição do resistoma por grupo amostral a nível de mecanismo de ação



Perfil do resistoma relativo e absoluto baseado nos mecanismos de ação (A e B, respectivamente).

aminoglicosídeos e as fluoroquinolonas sendo maiores nas granjas convencionais e de agricultura familiar, respectivamente.

Quanto aos perfis relacionados aos mecanismos de ação, notou-se uma semelhança geral entre todos os grupos (Figura 15A). As amostras de transportes apresentaram maior diferença pela alta proporção encontrada para os genes que atuam por efluxo em comparação aos outros mecanismos. Nas amostras de pacientes, transportes e granjas de aves de agricultura familiar foi detectada a presença de genes classificados como Outros, o que não foi verificado nos demais grupos.

A alfa-diversidade categorizada por genes se mostrou variada nos diversos grupos (Figura 16). As granjas de suínos convencionais apresentaram maior diferença no índice observado dentro do grupo. As granjas de suínos de agricultura familiar e os transportes tiveram variedade menor dentro dos respectivos grupos. Cerca de 75% das amostras de granjas de aves apresentaram índice de alfa-diversidade observado inferior a 100. Comparativamente, os grupos de internação e alta de pacientes apresentaram índices semelhantes entre si. A análise estatística não revelou diferença significativa entre nenhum dos grupos ($p_{\text{ajustado}} > 0,05$), porém é possível observar algumas tendências, como a menor riqueza das GSAF em comparação ao grupo GSC tanto para genes, quanto para classes e mecanismos.

A nível de classe e mecanismo de ação os diferentes grupos apresentaram índices de alfa-diversidade observado similares entre si, principalmente as amostras de granjas convencionais, transportes e pacientes (Figura 16). Foi possível observar níveis mais baixos relacionados às amostras de granjas de suínos de agricultura familiar. As granjas de aves de agricultura familiar foram as amostras com maior variedade dentro do grupo em relação aos mecanismos de ação. A nível de classes de antimicrobianos, as amostras de granjas de suínos convencionais e aves de agricultura familiar mostraram maiores índices de diversidade. Por outro lado, a nível de mecanismo de ação, o grupo de granjas de agricultura familiar obteve menor diversidade comparado às demais amostras. Novamente, observou-se maior semelhança entre os grupos de pacientes de internação e alta, porém com uma

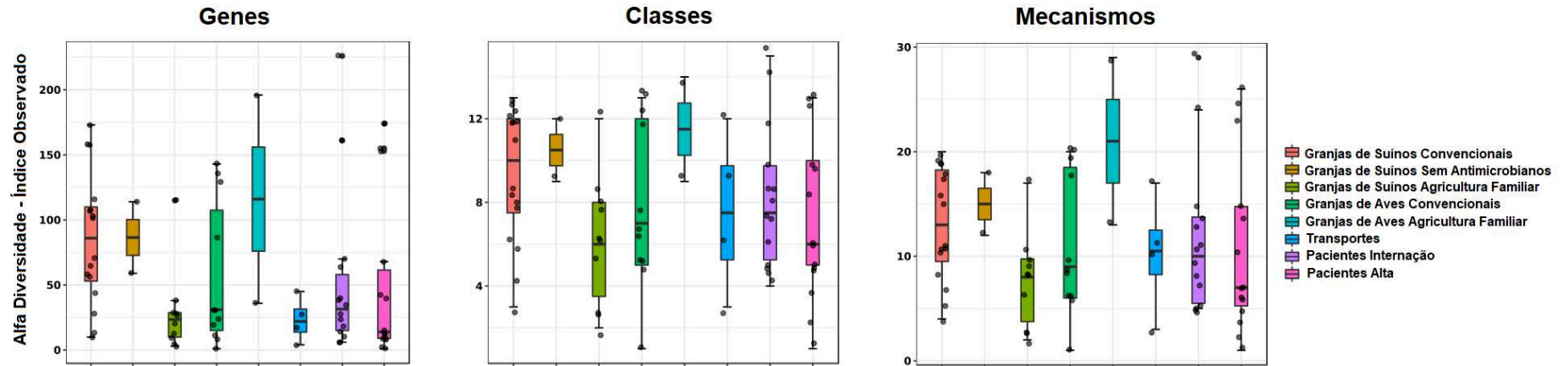
tendência de diminuição da alfa-diversidade do momento da alta em relação à internação.

6.6 Análises de agrupamento (clusterização)

Ao agrupar as amostras a nível de classe, observou-se a separação do dendrograma em três diferentes clados (Figura 17A). O primeiro clado contém 17 amostras de cinco grupos diferentes (GSAF, GAC, transportes, pacientes internação e pacientes alta). Nesse clado observou-se a maior proximidade entre as amostras de pacientes e transportes em relação às granjas. O clado 2 possui 27 amostras de todos os grupos amostrais, exceto dos transportes. Observou-se a prevalência de amostras de granjas de aves e suínos convencionais próximos, porém alocados em subclados distintos. Amostras de granjas e outros tipos de sistema de produção e de pacientes encontravam-se dispersos ao longo deste clado. Por fim, notou-se um agrupamento de amostras de pacientes e transportes. O terceiro clado é composto por 29 amostras de todos os grupos, exceto GAAF e transportes. Neste último, foi possível visualizar as amostras de diferentes grupos compartilhando as diversas subdivisões, representando uma maior homogeneidade no perfil do resistoma dessas amostras, independentemente do grupo amostral. De forma geral, na porção final do dendrograma/nas porções mais próximas das amostras, notou-se a presença de ramos curtos, o que indica menor dissimilaridade entre as amostras.

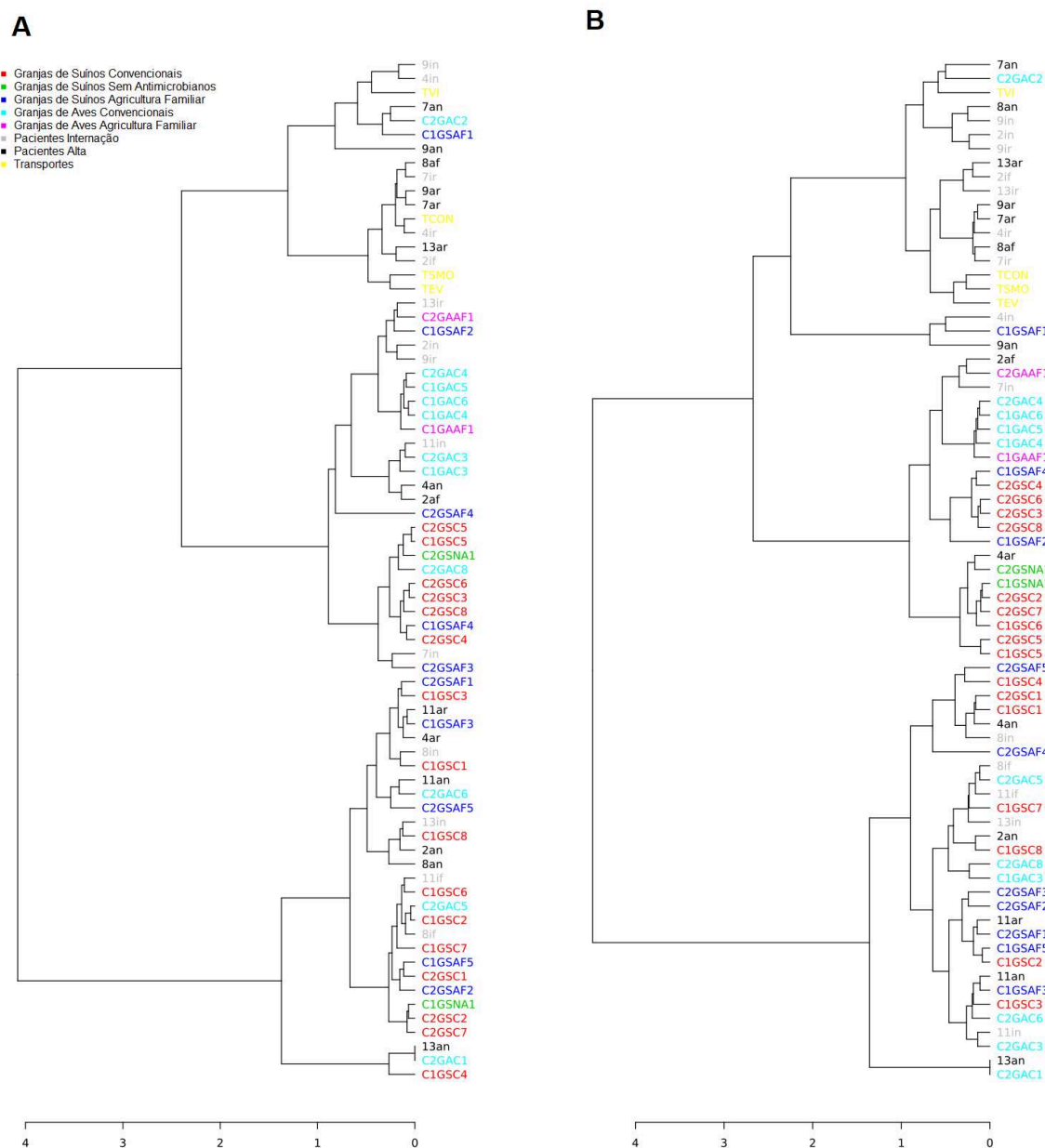
A nível de mecanismo de ação, o dendrograma construído é composto por três grandes clados (Figura 17B). O primeiro clado contém 21 amostras sendo composto principalmente por amostras de pacientes e transportes. As amostras de pacientes de internação e alta encontraram-se dispersas entre si, enquanto três das quatro amostras de transportes foram alocadas no mesmo subclado. O segundo clado, com 22 amostras, é composto majoritariamente por granjas de suínos e aves. De forma geral, observou-se bem a divisão entre os grupos e o alto nível de homogeneidade entre as 13 amostras de granjas de suínos presentes neste clado. Apesar dos diferentes sistemas de produção, notou-se a proximidade entre amostras de suínos de agricultura familiar, convencional sem antimicrobianos e com

Figura 16. Índice de alfa-diversidade nos grupos amostrais



Boxplots representando o índice de alfa-diversidade observado a nível de genes, classes de antimicrobianos e mecanismos de ação.

Figura 17. Análise de clusterização a nível de classes de antimicrobianos e mecanismos de ação



Dendrogramas a nível de classes de antimicrobianos (A) e mecanismos de ação (B) representando o agrupamento das amostras de diferentes grupos, categorizados por cores. Vermelho: GSC; Verde: GSNA; Azul: GSAF; Azul Ciano: GAC; Rosa: GAAF; Amarelo: Transportes; Cinza: Pacientes Internação; Preto: Pacientes Alta

antimicrobianos. Para as granjas de aves observou-se algo semelhante, tendo as granjas convencionais agrupadas entre si e granjas de agricultura familiar próximas. Em seguida, o terceiro clado apresentou 30 amostras de grande heterogeneidade

por ter os diferentes grupos dispersos entre si. Destacaram-se as amostras de GSC, GSAF, GAC e pacientes neste clado.

As figuras de mapas de calor (*heatmaps*) mostraram que as diferentes classes de antimicrobianos e os mecanismos de ação estão mais concentrados ao longo das amostras (Figura 18). Os genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos e às tetraciclinas apresentaram maior distribuição, principalmente, nas amostras de granjas de suínos convencionais, de agricultura familiar e pacientes (Figura 18A). Em relação aos glicopeptídeos, destacou-se a amostra TEV na qual o maior número de genes dessa classe foi detectado. A resistência às fluoroquinolonas se mostrou mais presente nas amostras de pacientes, bem como a resistência aos beta-lactâmicos, fosfomicinas, peptídeos e multiclasse. Foi possível verificar a maior concentração de genes relacionados aos anfenicóis nas amostras de suínos convencionais e de agricultura familiar. Os genes ligados à resistência às diaminopirimidinas aparentaram estar relacionados principalmente às amostras de pacientes e granjas de aves. Outros grupos como os genes de resistência às estreptograminas, lincosamidas e macrolídeos possuíam grande distribuição ao longo dos diferentes grupos amostrais. De forma geral, observou-se uma larga heterogeneidade quando avaliada a resistência em relação às classes de antimicrobianos.

Quanto aos mecanismos de ação (Figura 18B), foi evidente a formação de alguns padrões baseado na prevalência das diferentes classificações, porém não foi possível atribuir cada padrão observado a determinados grupos amostrais. Os mecanismos de alteração e efluxo foram prevalentes entre as amostras de pacientes. Além disso, notou-se que as granjas possuem maior predominância sobre a inativação enzimática, independente do sistema de produção.

6.7 Análise de coordenadas principais (PCoA)

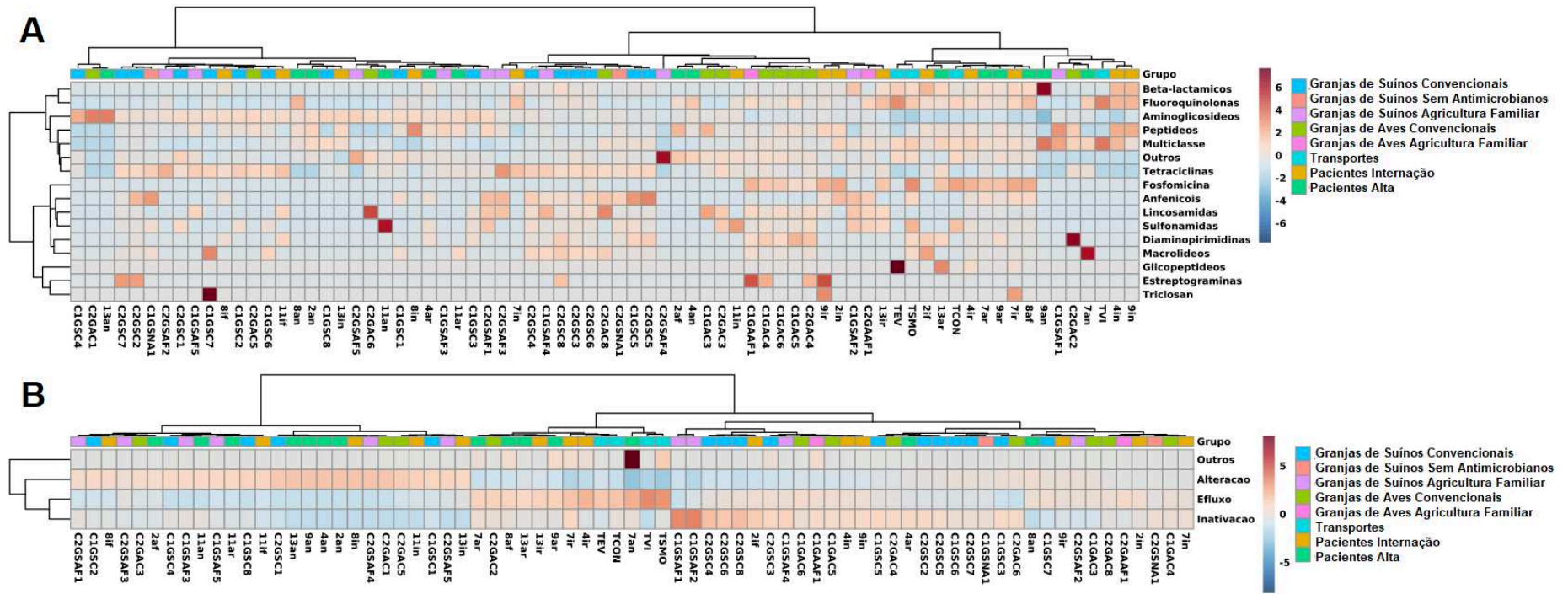
A análise de coordenadas principais (PCoA) indicou a heterogeneidade entre os grupos e suas similaridades quanto aos perfis de resistoma (Figura 19). A nível de classe, foi possível evidenciar que boa parte das amostras posicionou-se

próximo ao centro do gráfico, ou seja, muitas amostras apresentaram perfil semelhante (Figura 19A). Além disso, foi possível inferir que houve, de fato, um resistoma central/*core*, pois a maioria das elipses apresentaram praticamente o mesmo centro. As amostras de transportes fazem parte do único grupo que encontrou-se mais deslocado desse centro determinado pelos outros grupos. Avaliando as elipses de cada grupo, foi possível verificar a homogeneidade dentro do grupo de granjas de suínos de acordo com o seu tamanho frente aos outros grupos. Os grupos de granjas de aves, pacientes alta e transportes demonstraram maior heterogeneidade de acordo com o tamanho de suas respectivas elipses formadas. A nível de mecanismo de ação observaram-se situações semelhantes àquelas apenas descritas, porém de forma geral as elipses formadas foram maiores (Figura 19B). Tal fato indicaria maior heterogeneidade dentro dos grupos a nível de mecanismo de ação.

Ao analisar somente as amostras de granjas, tanto a nível de classe quanto a nível de mecanismo de ação, observaram-se coisas semelhantes (Figura 19C-D). Os diferentes grupos amostrais apresentaram o mesmo centro em comum. As granjas de suínos convencionais apresentaram perfis de resistência muito homogêneos entre si, enquanto as de suínos de agricultura familiar apresentaram maior dispersão no gráfico indicando maior heterogeneidade. As granjas de aves convencionais apresentaram elipses maiores, principalmente quando comparadas com as granjas de suínos convencionais.

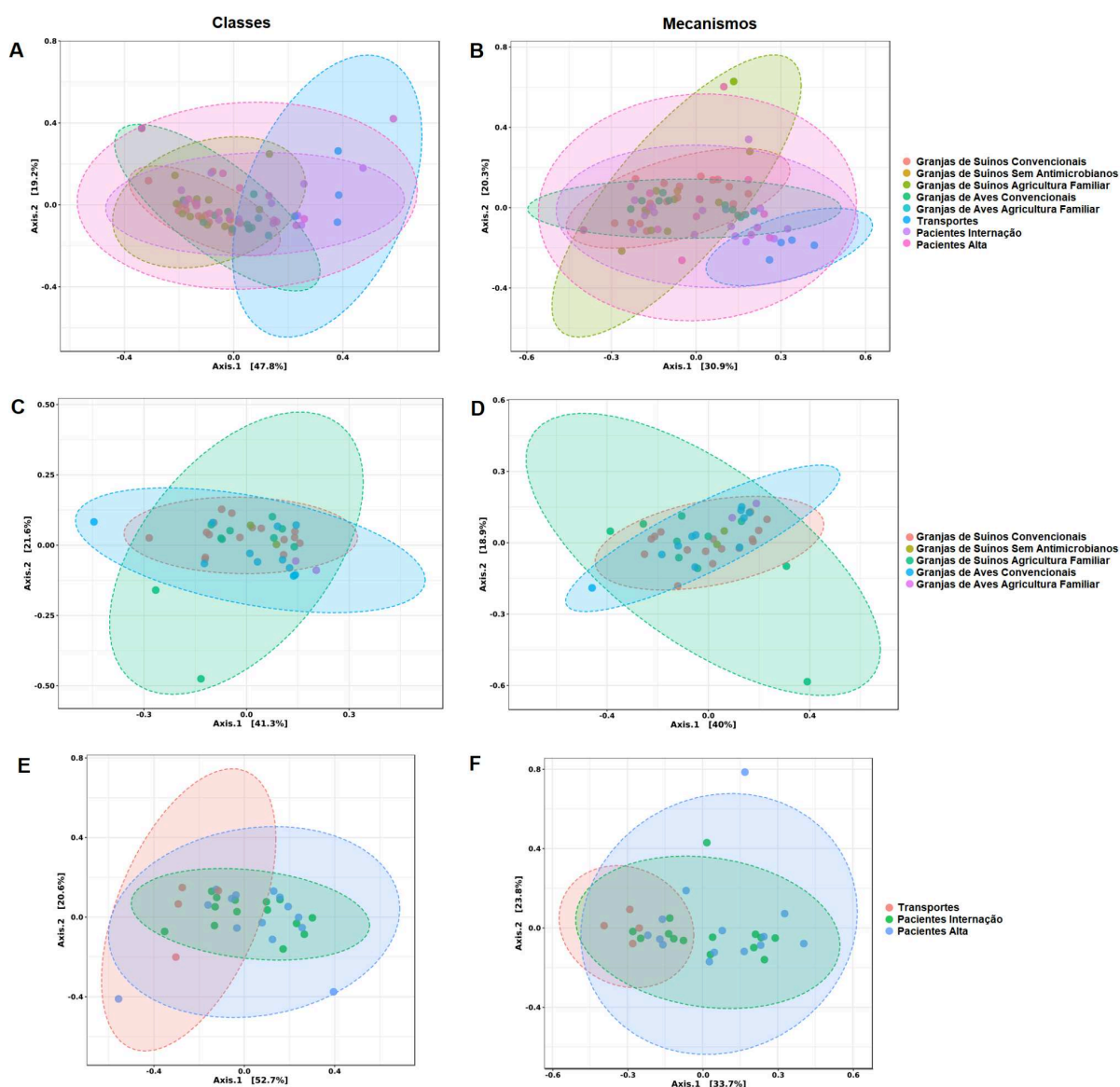
As amostras de pacientes no momento da internação aparentaram ter maior homogeneidade entre si quando comparadas às amostras obtidas após a passagem dos pacientes pelo hospital (Figura 19E-F). Além disso, notou-se que tanto no momento da internação quanto na alta, os centros das elipses eram os mesmos. Observou-se, também, um deslocamento das amostras de transportes em relação às de pacientes indicando grande diferença no perfil do resistoma entre essas amostras de fontes distintas, tanto para classes quanto para mecanismo de ação.

Figura 18. Mapas de calor sobre o perfil de resistoma a nível de classes de antimicrobianos e mecanismos de ação



Mapas de calor indicando a prevalência de classes de antimicrobianos (A) e mecanismos de ação (B) ao longo das amostras dos diferentes grupos.

Figura 19. Análises de Coordenadas Principais (PCoA)



Análise de beta-diversidade entre os diversos grupos amostras a nível de classes de antimicrobianos (A, C e E) e mecanismos de ação (B, D e F).

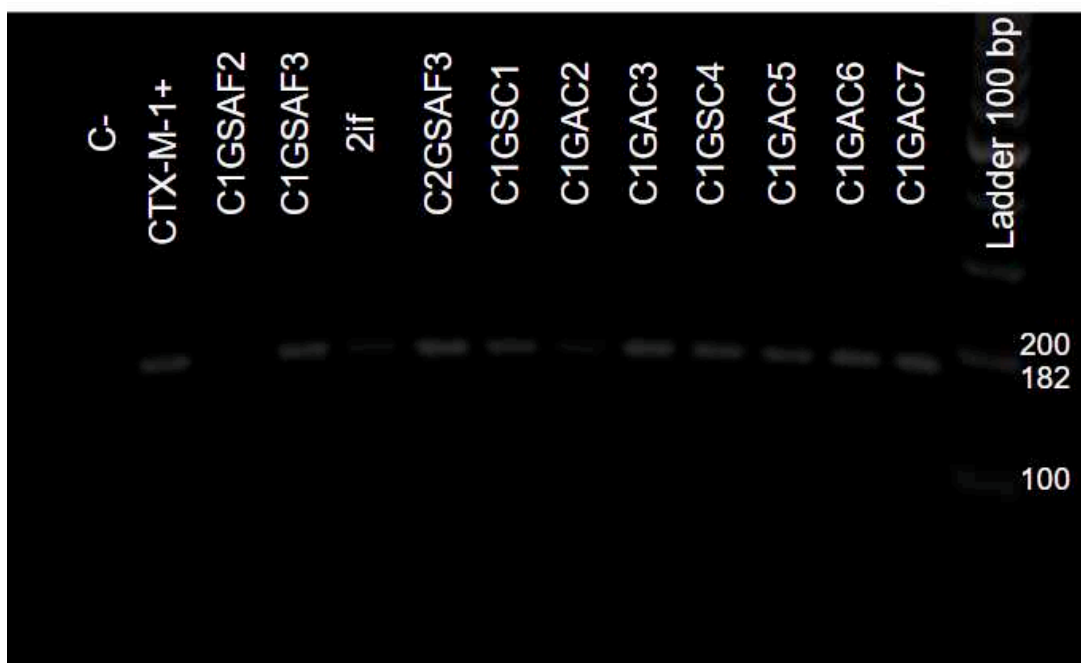
6.8 PCR

6.8.1 *bla*_{CTX-M-1}

Dez amostras foram identificadas como positivas para o gene *bla*_{CTX-M-1}, sendo elas: C1GSC1, C1GAC2, C1GAC3, C1GAC4, C1GAC5, C1GAC6, C1GAC7, C1GSAF3, C2GSAF3 e 2if (Figura 20). Desta forma, totalizaram-se uma amostra de

granja de suínos, seis amostras de granjas de aves, duas amostras de granjas de suínos de agricultura familiar e uma única amostra de paciente.

Figura 20. Resultado da PCR para $bla_{CTX-M-1}$



Gel de eletroforese com amostras representativas positivas e negativas para $bla_{CTX-M-1}$. C-: Controle negativo; CTX-M-1+: Controle positivo para $bla_{CTX-M-1}$.

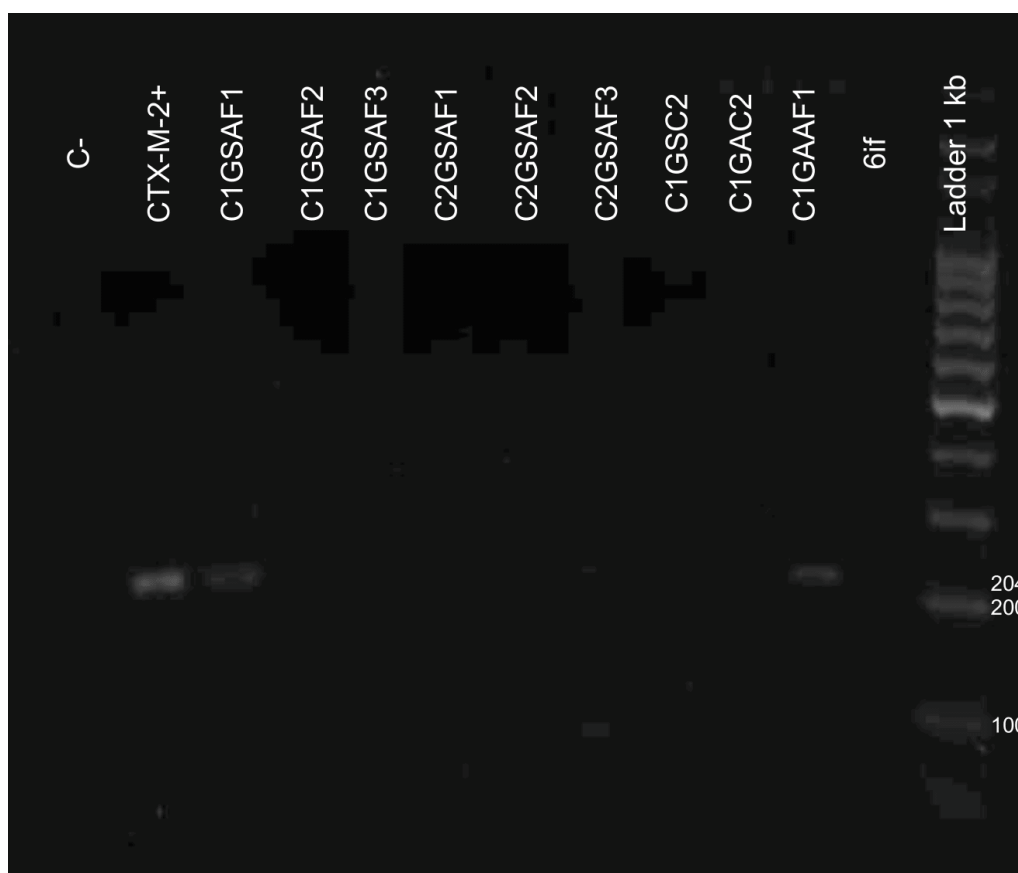
6.8.2 $bla_{CTX-M-2}$

Somente duas amostras foram positivas para o gene $bla_{CTX-M-2}$ (Figura 21). Uma de granja de aves de agricultura familiar (C1GAAF1) e outra de granja de suínos de agricultura familiar (C1GSAF1).

6.8.3 $bla_{CTX-M-9}$

No total, nove amostras amplificaram para o gene $bla_{CTX-M-9}$ nas reações de PCR (Figura 22). Duas foram de granjas de suínos de agricultura familiar (C1GSAF1 e C1GSAF2), quatro de granjas de suínos convencionais (C1GSC2, C1GSC7, C1GSC8 e C1GSNA1) e três amostras de aves (C1GAC1, C1GAC2 e C1GAC3).

Figura 21. Resultado da PCR para *bla*_{CTX-M-2}



Gel de eletroforese com amostras representativas positivas e negativas para *bla*_{CTX-M-2}. C-: Controle negativo; CTX-M-2+: Controle positivo para *bla*_{CTX-M-2}.

6.8.4 *bla*_{KPC}

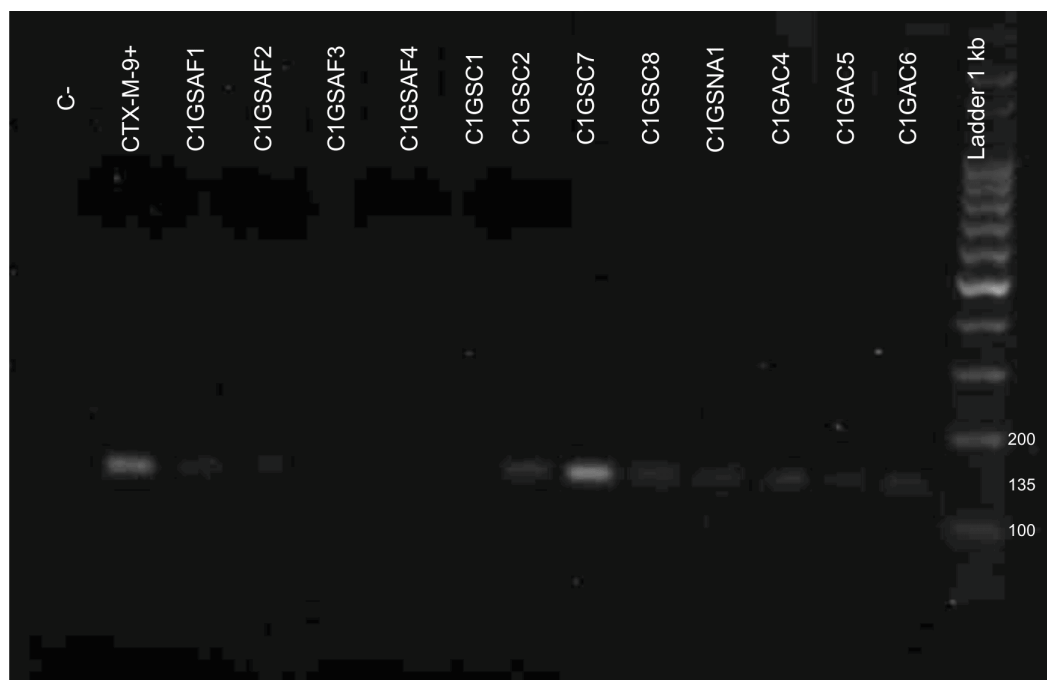
Através da PCR utilizando iniciadores para *bla*_{KPC}, houve a amplificação de duas amostras (Figura 23). As amostras positivas foram de fezes coletadas no momento de internação e alta do paciente 2 (2if e 2af). Nenhuma outra amostra de granja ou transporte apresentou qualquer amplificação específica para *bla*_{KPC}. Os dados obtidos utilizando o sequenciamento por nanoporos confirmou a presença do gene *bla*_{KPC-3} na amostra 2if.

6.8.5 *bla*_{NDM}

Nenhuma amostra apresentou amplificação quando realizada a PCR para *bla*_{NDM} (Figura 24). Assim, todas as amostras foram consideradas negativas para o

gene. A construção dos resistomas por MinION também indicou a ausência de bla_{NDM} , mesmo considerando que as reações de PCR foram realizadas somente com uma parte das amostras.

Figura 22. Resultado da PCR para $bla_{CTX-M-9}$

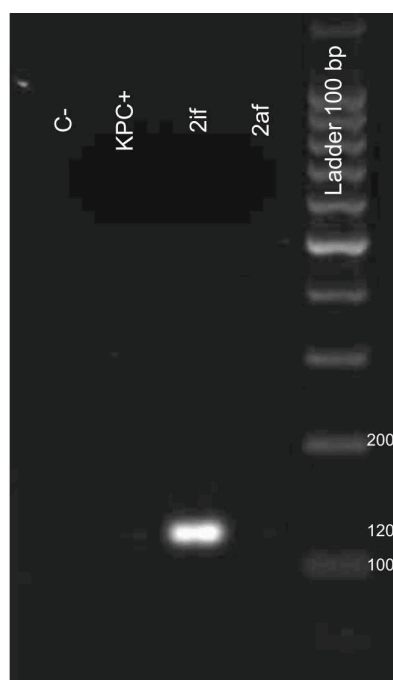


Gel de eletroforese com amostras representativas positivas e negativas para $bla_{CTX-M-9}$. C-: Controle negativo; CTX-M-9+: Controle positivo para $bla_{CTX-M-9}$.

6.8.6 bla_{SHV} e bla_{TEM}

Foram observadas 17 amostras positivas para bla_{TEM} e nenhuma positiva para bla_{SHV} (Figura 25). As amostras positivas para o gene bla_{TEM} foram: C1GSC1, C1GSC4, C1GSC8, C1GSNA1, C1GSAF2, C1GSAF3, C2GSAF1, C2GSAF2, C2GSAF3, C1GAC1, C1GAC2, C1GAC3, C1GAC4, C1GAC6, C1GAC7 e 8af; sendo correspondentes a três amostras de granjas de suínos convencionais, uma única amostra de suínos convencionais sem antimicrobianos, cinco de granjas de suínos de agricultura familiar, seis amostras de granjas de aves e uma amostra de pacientes. Foi possível visualizar bandas inespecíficas nas imagens dos géis, mas que não interferem na interpretação dos resultados referentes à banda de interesse.

Figura 23. Resultado da PCR para bla_{KPC}



Gel de eletroforese com amostras representativas positivas e negativas para bla_{KPC}

.C-: Controle negativo; KPC+: Controle positivo para bla_{KPC} .

6.8.7 $mcr-1$, $mcr-2$, $mcr-3$, $mcr-4$ e $mcr-5$

Apenas uma amostra (C1GSAF1) foi identificada positiva para a PCR *Multiplex* das variantes do gene *mcr* (Figura 26). Em virtude da dificuldade em possuir controles positivos para cada uma das cinco variantes, optou-se por confirmar a identidade do fragmento de duas formas: repetição da PCR separando os pares de *primers* em cinco diferentes reações e o sequenciamento de Sanger. As reações com *primers* separados indicou a amostra como positiva para $mcr-4$ e o sequenciamento de Sanger confirmou a identidade do produto.

6.9 Sequenciamento de Sanger

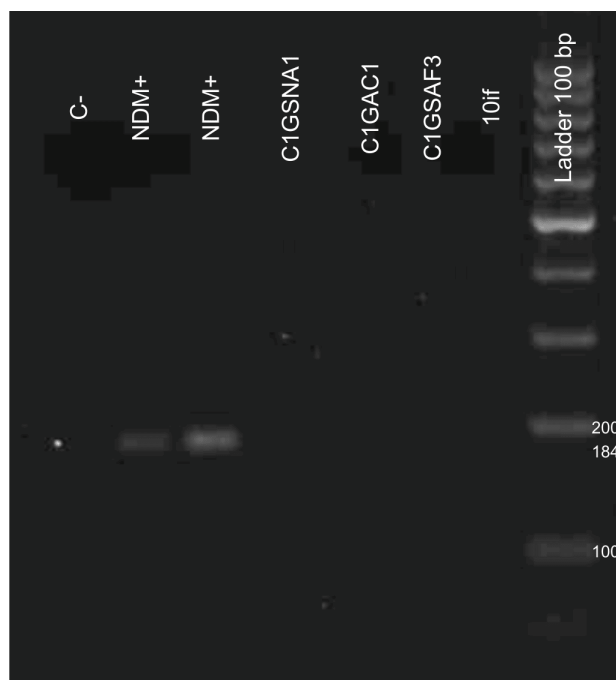
Através do sequenciamento de Sanger foi possível averiguar a identidade dos fragmentos obtidos por PCR.

6.9.1 $bla_{CTX-M-1}$

Para $bla_{CTX-M-1}$ o alinhamento múltiplo foi realizado com 50 sequências de referência relativas àquelas passíveis de amplificação pela PCR executada neste

estudo (Apêndice B). A qualidade do sequenciamento foi suficiente para a montagem em um único contig. O alinhamento revelou que o produto amplificado corresponde ao grupo CTX-M-1 segundo os valores de identidade obtidos (> 98%).

Figura 24. Resultado da PCR para bla_{NDM}



Gel de eletroforese com amostras representativas negativas para bla_{NDM} . C-:

Controle negativo; NDM+: Controle positivo para bla_{NDM} .

6.9.2 $bla_{CTX-M-2}$

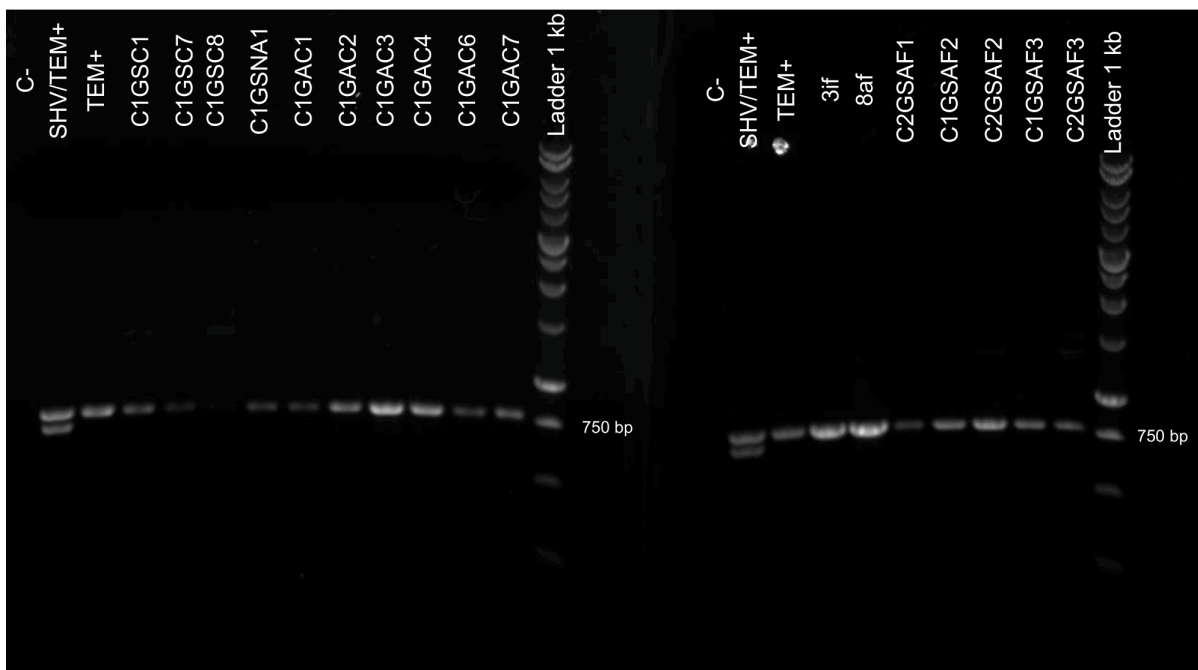
Foram utilizadas as 23 sequências de referência relativas às variantes passíveis de amplificação pela reação de PCR estabelecida neste trabalho (Apêndice C). Foi possível montar a sequência através do sequenciamento de ambas as fitas e, além disso, confirmar a identidade do produto através do alinhamento múltiplo e os valores de identidade superiores a 98%.

6.9.3 $bla_{CTX-M-9}$

Não foi possível montar as sequências geradas por ambas as fitas em um único contig devido à qualidade insuficiente dos eletroferogramas. Entretanto, o arquivo gerado para a fita *forward* apresentou o tamanho esperado do fragmento e

picos bem definidos visualmente. O alinhamento múltiplo utilizando a fita *forward* revelou alta identidade (> 98%) em relação às sequências do banco de dados (Apêndice D).

Figura 25. Resultado da PCR Multiplex para bla_{SHV} e bla_{TEM}



Gel de eletroforese com amostras representativas positivas e negativas para bla_{SHV} e bla_{TEM} . C-: Controle negativo; SHV/TEM+: Controle positivo para bla_{SHV} e bla_{TEM} ; TEM+: Controle positivo para bla_{TEM} .

6.9.4 bla_{KPC}

O alinhamento múltiplo para o gene bla_{KPC} foi realizado utilizando todas as sequências de referências passíveis de amplificação pela reação padronizada como explicitado no item 5.6.1 dos Materiais e Métodos (Apêndice E). A qualidade do sequenciamento de ambas as fitas foi adequada para a montagem em um único contig. Foi possível confirmar a identidade do produto gerado através do alinhamento múltiplo, já que os valores de identidade encontrados foram superiores a 98%.

6.9.5 *bla*_{NDM}

O produto obtido com as sequências *forward* e *reverse* foi alinhado com as 16 variantes passíveis de amplificação utilizando os iniciadores para o gene *bla*_{NDM} deste trabalho (Apêndice F). A partir do alinhamento foi possível confirmar a identidade do produto, mas não houve evidência suficiente para certificar a variante sequenciada em virtude do pequeno tamanho do amplicon. Os valores de identidade foram acima de 96%.

Figura 26. Resultado da PCR *Multiplex* para *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*



Gel de eletroforese com amostras representativas positivas para *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*. C-: Controle negativo; MCR-1+: Controle positivo para *mcr-1*.

6.9.6 *bla*_{SHV}

Somente o sequenciamento utilizando o *primer* SHV F gerou um eletroferograma com resultado capaz de confirmar a identidade do produto. A partir deste alinhamento foi possível confirmar a identidade do produto gerado devido aos altos valores de identidade encontrados (> 98%) como visualizado no Apêndice G.

6.9.7 *bla*_{TEM}

Não foi possível realizar a montagem em uma única sequência a partir dos dois eletroferogramas gerados. Foi realizado, então, o BLAST de todas as variantes passíveis de amplificação pelos iniciadores para *bla*_{TEM} com ambos sequenciamentos (Apêndice H). Os alinhamentos realizados com as sequências relacionadas à TEM F e TEM R obtiveram valores de identidade, independentemente da variante, acima de 94% e 96%, respectivamente. Sendo assim, a identidade do produto foi confirmada.

6.9.8 *mcr-1*

O banco de dados local construído continha 30 diferentes variantes da família *mcr-1* (Apêndice I). Os valores de identidade obtidos ao alinhar o fragmento montado e as variantes do banco de dados foram superiores a 98%. Dessa forma, teve-se confirmada a identidade do fragmento sequenciado.

6.9.9 *mcr-4*

A PCR revelou a presença do gene *mcr-4* na amostra de granja de suínos de agricultura familiar C1GSAF1. Tratando-se de um gene pouco relatado na literatura, optou-se por realizar o sequenciamento desse fragmento. O sequenciamento confirmou a identidade do produto. O *software* para avaliação de qualidade não foi capaz de montar as sequências *forward* e *reverse* em um único contig. Apesar disso, avaliando o sequenciamento de ambas fitas individualmente, os eletroferogramas gerados alinharam com as seis diferentes variantes da família gênica *mcr-4* (Apêndice J). Em ambos os casos, os alinhamentos apontaram maior similaridade dos *queries* com as variantes *mcr-4.3* e *mcr-4.6*. Ambos os alinhamentos apresentaram 99,40% e 100% de identidade em relação às sequências MCR-4 F e MCR-4 R, respectivamente. Entretanto, não foi possível distinguir entre essas duas variantes, pois as sequências obtidas por Sanger não contemplam a região onde ocorre uma mutação pontual que as diferencia.

7 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo geral realizar uma análise exploratória da composição do resistoma de comunidades microbianas presentes em ambientes de extenso uso de antimicrobianos do Estado de Santa Catarina. Nosso trabalho fez parte de um outro projeto maior que busca determinar a dinâmica de circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre locais de criação animal e o HU-UFSC-EBSERH, principal centro de atenção de saúde em Santa Catarina, devido a sua ligação direta com a UFSC e sua produção acadêmica e científica de qualidade. Esse projeto conta com o suporte financeiro da Fundação Bill and Melinda Gates e tem sua administração mediada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Além disso, esse projeto está sendo executado com a colaboração científica e logística da Embrapa Suínos e Aves (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Concórdia; <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves>) e de vários grupos de pesquisa da UFSC. Esse esforço permitiu que obtivéssemos amostras de diferentes locais incluindo granjas de criação animal de suínos e aves de diversos sistemas de produção, transportes de pacientes e de pacientes. Todos esses locais tiveram como foco geográfico de estudo a mesorregião do oeste catarinense, um dos pólos principais de produção de suínos e aves de corte do mundo. Essa atividade movimenta cerca de R\$10 bilhões, sendo a quarta e a terceira maior produção mundial entre suínos e aves, respectivamente. Assim, o estudo realizado no presente trabalho visou proporcionar pela primeira vez um perfil do resistoma de locais estratégicos para cenário estadual e nacional. Além disso, teve-se como objetivo traçar estratégias de intervenção que possam por um lado, manter o equilíbrio entre a saúde humana, animal e ambiental (aplicando o conceito de saúde única), e ao mesmo tempo, manter essa atividade econômica de grande importância que representa milhares de oportunidades de trabalho além da provisão de produtos de alta qualidade que são exportados para cerca de 67 países, e portanto contribuem de forma importante para a alimentação mundial.

Uma primeira avaliação do trabalho desenvolvido, nos permite afirmar que a metodologia de sequenciamento metagenômico empregada usando nanoporos resultou claramente eficiente e muito fácil de ser adotada dentro da rotina de trabalho do laboratório. Esta tecnologia tem grande protagonismo no cenário atual entre os estudos de metagenômica e de resistoma. Destaca-se ainda a importância da metodologia para a vigilância de patógenos em diversos ambientes e a aplicação no diagnóstico clínico, já que a técnica apresenta resultados em tempo real (LAMB *et al.*, 2020; LU; GIORDANO; NING, 2016). A escolha pela plataforma de sequenciamento se baseou nas diversas vantagens que essa oferece. A metodologia baseada em *long-reads* é conveniente para o sequenciamento e detecção de genes de resistência em amostras de alta complexidade microbiológica. Além disso, a plataforma busca melhorias na *performance* e redução de erros constantemente, o que leva à maior confiabilidade dos resultados obtidos. Embora ela apresente taxas de erro maior que outras plataformas, como Illumina e PacBio, o que pode dificultar e enviesar a identificação correta e precisa de variantes genéticas, comuns nos genes de resistência aos antimicrobianos, a enorme diferença de custo quando se a aquisição do sequenciador para uso próprio, além da versatilidade do seu uso; representam vantagens que podem muito bem fazer a diferença para estudos similares. A identificação de genes de resistência aos antimicrobianos empregando essa técnica é cada vez mais frequente de ser encontrada na literatura juntamente com suas aplicações clínicas, ambientais e na saúde animal, ou seja, aplicando-se o conceito de saúde única (GARDY; LOMAN, 2017; GOLPARIAN *et al.*, 2018; URBAN *et al.*, 2021). Apesar da complexidade dos dados gerados, a ONT oferece um suporte adequado e personalizado, além da ampla acessibilidade e facilidade sobre suas ferramentas de análises do sequenciamento. Dessa forma, a plataforma MinION se resultou altamente eficiente e cabível ao tipo de estudo desenvolvido e acredita-se que seja uma importante ferramenta facilitadora e que possa contribuir a favor da realização de programas e estudos de vigilância epidemiológica.

As análises resultantes do sequenciamento foram capazes de distinguir os diferentes ambientes e grupos através dos seus respectivos perfis de resistomas. No entanto, devido ao tipo de amostra coletada, algumas análises ficaram

comprometidas devido a baixa recuperação de material microbiológico e, conseqüentemente, de DNA para sequenciamento, motivo pelo qual essas amostras foram excluídas das análises. Os *swabs*, principalmente aqueles de superfície como os de transportes, apresentaram rendimentos relativamente baixos no sequenciamento, levando, conseqüentemente, à reduzida detecção de genes de resistência. De modo semelhante, as camas de aviário foram amostras compostas majoritariamente por serragem utilizada nos criadouros, reduzindo a capacidade de recuperar material biológico suficiente, que realmente representasse o microbioma do local (CISAR *et al.*, 2010). Esse fato poderia explicar o rendimento insuficiente de obtenção de DNA evitando a exclusão de algumas amostras nas análises subsequentes.

Outro ponto a ser considerado é a pequena amostragem realizada para os grupos GSNA e GAAF, fator que impediu e limitou a determinação de um comportamento em relação ao aspecto de perfil de resistência. No entanto, é importante mencionar que essas amostras não são consideradas no projeto geral do qual este trabalho faz parte, mas que pelo valor exploratório que elas poderiam prover, foi optado por incluí-las no estudo.

Foi observada a grande dominância dos genes relacionados à resistência pelas tetraciclina, pelos aminoglicosídeos e por mais de uma classe de antimicrobianos em todos os ambientes abordados neste estudo. As tetraciclina foram introduzidas como agentes clínicos nos anos 1940. Sua alta eficácia sobre as bactérias gram-positivas e gram-negativas favoreceu seu extenso uso na clínica humana e animal, especialmente como indutor do crescimento de suínos e aves (ANGELAKIS, 2017; OTSUKA, 2020). Além disso, a maioria dos genes de resistência às tetraciclina encontram-se em elementos genéticos móveis, facilitando sua disseminação e transmissão entre bactérias (POIREL *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2019). Estudos apontam os microrganismos ambientais como a principal origem da resistência a essa classe, bem como a responsabilidade por atuar como reservatório (BERGLUND *et al.*, 2020).

A resistência aos aminoglicosídeos, muitas vezes mediadas por transferases, encontra-se dispersa nos mais diversos ambientes. Muitos estudos relatam a presença de genes de resistência em elevada abundância ao longo de isolados

clínicos e ambientais (KHOSRAVI; JENABI; MONTAZERI, 2017; GALANI *et al.*, 2019; NAYME *et al.*, 2019). Além disso, frequentemente estão associados a outros genes como ESBLs (do inglês, beta-lactamases de espectro estendido) ou que conferem resistência a fluoroquinolonas (KRAUSE *et al.*, 2016). O extenso uso destes antimicrobianos na clínica e na criação animal fazem jus à alta diversidade de genes encontrados nas amostras.

O fenótipo MLS_B, ou seja, microrganismos que possuam resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B é associado à família gênica *erm*. Os resultados encontrados neste estudo apontam a dispersão generalizada dessa família nos ambientes hospitalar e de criação animal. Os estudos do mobiloma de espécie de *Staphylococcus* mostram a forte ligação desses genes com os elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons. Dessa forma, fica clara a justificativa relacionada a dispersão dos genes *erm* em amostras clínicas e ambientais (FEßLER *et al.*, 2018).

O TGI humano é reconhecido por ser um grande reservatório para genes de resistência aos beta-lactâmicos e, além disso, para patógenos produtores de beta-lactamases (KARANIKI *et al.*, 2016; SALEEM *et al.*, 2020). Os resultados aqui apresentados indicaram um maior potencial de resistência a esta classe entre os pacientes, ou seja, o ambiente hospitalar. Dessa forma, torna-se preocupante o conhecimento acerca da epidemiologia ligada à disseminação das beta-lactamases (BUSH; BRADFORD, 2020). Já se tem registros de surtos nosocomiais de ESBLs desde a década de 1990. Neste mesmo período os maiores relatos trazem a forte e rápida disseminação de TEM, SHV, CTX-M e KPC. Pela década de 2000, identificaram-se surtos de NDM, VIM, IMP, GES e OXA-48. Observa-se, assim, que o cenário das beta-lactamases encontra-se frequentemente associado a infecções hospitalares e surtos nosocomiais (DE ANGELIS *et al.*, 2020). Além disso, estudos já demonstram a capacidade que alguns microrganismos comensais do gênero *Streptococcus* podem atuar como reservatório de genes que conferem resistência aos beta-lactâmicos (JENSEN *et al.*, 2015).

Os genes de resistência às fluoroquinolonas foram identificados majoritariamente nas amostras de pacientes, em especial, a família *qnr*. Desde a década de 1980 as fluoroquinolonas vêm sendo empregadas no combate à

infecções graves ou resistentes a outras classes. Além disso, o espectro de eficácia contra bactérias gram-negativas e gram-positivas favoreceu o uso global dessa classe no combate de infecções graves (REDGRAVE *et al.*, 2014). O trabalho de Hooper e Jacoby (2016) evidencia os plasmídeos como os principais carreadores desses genes e geralmente são encontrados associados a outros genes de resistência como as beta-lactamases. As bactérias também podem expressar resistência às fluoroquinolonas através de mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*, enzimas relacionadas com o condensamento do DNA bacteriano. Os resultados indicaram a presença dessas mutações dispersas nos diversos ambientes amostrados. Questiona-se muito na literatura em relação a influência dessas mutações sobre o *fitness* da bactéria portadora: foi observada, em porcos e aves, maior persistência de linhagens de *Campylobacter* resistência mesmo após a remoção da pressão seletiva (REDGRAVE *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos a partir dos métodos de distância como o PCoA apresentaram alguns dados já esperados. O fato de que as granjas de suínos convencionais tenham apresentado resistomas mais homogêneos entre si reafirma as consequências relativas ao confinamento e as práticas de segurança biológica empregadas nesse tipo de sistema de produção. Da mesma forma em que se observa uma elipse maior para os suínos de agricultura familiar, isso indica a maior variabilidade encontrada no resistoma a partir do método extensivo aplicado àqueles animais. Os resultados relativos às granjas de aves convencionais apontaram uma conformação intermediária de homogeneidade entre granjas de suínos convencionais e de agricultura familiar, levando a crer que, apesar do resistoma diverso, ainda pode-se observar maior semelhança entre as diferentes granjas quando compara com um sistema de criação extensivo. Dessa forma, o tipo de regime de criação parece estar diretamente envolvido com a construção do resistoma devido ao confinamento dos animais, pois já é bastante discutida a perda de diversidade e uniformidade da microbiota quando emprega-se o confinamento (WANG *et al.*, 2020b). Além disso, os antimicrobianos utilizados em cada tipo de animal e em cada regime de criação podem estar relacionados com os perfis de beta-diversidade observados. Não obstante, sabe-se que nas granjas de agricultura familiar participantes do estudo, há o convívio entre diferentes espécies de animais

no mesmo local de criação, podendo ser outro fator colaborativo para a maior heterogeneidade entre as amostras desse grupo. Dessa forma, os dados sugerem que as granjas convencionais possuem resistomas mais homogêneos entre si, apesar das diferentes localidades geográficas, devido a padronização de práticas de produção e o uso rotineiro de antimicrobianos. Por outro lado, a heterogeneidade observada entre as granjas de agricultura familiar pode estar ligada à sujeição desses animais à contaminação pelo ambiente (por água, alimentação, etc.), já que não há uma pressão seletiva capaz de impulsionar a padronização do perfil de resistência e o aumento do número de genes de resistência como ocorre nos sistemas de produção convencionais.

O enfrentamento de surtos dentro de granjas levaram os produtores a pensarem em novas estratégias de controle de infecções. Controles sanitários passivos e ativos são imprescindíveis para evitar maiores perdas de produção. Controle de mortalidade, monitoramentos sorológicos e até mesmo sanitização de ambientes são imprescindíveis para a erradicação de um patógeno (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Além disso, o confinamento leva ao uso compulsório de antimicrobianos para reduzir os riscos de espalhamento de uma suposta infecção. As ações antrópicas influenciam negativamente na saúde e microbiota dos animais, provocando menor diversidade desse ecossistema (ZEINELDIN; ALDRIDGE; LOWE, 2019). A homogeneidade encontrada nas granjas de suínos convencionais e, contrastantemente, não observada nas granjas de suínos de agricultura familiar deve refletir as práticas empregadas nesses dois diferentes sistemas de produção. Tem-se indícios, então, de que o confinamento e o uso de antimicrobianos é capaz de reduzir a diversidade entre as microbiotas dentro do mesmo grupo, mantendo-se uma padronização biológica. Ademais, a determinação da composição da microbiota das amostras estudadas, é um elemento que pode complementar fortemente a avaliação feita neste trabalho. Além disso, a quantidade e tipo de antimicrobianos usados nas granjas poderia ser um dado muito importante para melhor compreender os perfis de resistomas observados. Porém, não foram fornecidos dados quanto à administração de antimicrobianos nas granjas, pois inevitavelmente, esse tipo de trabalho gera certo temor sobre empresas produtores

em relação aos resultados do estudo, podendo comprometer as suas atividades econômicas.

Em relação aos pacientes, põe-se maior atenção sobre a heterogeneidade adquirida pelos resistomas durante a passagem hospitalar. Tratando-se de um local de extenso uso de antimicrobianos, é razoável observar resistomas com maior diversidade e número de genes. Além disso, o próprio ambiente hospitalar é reconhecido pela enorme quantidade de bactérias resistentes as quais facilmente os pacientes poderiam ter encontrado em contato e, conseqüentemente, poderiam ter colonizado a microbiota intestinal ou, até mesmo, a microbiota nasal (LIU; DICKTER, 2020).

A aquisição de resistência através do uso de antimicrobianos é muito comum, dentre os pacientes alguns casos ilustram facilmente essa situação. O paciente 9 utilizou os antimicrobianos sulfametoxazol (sulfonamida) e trimetoprima (diaminopirimidina) durante 20 dias. Foram detectados, somente na amostra retal de alta, os genes relacionados à resistência a ambos os antimicrobianos (*dfrA1*, *dfrA17* e *sul2*). Dessa forma, seria possível relacionar o uso prolongado desses antimicrobianos à resistência adquirida. O gene *dfrF*, diferentemente, foi detectado em ambas as amostras retais, tanto no momento da internação quanto da alta desse mesmo paciente, porém trata-se de um gene encontrado no cromossomo bacteriano. Esses mesmos antimicrobianos são largamente utilizados nas granjas de suínos e aves, o que justifica a detecção de diversas variantes dos genes supracitados (*dfr* e *sul*) nas amostras de ambiente de criação animal.

Os pacientes 2 e 7, por outro lado, apresentaram resistomas nasal e retal de alta menores comparativamente aos de internação. Avaliando a passagem pelo hospital, observa-se o uso de antimicrobianos durante todo o período de internação. Tais observações permitem especular que a administração desses fármacos podem ter conseqüências diferentes daquelas discutidas anteriormente.

Algumas discrepâncias foram observadas quando comparadas as técnicas de PCR e sequenciamento metagenômico no quesito confirmação da detecção de genes. Primeiramente, o fato de que foram realizados procedimentos diferentes de extração de DNA devido às diferentes características de cada uma das técnicas pode justificar a discordância entre resultados. Apesar disso, muito já se sabe sobre

a importância de ambas as técnicas em relação à detecção de genes no estudo da microbiota (SCHMIDT *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020b).

Os dados sobre a família *bla*_{CTX-M} construíram-se de maneira complementar em relação às técnicas de sequenciamento e PCR. As variantes *bla*_{CTX-M-52}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-69}, *bla*_{CTX-M-79} e *bla*_{CTX-M-103} foram detectadas na amostra 7ir. A amostra 7ar apresentou o gene *bla*_{CTX-M-55} e as amostras C1GAC6 e 4ir apresentaram o gene *bla*_{CTX-M-8}. As amostras 7ir e 7ar não foram testadas por PCR para confirmação e a família *bla*_{CTX-M-8} não foi abordada na PCR para confirmação.

A amostra 8af, por exemplo, se mostrou positiva para o gene *bla*_{TEM-135} de acordo com o sequenciamento. Outra confirmação através da PCR foi dada através da família *bla*_{KPC} a qual foi encontrada na amostra 2if sendo identificada como *bla*_{KPC-3} positiva pelo sequenciamento. Por outro lado, a amostra 2af na qual não foi detectado nenhum gene dessa família, apresentou um resultado positivo.

Diversas amostras apresentaram um resultado do sequenciamento positivo para diversas variantes da família *bla*_{TEM}. Porém, essas mesmas amostras não foram testadas na PCR. Outro ponto importante é que diversas variantes identificadas pelo sequenciamento não são contempladas pelas reações de PCR utilizadas. Além disso, em 16 diferentes amostras foi detectada a presença de genes *bla*_{TEM} através da PCR, servindo como informação adicional e complementar aos resultados obtidos por metagenômica. É importante ressaltar a sensibilidade da técnica de PCR comparativamente ao sequenciamento metagenômico, levando à essa discrepância entre os resultados. Por outro lado, as famílias gênicas *bla*_{SHV} e *bla*_{NDM} não foram detectadas por nenhuma das duas técnicas abordadas. Indicando, de fato, a ausência desses genes nas amostras do estudo.

As amostras positivas para *mcr-1* através do sequenciamento não puderam ser testadas para confirmação por PCR. Independentemente, a amostra de granja de suínos de agricultura familiar C1GSAF1 foi a única que apresentou amplificação para o gene *mcr-4*, resultado o qual não foi observado pelo sequenciamento metagenômico. Apesar disso, o sequenciamento de Sanger foi capaz de confirmar a identidade do produto. Assim sendo, a sensibilidade da técnica e até mesmo a extração de DNA ter ocorrido em dois eventos diversos podem ter ocasionado os resultados discordantes, porém complementares.

A detecção do gene *mcr-4* na amostra C1GSAF1 pode ser considerado um achado importante para a literatura científica brasileira. A detecção de tal gene, mais especificamente da variante *mcr-4.3*, foi descrita em 2020 por Martins-Sorenson e colaboradores relatando um isolado clínico de *Acinetobacter baumannii* obtido em 2008 portador do gene. Esse isolado teria sido identificado a partir do fluído cefalorraquidiano de um paciente com meningite no Brasil. A identificação deste gene em Santa Catarina se mostra pioneira e indica uma grande preocupação frente à disseminação desses elementos de resistência. Por ter sido detectado em uma granja de agricultura familiar, na qual empregam-se práticas com contato frequente entre os animais e seus cuidadores, aumentam-se as probabilidades de transferência de elementos de resistência entre os diferentes microbiomas e seus respectivos hospedeiros.

A resistência bacteriana é, de fato, uma problemática de difícil intervenção. O combate e controle de infecções *in vivo* se torna uma missão complexa por contar com um arsenal limitado de fármacos. Assim, o conhecimento relacionado à circulação de elementos que conferem resistência se mostra essencial na busca por novas estratégias de controle e vigilância sanitária. Reformas estruturais nos sistemas sanitários de tratamentos de dejetos de origem humana e animal resultaram na melhora da qualidade de vida e redução de infecções. O livro “O mapa fantasma: uma epidemia letal e a epopeia científica que transformou nossas cidades” de Steven Johnson (2006) ilustra a necessidade que grandes aglomerados urbanos têm de se reinventar quando uma epidemia, nesse caso de cólera, surge. Repensar e reestruturar o sistema sanitário presente nas maiores metrópoles é imprescindível para evitar a contaminação e transmissão de diferentes agentes patogênicos. O médico epidemiologista John Snow, um dos protagonistas presentes no livro, foi uma figura pivô no combate à cólera e capaz de desmistificar a teoria miasmática, a qual acreditava na poluição emanada pela putrefação de matéria orgânica como a principal causa de doenças. Anos depois a teoria microbiana se consolida e integra a microbiologia moderna, estabelecendo conceitos relacionados à transmissão de doenças (KARAMANOU *et al.*, 2012).

Algumas estratégias aplicadas para a diminuição da disseminação dos genes de resistência aos antimicrobianos tiveram consequências positivas relatadas na

literatura. O uso de fagos conta com estudos de caso favoráveis à sua aplicação contínua na medicina e, até mesmo, no ambiente (DEDRICK *et al.*, 2019). O Transplante de Microbiota Fecal (TMF) é reconhecido por seus benefícios relacionados à diminuição da resistência aos antimicrobianos quando aplicado a correção da disbiose humana (OOIJEVAAR *et al.*, 2018). A sanitização de ambientes também se mostra eficaz na redução de patógenos e, conseqüentemente, na diminuição no resistoma detectado em superfícies. Muitas vezes, o uso de ativos biológicos é relatado como benéfico para o mesmo fim (CASELLI *et al.*, 2016). A identificação de surtos e a vigilância hospitalar apontam redução e maior controle sobre as infecções nosocomiais (CANTÓN; GIJÓN; RUIZ-GARBAJOSA, 2020). Por fim, alguns países proíbem o uso de antimicrobianos em animais como promotor de crescimento. O resultado é a redução na resistência ao longo dos anos (LIM *et al.*, 2018).

Considerando o exposto anteriormente, percebe-se a multiplicidade de conseqüências diretas e indiretas relacionadas ao uso de antimicrobianos. Observa-se, assim, em Santa Catarina uma grande variedade de genes de resistência aos antimicrobianos circulantes, destacando-se aqueles relacionados às tetraciclínas, aos aminoglicosídeos e genes que conferem resistência a mais de uma classe de antimicrobianos. Foi possível avaliar grandes diferenças entre os resistomas encontrados nos ambientes hospitalar e de granjas baseado na prevalência de genes que conferem resistências a determinadas classes, como os beta-lactâmicos e fluoroquinolonas que apresentaram maior predominância dentre os pacientes.

8 CONCLUSÃO

Foi possível concluir que:

- 1) Os diferentes ambientes amostrados apresentam diferentes perfis de resistoma quanto a sua composição.
- 2) Os diferentes sistemas de produção animal e o ambiente hospitalar influenciam a diversidade do resistoma

- 3) O sequenciamento por nanoporos e a análise metagenômica apresentam um grande potencial como ferramentas eficientes e rápidas para a detecção de genes de resistência, tanto no ambiente hospitalar, quanto animal. Podendo fazer desta plataforma uma grande aliada a programas de vigilância sanitária no Estado de Santa Catarina.

Dessa forma, pode-se aceitar a hipótese estabelecida inicialmente. Foi possível verificar um contingente de genes de resistência comum aos diversos ambientes estudados, sendo composto majoritariamente por genes e mutações gênicas que conferem resistência aos aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclinas e que conferem fenótipo MLS_B.

9 PERSPECTIVAS

Diversos pontos precisarão ser revistos e complementados ao dar continuidade ao projeto geral. Inicialmente, neste trabalho não foram consideradas a quantidade em massa das amostras submetidas à extração de DNA, fator o qual poderia ser utilizado para determinar a concentração de elementos de resistência. Essa relação não seria possível de ser realizada com as amostras de granjas de suínos e aves devido a composição desconhecida relativa ao manuseio desses ambientes. Além disso, seria difícil atribuir a um único indivíduo, como ocorre com as amostras de pacientes, mas a um conjunto de indivíduos presentes na mesma granja.

São necessários outros ensaios capazes de confirmar e complementar os resultados aqui discutidos. Análises de microbiologia básica através do uso de técnicas de isolamento bacteriano, identificação taxonômica, teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) estão sendo realizadas em paralelo pelo nosso grupo de pesquisa. Estudos de bioinformática mais profundos capazes de indicar a proveniência taxonômica dos genes de resistência encontrados e que possam ser correlacionados com a abundância detectada nessas comunidades microbiológicas podem ser ferramentas de importante valor para melhor caracterização dos

resistomas presentes em diferentes ambientes. Além disso, o estudo do mobiloma, ou seja, a identificação dos elementos genéticos responsáveis pelo carreamento dos ARGs poderia auxiliar na compreensão sobre como alguns genes podem circular entre os diversos ambientes. Complementarmente, a análise de risco, seguindo a metodologia de Monte Carlo pode ser crucial para a construção de um modelo de circulação de MRAs e ARGs no estado de Santa Catarina, sendo esse o objetivo principal do projeto-chapéu no qual esse trabalho está inserido.

Os dados de metagenômica, por possuírem uma grande quantidade de informações relevantes acerca dos ecossistemas microbiológicos presentes nas amostras, poderiam ser utilizados como objeto de estudo também para a identificação de genes de resistência a outros fatores, como os metais pesados. A detecção de regiões CRISPR e anti-CRISPR presentes no metagenoma pode indicar a atividade de defesa de bactérias contra fagos. Essas abordagens poderiam ser utilizadas para melhor caracterizar e compreender os diversos mecanismos de resistência bacteriana contra diferentes fatores.

10 REFERÊNCIAS

ADAK, Atanu; KHAN, Mojibur R.. An insight into gut microbiota and its functionalities. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 76, n. 3, p. 473-493, 13 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>.

ALEKSHUN, Michael N.; LEVY, Stuart B.. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **Cell**, [S.L.], v. 128, n. 6, p. 1037-1050, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>.

ALVES, Jorianne; DIAS, Larissa; MATEUS, Jackeline; MARQUES, Joana; GRAÇAS, Diego; RAMOS, Rommel; SELDIN, Lucy; HENRIQUES, Isabel; SILVA, Artur; FOLADOR, Adriana. Resistome in Lake Bolonha, Brazilian Amazon: identification of genes related to resistance to broad-spectrum antibiotics. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, p. 1-13, 4 fev. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00067>.

ANDERSSON, Dan I.; HUGHES, Diarmaid. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 7, p. 465-478, 27 maio 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3270>.

ANGELAKIS, Emmanouil. Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. **Microbial Pathogenesis**, [S.L.], v. 106, p. 162-170, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.11.002>.

ANGELIS, Giulia de; GIACOMO, Paola del; POSTERARO, Brunella; SANGUINETTI, Maurizio; TUMBARELLO, Mario. Molecular Mechanisms,

Epidemiology, and Clinical Importance of β -Lactam Resistance in Enterobacteriaceae. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 14, p. 5090, 18 jul. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21145090>.

BAQUERO, Fernando; COQUE, Teresa M.; MARTÍNEZ, José-Luis; ARACIL-GISBERT, Sonia; LANZA, Val F.. Gene Transmission in the One Health Microbiosphere and the Channels of Antimicrobial Resistance. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, n. -, p. 1-14, 17 dez. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.02892>.

BARKO, P.C.; MCMICHAEL, M.A.; SWANSON, K.s.; WILLIAMS, D.A.. The Gastrointestinal Microbiome: a review. **Journal Of Veterinary Internal Medicine**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 9-25, 24 nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jvim.14875>.

BAYM, M.; LIEBERMAN, T. D.; KELSIC, E. D.; CHAIT, R.; GROSS, R.; YELIN, I.; KISHONY, R.. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. **Science**, [S.L.], v. 353, n. 6304, p. 1147-1151, 8 set. 2016. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aag0822>.

BERGLUND, Fanny; BÖHM, Maria-Elisabeth; MARTINSSON, Anton; EBMEYER, Stefan; ÖSTERLUND, Tobias; JOHNNING, Anna; LARSSON, D. G. Joakim; KRISTIANSSON, Erik. Comprehensive screening of genomic and metagenomic data reveals a large diversity of tetracycline resistance genes. **Microbial Genomics**, [S.L.], v. 6, n. 11, p. 1-14, 1 nov. 2020. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mgen.0.000455>.

BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A.. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 1-37, 26 fev. 2020. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00047-19>.

BUTAYE, Patrick; DEVRIESE, Luc A.; HAESEBROUCK, Freddy. Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed: effects of less well known antibiotics on

gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 175-188, abr. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.16.2.175-188.2003>.

CANTÓN, Rafael; GIJÓN, Desirée; RUIZ-GARBAJOSA, Patricia. Antimicrobial resistance in ICUs: an update in the light of the covid-19 pandemic. **Current Opinion In Critical Care**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 433-441, 28 jul. 2020. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mcc.0000000000000755>.

CASELLI, Elisabetta; D'ACCOLTI, Maria; VANDINI, Alberta; LANZONI, Luca; CAMERADA, Maria Teresa; COCCAGNA, Maddalena; BRANCHINI, Alessio; ANTONIOLI, Paola; BALBONI, Pier Giorgio; LUCA, Dario di. Impact of a Probiotic-Based Cleaning Intervention on the Microbiota Ecosystem of the Hospital Surfaces: focus on the resistome remodulation. **Plos One**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 1-19, 17 fev. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0148857>.

CAVALCANTI, Alexandre B.; ZAMPIERI, Fernando G.; ROSA, Regis G.; AZEVEDO, Luciano C.P.; VEIGA, Viviane C.; AVEZUM, Alvaro; DAMIANI, Lucas P.; MARCADENTI, Aline; KAWANO-DOURADO, Letícia; LISBOA, Thiago. Hydroxychloroquine with or without Azithromycin in Mild-to-Moderate Covid-19. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 383, n. 21, p. 2041-2052, 19 nov. 2020. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2019014>.

CCIH-HU. **Comissão de Controle de Infecção Hospitalar**. Disponível em: <http://www.hu.ufsc.br/setores/ccih/>. Acesso em: 05 jun. 2021.

CHE, You; XIA, Yu; LIU, Lei; LI, An-Dong; YANG, Yu; ZHANG, Tong. Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing. **Microbiome**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-13, 21 mar. 2019.

Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1186/s40168-019-0663-0>.

CHEN, XI; LIAO, Binyou; CHENG, Lei; PENG, Xian; XU, Xin; LI, Yuqing; HU, Tao; LI, Jiyao; ZHOU, Xuedong; REN, Biao. The microbial coinfection in COVID-19. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 104, n. 18, p. 7777-7785, 11 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-020-10814-6>.

CHNG, Kern Rei; LI, Chenhao; BERTRAND, Denis; NG, Amanda Hui Qi; KWAH, Junmei Samantha; LOW, Hwee Meng; TONG, Chengxuan; NATRAJAN, Maanasa; ZHANG, Michael Hongjie. Cartography of opportunistic pathogens and antibiotic resistance genes in a tertiary hospital environment. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 941-951, jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0894-4>.

CHO, Ilseung; YAMANISHI, Shingo; COX, Laura; METHÉ, Barbara A.; ZAVADIL, Jiri; LI, Kelvin; GAO, Zhan; MAHANA, Douglas; RAJU, Kartik; TEITLER, Isabel. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. **Nature**, [S.L.], v. 488, n. 7413, p. 621-626, ago. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11400>.

CISAR, Cindy R; AKIYAMA, Tatsuya; HATLEY, Jonathan; ARNEY, Lori; KEZUNOVIC, Nebojsa; OWEN, Daniel. PCR Assay Specific for Chicken Feces. **Proceedings Of The Oklahoma Academy Of Science**, [S.I.], n. 90, p. 50-65, 2010.

DALLENNE, Caroline; COSTA, Anaëlle da; DECREÉ, Dominique; FAVIER, Christine; ARLET, Guillaume. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 65, n. 3, p. 490-495, 12 jan. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp498>.

DAVIES, Peter R.; SINGER, Randall S.. Antimicrobial use in wean to market pigs in the United States assessed via voluntary sharing of proprietary data. **Zoonoses And Public Health**, [S.L.], v. 67, n. 1, p. 6-21, nov. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/zph.12760>.

DEDRICK, Rebekah M.; GUERRERO-BUSTAMANTE, Carlos A.; GARLENA, Rebecca A.; RUSSELL, Daniel A.; FORD, Katrina; HARRIS, Kathryn; GILMOUR, Kimberly C.; SOOTHILL, James; JACOBS-SERA, Deborah; SCHOOLEY, Robert T.. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant Mycobacterium abscessus. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 25, n. 5, p. 730-733, maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>.

DEVIRGILIIS, Chiara; BARILE, Simona; PEROZZI, Giuditta. Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota. **Genes & Nutrition**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 275-284, 28 abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12263-011-0226-x>.

DHARIWAL, Achal; JUNGES, Roger; CHEN, Tsute; PETERSEN, Fernanda C. ResistoXplorer: a web-based tool for visual, statistical and exploratory data analysis of resistome data. **Nar Genomics And Bioinformatics**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-14, 6 jan. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nargab/lqab018>.

EWING, B.GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res**, v.8, n.3, p.186-194. 1998.

EWING, B., et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res**, v.8, n.3, p.175-185. 1998.

FASSARELLA, Marina; BLAAK, Ellen e; PENDERS, John; NAUTA, Arjen; SMIDT, Hauke; ZOETENDAL, Erwin G. Gut microbiome stability and resilience: elucidating

the response to perturbations in order to modulate gut health. **Gut**, [S.L.], v. 70, n. 3, p. 595-605, 13 out. 2020. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321747>.

FEßLER, Andrea T.; WANG, Yang; WU, Congming; SCHWARZ, Stefan. Mobile macrolide resistance genes in staphylococci. **Plasmid**, [S.L.], v. 99, p. 2-10, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.05.001>.

FORSBERG, K. J.; REYES, A.; WANG, B.; SELLECK, E. M.; SOMMER, M. O. A.; DANTAS, G.. The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. **Science**, [S.L.], v. 337, n. 6098, p. 1107-1111, 30 ago. 2012. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1220761>.

GALANI, Irene; NAFPLIOTI, Konstantina; ADAMOY, Panagiota; KARAIKOS, Ilias; GIAMARELLOU, Helen; SOULI, Maria. Nationwide epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Greek hospitals, with regards to plazomicin and aminoglycoside resistance. **Bmc Infectious Diseases**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-12, 15 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-019-3801-1>.

GARDY, Jennifer L.; LOMAN, Nicholas J.. Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system. **Nature Reviews Genetics**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 9-20, 13 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2017.88>.

GIEHL, Alexandre Luís; MONDARDO, Marcia. PRODUÇÃO DE FRANGOS EM SANTA CATARINA: UMA ANÁLISE DA REGIONALIZAÇÃO DOS ABATES. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 58., 2020, Foz do Iguaçu. Anais [...] . Foz do Iguaçu: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2020. p. 1-4.

GIEHL, Alexandre Luís; MONDARDO, Marcia. PRODUÇÃO DE SUÍNOS EM SANTA CATARINA: UMA ANÁLISE DA REGIONALIZAÇÃO DOS ABATES (2013-2018). In: XIII ENCONTRO DE ECONOMIA CATARINENSE, 13., 2019, Criciúma. Anais [...] . Criciúma: Encontro de Economia Catarinense, 2019. p. 1-5.

GOLPARIAN, Daniel; DONÀ, Valentina; SÁNCHEZ-BUSÓ, Leonor; FOERSTER, Sunniva; HARRIS, Simon; ENDIMIANI, Andrea; LOW, Nicola; UNEMO, Magnus. Antimicrobial resistance prediction and phylogenetic analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates using the Oxford Nanopore MinION sequencer. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-12, dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-35750-4>.

GRICE, Elizabeth A.; SEGRE, Julia A.. The Human Microbiome: our second genome. **Annual Review Of Genomics And Human Genetics**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 151-170, 22 set. 2012. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genom-090711-163814>.

GRUNDMANN, Hajo; KLUGMAN, Keith P.; WALSH, Timothy; RAMON-PARDO, Pilar; SIGAUQUE, Betuel; KHAN, Wasif; LAXMINARAYAN, Ramanan; HEDDINI, Andreas; STELLING, John. A framework for global surveillance of antibiotic resistance. **Drug Resistance Updates**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 79-87, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2011.02.007>.

HE, Tao; WANG, Ran; LIU, Dejun; WALSH, Timothy R.; ZHANG, Rong; LV, Yuan; KE, Yuebin; JI, Quanjiang; WEI, Ruicheng; LIU, Zhihai. Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans. **Nature Microbiology**, [S.L.], v. 4, n. 9, p. 1450-1456, 27 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-019-0445-2>.

HERNANDO-AMADO, Sara; COQUE, Teresa M.; BAQUERO, Fernando; MARTÍNEZ, José L.. Defining and combating antibiotic resistance from One Health

and Global Health perspectives. **Nature Microbiology**, [S.L.], v. 4, n. 9, p. 1432-1442, 22 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>.

HO, Jeffery; YEOH, Yun Kit; BARUA, Nilakshi; CHEN, Zigui; LUI, Grace; WONG, Sunny H; YANG, Xiao; CHAN, Martin Cw; CHAN, Paul Ks; HAWKEY, Peter M. Systematic review of human gut resistome studies revealed variable definitions and approaches. **Gut Microbes**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1700755, 16 jan. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2019.1700755>.

HOOVER, David C.; JACOBY, George A.. Topoisomerase Inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 1-21, 22 jul. 2016. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a025320>.

HUTCHINGS, Matthew I; TRUMAN, Andrew W; WILKINSON, Barrie. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 51, p. 72-80, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.

JENSEN, Anders; VALDÓRSSON, Oskar; FRIMODT-MØLLER, Niels; HOLLINGSHEAD, Susan; KILIAN, Mogens. Commensal Streptococci Serve as a Reservoir for β -Lactam Resistance Genes in *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 59, n. 6, p. 3529-3540, 6 abr. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00429-15>.

JACOBY, George A.. ANTIMICROBIAL-RESISTANT PATHOGENS IN THE 1990S. **Annual Review Of Medicine**, [S.L.], n. 47, p. 169-79, 1996.

JERNBERG, Cecilia; LÖFMARK, Sonja; EDLUND, Charlotta; JANSSON, Janet K.. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. **Microbiology**, [S.L.], v. 156, n. 11, p. 3216-3223, 1 nov. 2010. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.040618-0>.

JOHNSON, Steven. **O mapa fantasma**. [S.l.]: Zahar, 2006

KAMATHEWATTA, Kanishka Indiwari; BUSHELL, Rhys Nathan; YOUNG, Neil David; STEVENSON, Mark Anthony; BILLMAN-JACOB, Helen; BROWNING, Glenn Francis; MARENDA, Marc Serge. Exploration of antibiotic resistance risks in a veterinary teaching hospital with Oxford Nanopore long read sequencing. **Plos One**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 1-12, 30 maio 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0217600>.

KAMPF, G.. Acquired resistance to chlorhexidine – is it time to establish an ‘antiseptic stewardship’ initiative? **Journal Of Hospital Infection**, [S.L.], v. 94, n. 3, p. 213-227, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2016.08.018>.

KARAKAN, Tarkan; OZKUL, Ceren; AKKOL, Esra Küpeli; BILICI, Saniye; SOBARZO-SÁNCHEZ, Eduardo; CAPASSO, Raffaele. Gut-Brain-Microbiota Axis: antibiotics and functional gastrointestinal disorders. **Nutrients**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 389, 27 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu13020389>.

KARANIKA, Styliani; KARANTANOS, Theodoros; ARVANITIS, Marios; GRIGORAS, Christos; MYLONAKIS, Eleftherios. Fecal Colonization With Extended-spectrum Beta-lactamase–Producing Enterobacteriaceae and Risk Factors Among Healthy Individuals: a systematic review and metaanalysis. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 63, n. 3, p. 310-318, 3 maio 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciw283>.

KHOSRAVI, Azar Dokht; JENABI, Atefeh; MONTAZERI, Effat Abbasi. Distribution of genes encoding resistance to aminoglycoside modifying enzymes in methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains. **The Kaohsiung Journal Of Medical Sciences**, [S.L.], v. 33, n. 12, p. 587-593, dez. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.kjms.2017.08.001>.

KRAUSE, Kevin M.; SERIO, Alisa W.; KANE, Timothy R.; CONNOLLY, Lynn E.. Aminoglycosides: an overview. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 1-18, jun. 2016. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>.

LAMB, Harrison J.; HAYES, Ben J.; NGUYEN, Loan T.; ROSS, Elizabeth M.. The Future of Livestock Management: a review of real-time portable sequencing applied to livestock. **Genes**, [S.L.], v. 11, n. 12, p. 1478, 9 dez. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes11121478>.

LARSSON, Anders. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 30, n. 22, p. 3276-3278, 5 ago. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>.

LAX, Simon; A GILBERT, Jack. Hospital-associated microbiota and implications for nosocomial infections. **Trends In Molecular Medicine**, [S.L.], v. 21, n. 7, p. 427-432, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2015.03.005>.

LEMON, Jamie K.; KHIL, Pavel P.; FRANK, Karen M.; DEKKER, John P.. Rapid Nanopore Sequencing of Plasmids and Resistance Gene Detection in Clinical Isolates. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 55, n. 12, p. 3530-3543, dez. 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01069-17>.

LESCAT, Mathilde; POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice. Rapid multiplex polymerase chain reaction for detection of mcr-1 to mcr-5 genes. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, [S.L.], v. 92, n. 4, p. 267-269, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.04.010>.

LEVY, Stuart B.. The Challenge of Antibiotic Resistance. **Scientific American**, [S.L.], v. 278, n. 3, p. 46-53, mar. 1998. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/scientificamerican0398-46>.

LI, Xiang; WU, Ziqi; DANG, Chenyuan; ZHANG, Miao; ZHAO, Bixi; CHENG, Zhanwen; CHEN, Liming; ZHONG, Zhenfeng; YE, Yuhui; XIA, Yu. A metagenomic-based method to study hospital air dust resistome. **Chemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 406, p. 126854, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2020.126854>.

LIM, Mi Young; CHO, Youna; RHO, Mina. Diverse Distribution of Resistomes in the Human and Environmental Microbiomes. **Current Genomics**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 701-711, 19 out. 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1389202919666180911130845>.

LIU, Yi-Yun; WANG, Yang; WALSH, Timothy R; YI, Ling-Xian; ZHANG, Rong; SPENCER, James; DOI, Yohei; TIAN, Guobao; DONG, Baolei; HUANG, Xianhui. 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**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 161-168, fev. 2016. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(15)00424-7).

LIU, Jia-Yia; DICKTER, Jana K.. Nosocomial Infections. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics Of North America**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 637-652, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.001>.

LOW, Chuen Xian; TAN, Loh Teng-Hern; MUTALIB, Nurul-Syakima Ab; PUSPARAJAH, Priya; GOH, Bey-Hing; CHAN, Kok-Gan; LETCHUMANAN, Vengadesh; LEE, Learn-Han. Unveiling the Impact of Antibiotics and Alternative Methods for Animal Husbandry: a review. **Antibiotics**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 578, 13 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics10050578>.

LU, Hengyun; GIORDANO, Francesca; NING, Zemin. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 265-279, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.004>.

MARON, Dina; SMITH, Tyler Js; NACHMAN, Keeve e. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. **Globalization And Health**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 48, 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8603-9-48>.

MARTINS-SORENSEN, Natacha; SNESRUD, Erik; XAVIER, Danilo Elias; CACCI, Luciana Camila; IAVARONE, Anthony T; MCGANN, Patrick; RILEY, Lee W; MOREIRA, Beatriz Meurer. A novel plasmid-encoded mcr-4.3 gene in a colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 75, n. 1, p. 60-64, 3 out. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkz413>.

MATHUR, Shalini; SINGH, Rameshwar. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 105, n. 3, p. 281-295, dez. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>.

MCEWEN, Scott A.; COLLIGNON, Peter J.. Antimicrobial Resistance: a one health perspective. **Antimicrobial Resistance In Bacteria From Livestock And Companion Animals**, [S.L.], p. 521-547, 1 out. 2018. American Society of Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017>.

MIRZAEI, Rasoul; GOODARZI, Pedram; ASADI, Muhammad; SOLTANI, Ayda; ALJANABI, Hussain Ali Abraham; JEDA, Ali Salimi; DASHTBIN, Shirin; JALALIFAR, Saba; MOHAMMADZADEH, Rokhsareh; TEIMOORI, Ali. Bacterial co-infections with SARS-CoV -2. **Iubmb Life**, [S.L.], v. 72, n. 10, p. 2097-2111, 8 ago. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.2356>.

MORA, Maximilian; MAHNERT, Alexander; KOSKINEN, Kaisa; PAUSAN, Manuela R.; OBERAUNER-WAPPIS, Lisa; KRAUSE, Robert; PERRAS, Alexandra K.; GORKIEWICZ, Gregor; BERG, Gabriele; MOISSL-EICHINGER, Christine.

Microorganisms in Confined Habitats: microbial monitoring and control of intensive care units, operating rooms, cleanrooms and the international space station. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, p. 1-20, 13 out. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01573>.

NAYME, K.; BARGUIGUA, A.; DIAWARA, I.; OTMANI, F. EI; ELMDAGHRI, N.; ZEROUALI, K.; TIMINOUNI, M.. Occurrence of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in Escherichia coli isolates from chicken meat. **British Poultry Science**, [S.L.], v. 60, n. 6, p. 798-801, 23 ago. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2019.1650163>.

NEUMAN, Hadar; FORSYTHE, Paul; UZAN, Atara; AVNI, Orly; KOREN, Omry. Antibiotics in early life: dysbiosis and the damage done. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 42, n. 018, p. 489-499, 25 jun. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuy018>.

OLIVEIRA, Luís Guilherme de; GATTO, Igor Renan Honorato; MECHLER-DREIBI, Marina Lopes; ALMEIDA, Henrique M. S.; SONÁLIO, Karina; STORINO, Gabriel Yuri. Achievements and Challenges of Classical Swine Fever Eradication in Brazil. **Viruses**, [S.L.], v. 12, n. 11, p. 1327, 19 nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v12111327>.

O'NEILL, C. B. J. "Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations", **Review on Antimicrobial Resistance**, 2016.

OOIJEVAAR, R.e.; TERVEER, E.M.; VERSPAGET, H.W.; KUIJPER, E.J.; KELLER, J.J.. Clinical Application and Potential of Fecal Microbiota Transplantation. **Annual Review Of Medicine**, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 335-351, 27 jan. 2019. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-med-111717-122956>.

OTSUKA, Yasunari. Potent Antibiotics Active against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. **Chemical And Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 68, n.

3, p. 182-190, 1 mar. 2020. Pharmaceutical Society of Japan.
<http://dx.doi.org/10.1248/cpb.c19-00842>.

PASCALE, Alessia; MARCHESI, Nicoletta; MARELLI, Cristina; COPPOLA, Adriana; LUZI, Livio; GOVONI, Stefano; GIUSTINA, Andrea; GAZZARUSO, Carmine. Microbiota and metabolic diseases. **Endocrine**, [S.L.], v. 61, n. 3, p. 357-371, 2 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12020-018-1605-5>.

PATEL, Sameer J.; WELLINGTON, Matthew; SHAH, Rohan M.; FERREIRA, Matthew J.. Antibiotic Stewardship in Food-producing Animals: challenges, progress, and opportunities. **Clinical Therapeutics**, [S.L.], v. 42, n. 9, p. 1649-1658, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.07.004>.

PEREIRA, Mariana Buongiorno; WALLROTH, Mikael; JONSSON, Viktor; KRISTIANSSON, Erik. Comparison of normalization methods for the analysis of metagenomic gene abundance data. **Bmc Genomics**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-17, 20 abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1186/s12864-018-4637-6>.

POIREL, Laurent; MADEC, Jean-Yves; LUPO, Agnese; SCHINK, Anne-Kathrin; KIEFFER, Nicolas; NORDMANN, Patrice; SCHWARZ, Stefan. Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 1-27, 27 jul. 2018. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>.

REDGRAVE, Liam S.; SUTTON, Sam B.; WEBBER, Mark A.; PIDDOCK, Laura J.V.. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 22, n. 8, p. 438-445, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>.

ROBAKOWSKA, Marlena; BRONK, Marek; TYRANSKA-FOBKE, Anna; SLEZAK, Daniel; KRASZEWSKI, Jakub; BALWICKI, Łukasz. Patient Safety Related to Microbiological Contamination of the Environment of a Multi-Profile Clinical Hospital. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S.L.], v. 18, p. 3844, abr. 2021. MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph18073844>.

ROWE, Will P. M.; BAKER-AUSTIN, Craig; VERNER-JEFFREYS, David W.; RYAN, Jim J.; MICALLEF, Christianne; MASKELL, Duncan J.; PEARCE, Gareth P. Overexpression of antibiotic resistance genes in hospital effluents over time. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 72, n. 6, p. 1617-1623, 8 fev. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkx017>.

SALEEM, Ali F.; ALLANA, Ahreen; HALE, Lauren; DIAZ, Alondra; SALINAS, Raul; SALINAS, Cristina; QURESHI, Shahida M.; HOTWANI, Aneeta; RAHMAN, Najeeb; KHAN, Asia. The Gut of Healthy Infants in the Community as a Reservoir of ESBL and Carbapenemase-Producing Bacteria. **Antibiotics**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 286, 27 maio 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics9060286>.

SCHMIDT, Jonas; BLESSING, Frithjof; FIMPLER, Lea; WENZEL, Folker. Nanopore Sequencing in a Clinical Routine Laboratory: challenges and opportunities. **Clinical Laboratory**, [S.L.], v. 66, n. 06/2020, p. 1, 2020. Clinical Laboratory Publications. <http://dx.doi.org/10.7754/clin.lab.2019.191114>.

SINGER, Randall S.; PORTER, Leah J.; SCHRAG, Nora F. D.; DAVIES, Peter R.; APLEY, Michael D.; BJORK, Kathe. Estimates of on-farm antimicrobial usage in broiler chicken production in the United States, 2013–2017. **Zoonoses And Public Health**, [S.L.], v. 67, n. 1, p. 22-35, nov. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/zph.12764>.

SULTANA, Janet; CUTRONEO, Paola Maria; CRISAFULLI, Salvatore; PUGLISI, Gabriele; CARAMORI, Gaetano; TRIFIRÒ, Gianluca. Azithromycin in COVID-19 Patients: pharmacological mechanism, clinical evidence and prescribing guidelines.

Drug Safety, [S.L.], v. 43, n. 8, p. 691-698, 21 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40264-020-00976-7>.

SUN, Jian; CHEN, Chong; CUI, Chao-Yue; ZHANG, Yan; LIU, Xiao; CUI, Ze-Hua; MA, Xiao-Yu; FENG, Youjun; FANG, Liang-Xing; LIAN, Xin-Lei. Plasmid-encoded tet(X) genes that confer high-level tigecycline resistance in Escherichia coli. **Nature Microbiology**, [S.L.], v. 4, n. 9, p. 1457-1464, 24 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-019-0496-4>.

SURETTE, Matthew D.; WRIGHT, Gerard D.. Lessons from the Environmental Antibiotic Resistome. **Annual Review Of Microbiology**, [S.L.], v. 71, n. 1, p. 309-329, 8 set. 2017. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093420>.

TARTARI, Daniela Cristina. **Caracterização genética da resistência aos beta-lactâmicos e às polimixinas em bactérias gram-negativas do grupo ESKAPE isoladas em hospitais de Santa Catarina**. 2020. 142 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

TAYLOR, Peter W; STAPLETON, Paul D; LUZIO, J Paul. New ways to treat bacterial infections. **Drug Discovery Today**, [S.L.], v. 7, n. 21, p. 1086-1091, nov. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1359-6446\(02\)02498-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1359-6446(02)02498-4).

THANNER, Sophie; DRISSNER, David; WALSH, Fiona. Antimicrobial Resistance in Agriculture. **Mbio**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 1-7, 4 maio 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.02227-15>.

TYRRELL, Ciara; BURGESS, Catherine M.; BRENNAN, Fiona P.; WALSH, Fiona. Antibiotic resistance in grass and soil. **Biochemical Society Transactions**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 477-486, 19 fev. 2019. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bst20180552>.

UKUHOR, Hyacinth O.. The interrelationships between antimicrobial resistance, COVID-19, past, and future pandemics. **Journal Of Infection And Public Health**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 53-60, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2020.10.018>.

URBAN, Lara; HOLZER, Andre; BARONAS, J Jotautas; HALL, Michael B; BRAEUNINGER-WEIMER, Philipp; SCHERM, Michael J; KUNZ, Daniel J; PERERA, Surangi N; MARTIN-HERRANZ, Daniel e; TIPPER, Edward T. Freshwater monitoring by nanopore sequencing. **Elife**, [S.L.], v. 10, p. 1-27, 19 jan. 2021. ELife Sciences Publications, Ltd. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.61504>.

VERLICCHI, Paola. Trends, new insights and perspectives in the treatment of hospital effluents. **Current Opinion In Environmental Science & Health**, [S.L.], v. 19, p. 100217, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coesh.2020.10.005>.

VERMA, Jyoti; BAG, Satyabrata; SAHA, Bipasa; KUMAR, Pawan; GHOSH, Tarini Shankar; DAYAL, Mayanka; SENAPATI, Tarosi; MEHRA, Seema; DEY, Prasanta; DESIGAMANI, Anbumani. Genomic plasticity associated with antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae*. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 116, n. 13, p. 6226-6231, 13 mar. 2019. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1900141116>.

WANG, Yue; LU, Ji; ENGELSTÄDTER, Jan; ZHANG, Shuai; DING, Pengbo; MAO, Likai; YUAN, Zhiguo; BOND, Philip L.; GUO, Jianhua. Non-antibiotic pharmaceuticals enhance the transmission of exogenous antibiotic resistance genes through bacterial transformation. **The ISME Journal**, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 2179-2196, 18 maio 2020a. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41396-020-0679-2>.

WANG, Bohui; LUO, Yulong; WANG, Yu; WANG, Debao; HOU, Yanru; YAO, Duo; TIAN, Jianjun; JIN, Ye. Rumen bacteria and meat fatty acid composition of Sunit sheep reared under different feeding regimens in China. **Journal Of The Science**

Of Food And Agriculture, [S.L.], v. 101, n. 3, p. 1100-1110, 15 set. 2020b. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.10720>.

WANG, Cheng; HU, Ruiwen; STRONG, P.J.; ZHUANG, Wei; HUANG, Weiming; LUO, Zhiwen; YAN, Qingyun; HE, Zhili; SHU, Longfei. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens along the soil–mangrove root continuum. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 408, p. 124985, abr. 2021. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124985>.

WEGENER, Henrik C. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 439-445, out. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2003.09.009>.

WILLMS, Inka Marie; KAMRAN, Aysha; AßMANN, Nils Frederik; KRONE, Denis; BOLZ, Simon Henning; FIEDLER, Fabian; NACKE, Heiko. Discovery of Novel Antibiotic Resistance Determinants in Forest and Grassland Soil Metagenomes. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 1-11, 7 mar. 2019. Frontiers Media SA.
<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00460>.

XIONG, Wenguang; SUN, Yongxue; ZENG, Zhenling. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 25, n. 19, p. 18377-18384, 25 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-1852-2>.

YAZDANKHAH, Siamak; RUDI, Knut; BERNHOFT, Aksel. Zinc and copper in animal feed – development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. **Microbial Ecology In Health & Disease**, [S.L.], v. 25, p. 1-7, 26 set. 2014. Co-Action Publishing. <http://dx.doi.org/10.3402/mehd.v25.25862>.

YU, Zhigang; WANG, Yue; LU, Ji; BOND, Philip L.; GUO, Jianhua. Nonnutritive sweeteners can promote the dissemination of antibiotic resistance through

conjugative gene transfer. **The Isme Journal**, [S.L.], p. 1-14, 15 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41396-021-00909-x>.

ZEINELDIN, Mohamed; ALDRIDGE, Brian; LOWE, James. Antimicrobial Effects on Swine Gastrointestinal Microbiota and Their Accompanying Antibiotic Resistome. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 1-14, 15 maio 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01035>.

ZHANG, Yu-Jie; LI, Sha; GAN, Ren-You; ZHOU, Tong; XU, Dong-Ping; LI, Hua-Bin. Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 16, n. 12, p. 7493-7519, 2 abr. 2015a. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms16047493>.

ZHANG, Chi; XIU, Leshan; LI, Yamei; SUN, Liying; LI, Yizhun; ZENG, Yaling; WANG, Feng; PENG, Junping. Multiplex PCR and Nanopore Sequencing of Genes Associated with Antimicrobial Resistance in Neisseria gonorrhoeae Directly from Clinical Samples. **Clinical Chemistry**, [S.L.], v. 67, n. 4, p. 610-620, 26 dez. 2020b. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/clinchem/hvaa306>.

ZHU, Xiaojian; YAN, Shanshan; YUAN, Fenghua; WAN, Shaogui. The Applications of Nanopore Sequencing Technology in Pathogenic Microorganism Detection. **Canadian Journal Of Infectious Diseases And Medical Microbiology**, [S.L.], v. 2020, p. 1-8, 31 dez. 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/6675206>.

11 APÊNDICES

APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC
 Centro de Ciências da Saúde - CCS
 Centro de Ciências Biológicas - CCB
 Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC
 Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima Trindade
 CEP: 88.040-900 – Florianópolis – SC



ANEXO 1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES

Título do Projeto: Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambientes hospitalares e de criação animal.

Você está sendo convidado a participar como voluntário do trabalho de pesquisa: *Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambientes hospitalares e de criação animal*. Estamos consultando você sobre a possibilidade de utilização de *swabs* de mãos, *swabs* nasais e amostras de fezes, previamente coletados para a pesquisa de bactérias e genes de resistência antimicrobiana, frente a este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que é também um pedido de autorização para o uso de amostras biológicas neste projeto de pesquisa.

Para você decidir se gostaria de participar e autoriza o uso dessas amostras nas investigações propostas neste projeto de pesquisa, você precisa conhecer os objetivos deste projeto, os benefícios, riscos e consequências. Após receber todas as informações abaixo, você poderá fornecer o seu consentimento de participação ou não, sendo que em caso de aceite solicitaremos sua assinatura, data e local neste TCLE.

PROPÓSITO (OBJETIVOS) DO PROJETO DE PESQUISA

Devido à importância do uso de antimicrobianos (que você deve conhecer como antibióticos) na indústria animal e ao crescimento do número de microrganismos resistentes aos antibióticos (MRA) na saúde humana, neste projeto o objetivo principal é compreender o papel do ambiente hospitalar e da criação animal na ecologia da circulação de genes de resistência aos antibióticos através do estudo de genes de resistência (resistoma) empregando métodos conhecidos como metagenômica. Isso permitirá principalmente: a) compreender o papel do ambiente hospitalar e da criação animal na ecologia da circulação de resistência aos antibióticos; b) fornecer novos dados para o sistema de vigilância e análise, ampliando os locais a serem testados e fornecendo uma caracterização mais completa dos mesmos.

Para isso uma análise microbiana será realizada a partir de amostras obtidas de pacientes internados no Hospital Universitário (HU) Polydoro Ernani de São Thiago oriundos do oeste do estado de Santa Catarina, um dos seus familiares, sistemas de transporte desses indivíduos e suas casas. Em paralelo, oito granjas de suínos e oito granjas de aves de corte no oeste de Santa Catarina (representando mais de 20.000 suínos e 400.000 aves) participarão do estudo através de amostras obtidas dos albergues dos animais, do sistema de drenagem das granjas e dos cuidadores dos animais dessas granjas.

PROCEDIMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

Para o caso específico deste TCLE serão visitados pacientes em internação atual no HU provenientes do oeste de Santa Catarina para apresentar o projeto intitulado “*Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambientes hospitalares e de criação animal*”, convidando tais sujeitos a participarem como voluntários neste trabalho de pesquisa. Os sujeitos receberão todas as informações sobre este projeto. Uma vez aceita sua participação, será realizada a coleta de *swabs* e fezes em duas ocasiões: no momento da internação e na alta. Os *swabs* serão coletados a partir das narinas e do reto (somente no caso de não ser possível a coleta de fezes). Estas amostras consistem no uso de um dispositivo parecido a um cotonete que será colocado em contato com a superfície de suas narinas ou reto. Através de movimentos circulares e de ir e vir serão coletadas as amostras citadas. Adicionalmente, será solicitada também uma amostra de fezes obtida de forma espontânea em frasco específico para tal procedimento e fornecido pela equipe de pesquisa. Finalmente, uma amostra de *swab* será coletada da casa do paciente aos 3 meses da alta, sendo ela coletada do sistema de drenagem da pia da cozinha. Os procedimentos não produzirão nenhum tipo de dor, mas podem apresentar algum desconforto, e as amostras coletadas serão codificadas visando o sigilo do nome do doador das amostras. As amostras coletadas servirão para análises de caracterização dos microrganismos presentes nesses locais anatômicos, realizados através de técnicas conhecidas como metagenômica e técnicas de cultura de microrganismos conhecidas como microbiológicas. Uma amostra adicional de cada tipo e local coletado servirá para formar um biorepositório, o qual está explicitado na continuação.

BIORREPOSITÓRIO

Devido a que as técnicas a serem empregadas nas análises descritas são dispendiosas, sendo os procedimentos dessas análises constantemente melhorados pela comunidade científica, e que o projeto envolve uma logística também dispendiosa, está planejado a formação de um biorrepositório com amostras coletadas dos indivíduos participantes. Esse biorrepositório consiste num conjunto de amostras que são guardadas pelos pesquisadores com a finalidade de uso durante o presente projeto de pesquisa mas também com a possibilidade de uso em futuros projetos. Durante todo o tempo de existência do biorrepositório ele será de responsabilidade da Universidade Federal de Santa Catarina e gerenciado pelos pesquisadores responsáveis do presente projeto (citados abaixo). A assinatura do presente TCLE permitirá o uso das suas amostras para a confecção desse biorrepositório e uso das amostras durante a execução do presente projeto. Caso esse biorrepositório seja considerado para uso em projetos futuros, tais projetos deverão ser aprovados primeiro pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da UFSC e nacional (se necessário) e posteriormente, você será contatado para ser apresentado a essas novas pesquisas, decidir confirmar ou não a sua participação, e permitir ou não o uso dessas amostras já colhidas.

RISCOS

Toda pesquisa com seres humanos tem alguma possibilidade de risco. Mas, como não está previsto nenhum exame ou procedimento invasivo além dos *swabs* nasais e retais neste projeto de pesquisa, então, não estão previstos riscos imediatos com a sua participação além de, tipicamente, algum grau baixo de desconforto durante a realização do *swab* nasal e/ou retal. As amostras coletadas servirão para as análises metagenômicas e microbiológicas, as quais serão armazenadas de forma sigilosa. Porém, mesmo que mínimo, orientamos da possibilidade de risco da quebra de sigilo, mediante situação específica, o qual será evitado através do acesso restrito à base de dados e a não identificação dos pacientes nas publicações e, caso ocorra, serão tratados em termos legais, pelos pesquisadores.

CUSTOS

É necessário esclarecer que você não terá quaisquer custos ou forma de pagamento por autorizar a participação neste projeto de pesquisa e, caso isso venha a ocorrer de forma extraordinária e inesperada, você será ressarcido em termos legais, por esta pesquisadora. Se ocorrer algum prejuízo material ou imaterial decorrente da pesquisa, você poderá solicitar indenização de acordo com a legislação vigente. Ainda assim, a pesquisadora compromete-se com o cumprimento das exigências contidas nos itens IV.3 e IV.4 da referida resolução que rege esse termo. A sua participação neste projeto de pesquisa é voluntária, você deve se sentir confortável a desistir da pesquisa a qualquer momento, sem nenhum risco de prejudicar seu atendimento ou sofrer alguma penalidade ou privilégio.

SIGILO E CONFIDENCIALIDADE

A equipe da pesquisa afirma a você que serão aplicados todos os procedimentos necessários para manter o SIGILO E CONFIDENCIALIDADE dos seus dados pessoais como participante da pesquisa assim como dos resultados obtidos com a análise das suas amostras. Todas as informações deste projeto de pesquisa serão confidenciais, em nenhum momento durante o desenvolvimento desta pesquisa você será identificado (a). O seu nome não será divulgado em nenhuma circunstância. Para manter esta confidencialidade, a equipe do pesquisador responsável arquivará uma via deste TCLE assinado em sigilo absoluto.

BASES DA PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA (direito a recusa ou abandono)

É importante que você saiba que a sua participação neste projeto de pesquisa é completamente voluntária. Você pode recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo algum para você. Para isso, basta você entrar em contato com o pesquisador desse estudo, conforme nome e contatos a continuação.

DEVOLUTIVA DE RESULTADOS

Informamos que os resultados da pesquisa serão tornados públicos por meio de publicação mediante relatórios, artigos, apresentações em eventos científicos e/ou divulgação de outra natureza. Reiteramos que em todas as publicações ou divulgações, serão feitas mantendo o sigilo e a confidencialidade dos dados referentes à identificação dos participantes da pesquisa.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Você também tem todo o tempo necessário que precisar, e quiser, para ler e analisar este TCLE. A pessoa responsável por explicar e obter as assinaturas neste documento, e que lhe explicou claramente o conteúdo destas informações, também se coloca à disposição para responder todas as suas perguntas sempre que precisar e tiver novas dúvidas. Você também tem a liberdade de contatar os pesquisadores responsáveis do projeto de pesquisa toda vez que sentir necessário.

Como garantia, este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será impresso em duas vias, sendo que você ficará com posse de uma, assinada e rubricada pelos pesquisadores. Guarde sua via, pois esta lhe fornece informações de contato e garante seus direitos como participante na pesquisa. Para finalizar, declaro que toda esta pesquisa está adequada com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde sob o nº 466, de 12 de dezembro de 2012, que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

DADOS DOS PESQUISADORES RESPONSÁVEIS PELO PROJETO DE PESQUISA:

Nome completo: Thaís Cristine Marques Sincero

Professora Pesquisadora, Microbiologista Celular e Molecular

Doc.de Identificação: 024.292.249-09

Endereço completo: Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade. Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde

Endereço de email: thais.sincero@ufsc.br

Telefones: (48) 3721-3474 / 999192240

Nome completo: Carlos Rodrigo Zárate Bladés

Professor Pesquisador, Imunologista Celular e Molecular

Doc.de Identificação: V294677-C / 224.653.348-16

Endereço completo: Setor F, Bloco A, Depto de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, MIP; Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade.

Endereço de email: zarate.blades@ufsc.br

Telefones: (48) 3721-5210

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) – O CEPSH é um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo, vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina, mas independente na tomada de decisões, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Você pode contatar o CEPSH no seguinte endereço: Universidade Federal de Santa Catarina Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), Horários: 10 às 12h e 16 às 18h, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401 – Trindade, Florianópolis/SC, CEP: 88.040- 400, Contato: (48) 3721-6094 cep.propesq@contato.ufsc.br

IDENTIFICAÇÃO E CONSENTIMENTO DO VOLUNTÁRIO:

Nome completo _____
 Doc. de Identificação _____

IDENTIFICAÇÃO E ASSENTIMENTO/ANUÊNCIA DE PARTICIPANTE VULNERÁVEL:

(Quando se tratar de população vulnerável)

Nome completo (ou outra manifestação para identidade) _____
 Doc. de Identificação (se for o caso) _____

IDENTIFICAÇÃO E AUTORIZAÇÃO DO RESPONSÁVEL LEGAL:

(Quando se tratar de população vulnerável)

Nome completo _____
 Doc. de Identificação _____
 Tipo de representação: _____

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO:

“Declaro que, em __/__/__, concordei em participar, na qualidade de participante do projeto de pesquisa intitulado *“Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambientes hospitalares e de criação animal”*, após estar devidamente informado sobre os objetivos, as finalidades do estudo e os termos de minha participação assino o presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias, que serão assinadas também pelo pesquisador responsável pelo projeto, sendo que uma cópia se destina a mim (participante) e a outra ao pesquisador.”

“As informações fornecidas aos pesquisadores serão utilizadas na exata medida dos objetivos e finalidades do projeto de pesquisa, sendo que minha identificação será mantida em sigilo e sobre a responsabilidade dos proponentes do projeto.”

“Não receberei nenhuma remuneração e não terei qualquer ônus financeiro (despesas) em função do meu consentimento espontâneo em participar do presente projeto de pesquisa.”

“Declaro que estou ciente que parte das amostras coletadas servirão para a formação de um biorrepositório que ficará sob responsabilidade da UFSC e gerenciamento dos pesquisadores responsáveis da pesquisa. As amostras desse biorrepositório poderão ser empregadas para os fins do presente projeto de pesquisa e com possibilidade de serem usadas em projetos futuros. Sendo este último o caso, eu serei contatado para conhecer tais pesquisas novas e decidir ou não minha participação e uso ou não das amostras desse biorrepositório formado.”

“Independentemente deste consentimento, fica assegurado meu direito a retirar-me da pesquisa em qualquer momento e por qualquer motivo, sendo que para isso comunicarei minha decisão a um dos proponentes do projeto acima citados.”

Assinatura do voluntário

Assinado de forma digital por Thais
 Cristine Marques Sincero:02429224909
 Dados: 2019.08.21 14:24:05 -03'00'

Assinatura do Pesquisador (Thais Cristine Marques Sincero)

Florianópolis, _____ de _____ de 2019.

APÊNDICE B: Alinhamento múltiplo a partir do sequenciamento de *bla*_{CTX-M-1}

Código de Acesso	Variante	Max Score	Total Score	Cobertura	E value	Identidade	Tamanho (pb)
NG_048897.1	CTX-M-1	320	320	99%	2,00E-90	98.35%	950
NG_048979.1	CTX-M-3	331	331	99%	1,00E-93	99.45%	879
NG_048913.1	CTX-M-12	326	326	99%	5,00E-92	99.30%	879
NG_048935.1	CTX-M-15	337	337	99%	2,00E-95	100%	980
NG_048971.1	CTX-M-22	331	331	99%	1,00E-93	99.45%	891
NG_048972.1	CTX-M-23	326	326	99%	5,00E-92	99.30%	950
NG_048977.1	CTX-M-28	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048978.1	CTX-M-29	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048983.1	CTX-M-33	337	337	99%	2,00E-95	100%	908
NG_048993.1	CTX-M-42	331	331	99%	1,00E-93	99.45%	979
NG_049003.1	CTX-M-52	331	331	99%	1,00E-93	99.45%	909
NG_049005.1	CTX-M-54	331	331	99%	1,00E-93	99.45%	1076
NG_049006.1	CTX-M-55	337	337	99%	2,00E-95	100%	976
NG_049011.1	CTX-M-60	326	326	99%	5,00E-92	99.30%	941
NG_049013.1	CTX-M-62	326	326	99%	5,00E-92	99.30%	1076

NG_049017.1	CTX-M-66	331	331	99%	1,00E-93	99.45%	1076
NG_049020.1	CTX-M-69	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_049024.1	CTX-M-72	331	331	99%	1,00E-93	99.45%	925
NG_049031.1	CTX-M-79	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_049033.1	CTX-M-80	331	331	99%	1,00E-93	99.45%	876
NG_049035.1	CTX-M-82	337	337	99%	2,00E-95	100%	993
NG_049050.1	CTX-M-96	331	331	99%	1,00E-93	99.45%	876
NG_048900.1	CTX-M-101	337	337	99%	2,00E-95	100%	1076
NG_048902.1	CTX-M-103	331	331	99%	1,00E-93	99.45%	950
NG_048909.1	CTX-M-114	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048911.1	CTX-M-116	331	331	99%	1,00E-93	99.45%	976
NG_048912.1	CTX-M-117	337	337	99%	2,00E-95	100%	1076
NG_048924.1	CTX-M-132	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048926.1	CTX-M-136	331	331	99%	1,00E-93	99.45%	1033
NG_048928.1	CTX-M-139	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048931.1	CTX-M-142	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048932.1	CTX-M-144	337	337	99%	2,00E-95	100%	1076

NG_048936.1	CTX-M-150	320	320	99%	2,00E-90	98.35%	876
NG_048939.1	CTX-M-155	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048940.1	CTX-M-156	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048941.1	CTX-M-157	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048947.1	CTX-M-162	331	331	99%	1,00E-93	99.45%	876
NG_048948.1	CTX-M-163	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048949.1	CTX-M-164	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048952.1	CTX-M-167	326	326	99%	5,00E-92	99.30%	876
NG_048956.1	CTX-M-170	331	331	99%	1,00E-93	99.45%	876
NG_048957.1	CTX-M-172	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048958.1	CTX-M-173	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048961.1	CTX-M-176	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048963.1	CTX-M-179	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048964.1	CTX-M-180	331	331	99%	1,00E-93	99.45%	876
NG_048965.1	CTX-M-181	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_048966.1	CTX-M-182	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
NG_050812.1	CTX-M-183	337	337	99%	2,00E-95	100%	876

NG_050813.1	CTX-M-184	337	337	99%	2,00E-95	100%	876
-------------	-----------	-----	-----	-----	----------	------	-----

APÊNDICE C: Alinhamento múltiplo a partir do sequenciamento de *bla*_{CTX-M-2}

Código de Acesso	Variante	Max Score	Total Score	Cobertura	E value	Identidade	Tamanho (pb)
NG_048968.1	CTX-M-2	379	379	99%	2,00E-108	100%	910
NG_048990.1	CTX-M-4	357	357	99%	1,00E-101	98.06%	905
NG_049000.1	CTX-M-5	363	363	99%	2,00E-103	98.54%	981
NG_049010.1	CTX-M-6	363	363	99%	2,00E-103	98.54%	905
NG_049021.1	CTX-M-7	363	363	99%	2,00E-103	98.54%	905
NG_048969.1	CTX-M-20	379	379	99%	2,00E-108	100%	976
NG_048981.1	CTX-M-31	379	379	99%	2,00E-108	100%	884
NG_048985.1	CTX-M-35	379	379	99%	2,00E-108	100%	876
NG_048994.1	CTX-M-43	379	379	99%	2,00E-108	100%	876
NG_048995.1	CTX-M-44	379	379	99%	2,00E-108	100%	1037
NG_049007.1	CTX-M-56	379	379	99%	2,00E-108	100%	876
NG_049009.1	CTX-M-59	379	379	99%	2,00E-108	100%	876
NG_049028.1	CTX-M-76	368	368	99%	4,00E-105	99.02%	1076
NG_049029.1	CTX-M-77	368	368	99%	4,00E-105	99.02%	976
NG_049046.1	CTX-M-92	379	379	99%	2,00E-108	100%	876

NG_049049.1	CTX-M-95	368	368	99%	4,00E-105	99.02%	976
NG_049051.1	CTX-M-97	379	379	99%	2,00E-108	100%	925
NG_048910.1	CTX-M-115	379	379	99%	2,00E-108	100%	1035
NG_048917.1	CTX-M-124	379	379	99%	2,00E-108	100%	876
NG_048923.1	CTX-M-131	379	379	99%	2,00E-108	100%	1076
NG_048930.1	CTX-M-141	379	379	99%	2,00E-108	100%	884
NG_048950.1	CTX-M-165	363	363	99%	2,00E-103	98.54%	876
NG_051164.1	CTX-M-171	379	379	99%	2,00E-108	100%	876

APÊNDICE D: Alinhamento múltiplo a partir do sequenciamento de *bla*_{CTX-M-9}

Código de Acesso	Variante	Max Score	Total Score	Cobertura	E value	Identidade	Tamanho (pb)
NG_049043.1	CTX-M-9	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	1076
NG_048921.1	CTX-M-13	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	976
NG_048929.1	CTX-M-14	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	1076
NG_048944.1	CTX-M-16	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_048955.1	CTX-M-17	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	1076
NG_048967.1	CTX-M-19	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_048970.1	CTX-M-21	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	976
NG_048973.1	CTX-M-24	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_048976.1	CTX-M-27	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876

NG_048988.1	CTX-M-38	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	904
NG_048996.1	CTX-M-46	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	962
NG_048997.1	CTX-M-47	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	963
NG_048998.1	CTX-M-48	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	962
NG_048999.1	CTX-M-49	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	962
NG_049001.1	CTX-M-50	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	963
NG_049002.1	CTX-M-51	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_049016.1	CTX-M-65	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	890
NG_049025.1	CTX-M-73	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	976
NG_049034.1	CTX-M-81	178	178	93%	8,00E-48	98.06%	876
NG_049036.1	CTX-M-83	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_049037.1	CTX-M-84	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_049038.1	CTX-M-85	176	176	92%	3,00E-47	98.04%	876
NG_049040.1	CTX-M-87	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	956
NG_049044.1	CTX-M-90	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_049047.1	CTX-M-93	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_049052.1	CTX-M-98	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	1076
NG_049053.1	CTX-M-99	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_048901.1	CTX-M-102	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	1076
NG_048903.1	CTX-M-104	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	1076
NG_048904.1	CTX-M-105	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	1076

NG_048907.1	CTX-M-112	176	176	92%	3,00E-47	98.04%	876
NG_048908.1	CTX-M-113	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_048915.1	CTX-M-122	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	1076
NG_048918.1	CTX-M-125	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	1032
NG_048919.1	CTX-M-126	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_048920.1	CTX-M-129	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	1076
NG_048922.1	CTX-M-130	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	1076
NG_048924.1	CTX-M-132	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_048925.1	CTX-M-134	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_048927.1	CTX-M-137	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_048933.1	CTX-M-147	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_048934.1	CTX-M-148	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	1076
NG_048943.1	CTX-M-159	176	176	92%	3,00E-47	98.04%	1076
NG_048953.1	CTX-M-168	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876
NG_048959.1	CTX-M-174	182	182	92%	6,00E-49	99.02%	876

APÊNDICE E: Alinhamento múltiplo a partir do sequenciamento de *bla*_{KPC}

Código de Acesso	Variante	Max Score	Total Score	Cobertura	E value	Identidade	Tamanho (pb)
NG_049253.1	KPC-2	224	224	99%	5,00E-62	100%	918
NG_049257.1	KPC-3	224	224	99%	5,00E-62	100%	960

NG_049258.1	KPC-4	224	224	99%	5,00E-62	100%	915
NG_049259.1	KPC-5	224	224	99%	5,00E-62	100%	1013
NG_049260.1	KPC-6	224	224	99%	5,00E-62	100%	882
NG_049261.1	KPC-7	219	219	99%	2,00E-60	99.17%	882
NG_049262.1	KPC-8	224	224	99%	5,00E-62	100%	882
NG_049243.1	KPC-10	224	224	99%	5,00E-62	100%	882
NG_049244.1	KPC-11	224	224	99%	5,00E-62	100%	882
NG_049245.1	KPC-12	224	224	99%	5,00E-62	100%	882
NG_049246.1	KPC-13	224	224	99%	5,00E-62	100%	882
NG_049247.1	KPC-14	224	224	99%	5,00E-62	100%	1076
NG_049248.1	KPC-15	224	224	99%	5,00E-62	100%	882
NG_049249.1	KPC-16	219	219	99%	2,00E-60	99.17%	882
NG_049250.1	KPC-17	224	224	99%	5,00E-62	100%	882
NG_049251.1	KPC-18	224	224	99%	5,00E-62	100%	960
NG_049252.1	KPC-19	224	224	99%	5,00E-62	100%	882
NG_049254.1	KPC-21	224	224	99%	5,00E-62	100%	882
NG_049255.1	KPC-22	224	224	99%	5,00E-62	100%	882
NG_049256.1	KPC-24	224	224	99%	5,00E-62	100%	1082
NG_051167.1	KPC-25	224	224	99%	5,00E-62	100%	888

APÊNDICE F: Alinhamento múltiplo a partir do sequenciamento de *bla*_{NDM}

Código de Acesso	Variante	Max Score	Total Score	Cobertura	E value	Identidade	Tamanho (pb)
NG_049326.1	NDM-1	340	340	96%	6,00E-97	100%	1013
NG_049334.1	NDM-2	340	340	96%	6,00E-97	100%	813
NG_049335.1	NDM-3	335	335	96%	3,00E-95	96.46%	813
NG_049336.1	NDM-4	340	340	96%	6,00E-97	100%	813
NG_049337.1	NDM-5	335	335	96%	3,00E-95	96.46%	971
NG_049338.1	NDM-6	340	340	96%	6,00E-97	100%	813
NG_049339.1	NDM-7	337	337	97%	8,00E-96	96.46%	813
NG_049340.1	NDM-8	339	339	96%	2,00E-96	100%	813
NG_049341.1	NDM-9	340	340	96%	6,00E-97	100%	1013
NG_049327.1	NDM-10	335	335	96%	3,00E-95	96.46%	813
NG_049328.1	NDM-11	340	340	96%	6,00E-97	100%	813
NG_049329.1	NDM-12	340	340	96%	6,00E-97	100%	1013
NG_049330.1	NDM-13	335	335	96%	3,00E-95	96.46%	1013
NG_049331.1	NDM-14	339	339	96%	2,00E-96	100%	1013
NG_049332.1	NDM-15	340	340	96%	6,00E-97	100%	813
NG_049333.1	NDM-16	340	340	96%	6,00E-97	100%	813

APÊNDICE G: Alinhamento múltiplo a partir do sequenciamento de *bla*_{SHV}

Código de Acesso	Variante	Max Score	Total Score	Cobertura	E value	Identidade	Tamanho (pb)
NG_049989.1	SHV-1	1206	1206	96%	0.0	99.21%	871
NG_050060.1	SHV-2	1206	1206	96%	0.0	99.21%	871
NG_050087.1	SHV-5	1201	1201	96%	0.0	99.06%	969
NG_050104.1	SHV-7	1201	1201	97%	0.0	98.38%	1041
NG_050115.1	SHV-8	1201	1201	96%	0.0	99.06%	861
NG_050000.1	SHV-11	1210	1210	96%	0.0	99.36%	1018
NG_050590.1	SHV-12	1205	1205	96%	0.0	99.21%	1061
NG_050008.1	SHV-13	1205	1205	96%	0.0	99.21%	861
NG_050047.1	SHV-18	1188	1188	97%	0.0	98.08%	983
NG_050061.1	SHV-24	1201	1201	96%	0.0	99.06%	861
NG_050062.1	SHV-25	1199	1199	96%	0.0	99.06%	861
NG_050063.1	SHV-26	1199	1199	96%	0.0	99.06%	1018
NG_050064.1	SHV-27	1205	1205	96%	0.0	99.21%	861
NG_051877.1	SHV-28	1201	1201	96%	0.0	99.06%	1017
NG_050066.1	SHV-29	1188	1188	97%	0.0	98.08%	869
NG_050069.1	SHV-30	1199	1199	97%	0.0	98.38%	946
NG_050070.1	SHV-31	1194	1194	96%	0.0	98.51%	927
NG_050071.1	SHV-32	1199	1199	96%	0.0	99.06%	1052
NG_050072.1	SHV-33	1201	1201	96%	0.0	99.06%	1049
NG_050073.1	SHV-34	1194	1194	97%	0.0	98.23%	978
NG_050074.1	SHV-35	1199	1199	96%	0.0	99.06%	861

NG_050075.1	SHV-36	1205	1205	96%	0.0	99.21%	861
NG_050076.1	SHV-37	1188	1188	96%	0.0	98.36%	861
NG_050077.1	SHV-38	1194	1194	96%	0.0	98.51%	1061
NG_050078.1	SHV-40	1194	1194	96%	0.0	98.51%	861
NG_050079.1	SHV-41	1194	1194	96%	0.0	98.51%	861
NG_050080.1	SHV-42	1194	1194	96%	0.0	98.51%	861
NG_050082.1	SHV-44	1188	1188	96%	0.0	98.36%	1061
NG_050084.1	SHV-46	1195	1195	96%	0.0	98.51%	969
NG_050085.1	SHV-48	1201	1201	96%	0.0	99.06%	861
NG_050086.1	SHV-49	1201	1201	96%	0.0	99.06%	1061
NG_050088.1	SHV-50	1194	1194	96%	0.0	98.51%	861
NG_050089.1	SHV-51	1195	1195	96%	0.0	98.51%	861
NG_050091.1	SHV-55	1190	1190	96%	0.0	98.36%	861
NG_050092.1	SHV-56	1194	1194	96%	0.0	98.51%	861
NG_050093.1	SHV-57	1201	1201	96%	0.0	99.06%	961
NG_050094.1	SHV-59	1188	1188	96%	0.0	98.36%	862
NG_050095.1	SHV-60	1199	1199	96%	0.0	99.06%	861
NG_050096.1	SHV-61	1205	1205	96%	0.0	99.21%	861
NG_050097.1	SHV-62	1195	1195	96%	0.0	98.51%	861
NG_050098.1	SHV-63	1194	1194	96%	0.0	98.51%	1033
NG_050099.1	SHV-64	1194	1194	96%	0.0	98.51%	865
NG_050100.1	SHV-65	1194	1194	96%	0.0	98.51%	865
NG_050101.1	SHV-66	1199	1199	96%	0.0	99.06%	865
NG_050102.1	SHV-67	1206	1206	96%	0.0	99.21%	865

NG_050103.1	SHV-69	1194	1194	96%	0.0	98.51%	865
NG_050105.1	SHV-70	1205	1205	96%	0.0	99.21%	861
NG_050106.1	SHV-71	1188	1188	96%	0.0	98.36%	861
NG_050108.1	SHV-73	1188	1188	96%	0.0	98.36%	874
NG_050119.1	SHV-85	1199	1199	96%	0.0	99.06%	965
NG_050120.1	SHV-86	1199	1199	96%	0.0	99.06%	861
NG_050121.1	SHV-89	1194	1194	96%	0.0	98.51%	861
NG_050123.1	SHV-92	1184	1184	96%	0.0	98.21%	861
NG_050124.1	SHV-93	1194	1194	96%	0.0	98.51%	861
NG_050125.1	SHV-94	1194	1194	96%	0.0	98.51%	861
NG_050126.1	SHV-95	1188	1188	96%	0.0	98.36%	861
NG_050127.1	SHV-96	1194	1194	96%	0.0	98.51%	861
NG_050128.1	SHV-97	1192	1192	96%	0.0	99.05%	861
NG_050129.1	SHV-98	1205	1205	96%	0.0	99.21%	861
NG_050130.1	SHV-99	1194	1194	96%	0.0	98.51%	861
NG_049990.1	SHV-100	1195	1195	96%	0.0	98.51%	900
NG_049991.1	SHV-101	1188	1188	96%	0.0	98.36%	861
NG_049992.1	SHV-102	1201	1201	96%	0.0	99.06%	861
NG_049993.1	SHV-103	1206	1206	96%	0.0	99.21%	861
NG_049994.1	SHV-104	1199	1199	96%	0.0	99.06%	861
NG_049995.1	SHV-105	1188	1188	97%	0.0	98.08%	1007
NG_049996.1	SHV-106	1195	1195	96%	0.0	98.51%	861
NG_049997.1	SHV-107	1199	1199	96%	0.0	99.06%	861

NG_049998.1	SHV-108	1195	1195	96%	0.0	98.51%	861
NG_049999.1	SHV-109	1197	1197	96%	0.0	99.20%	897
NG_050004.1	SHV-120	1201	1201	96%	0.0	99.06%	861
NG_050005.1	SHV-121	1199	1199	96%	0.0	99.06%	986
NG_050007.1	SHV-129	1205	1205	96%	0.0	99.21%	861
NG_050009.1	SHV-132	1194	1194	96%	0.0	98.51%	1061
NG_050010.1	SHV-133	1194	1194	96%	0.0	98.51%	972
NG_050011.1	SHV-134	1199	1199	96%	0.0	99.06%	861
NG_050012.1	SHV-135	1199	1199	96%	0.0	99.06%	861
NG_050013.1	SHV-137	1195	1195	96%	0.0	98.51%	1011
NG_050015.1	SHV-141	1199	1199	97%	0.0	98.38%	861
NG_050016.1	SHV-142	1199	1199	96%	0.0	99.06%	890
NG_050018.1	SHV-144	1194	1194	96%	0.0	98.51%	861
NG_050019.1	SHV-145	1199	1199	96%	0.0	99.06%	861
NG_050021.1	SHV-147	1199	1199	96%	0.0	99.06%	861

NG_050022.1	SHV-148	1205	1205	96%	0.0	99.21%	861
NG_050025.1	SHV-150	1199	1199	96%	0.0	99.06%	861
NG_050026.1	SHV-151	1205	1205	97%	0.0	98.52%	861
NG_050027.1	SHV-152	1206	1206	96%	0.0	99.21%	861
NG_050028.1	SHV-153	1206	1206	96%	0.0	99.21%	861
NG_050029.1	SHV-154	1194	1194	97%	0.0	98.23%	861
NG_050030.1	SHV-155	1205	1205	96%	0.0	99.21%	861
NG_050031.1	SHV-156	1194	1194	96%	0.0	98.51%	861
NG_050032.1	SHV-157	1194	1194	96%	0.0	98.51%	861
NG_050033.1	SHV-158	1199	1199	96%	0.0	99.06%	861
NG_050034.1	SHV-159	1199	1199	96%	0.0	99.06%	861
NG_050036.1	SHV-160	1205	1205	96%	0.0	99.21%	861
NG_050037.1	SHV-161	1212	1212	97%	0.0	99.07%	861
NG_050038.1	SHV-162	1188	1188	97%	0.0	98.08%	861
NG_050039.1	SHV-163	1199	1199	97%	0.0	98.38%	861

NG_050041.1	SHV-165	1201	1201	96%	0.0	99.06%	861
NG_050042.1	SHV-168	1194	1194	96%	0.0	98.51%	861

APÊNDICE H: Alinhamento múltiplo a partir do sequenciamento de *bla*_{TEM}

Eletoferograma	Código de Acesso	Variante	Max Score	Total Score	Cobertura	E value	Identidade	Tamanho (pb)
TEM F	NG_050145.1	TEM-1	1267	1267	94%	0.0	97.16%	1061
TEM F	NG_050227.1	TEM-19	1240	1240	94%	0.0	96.48%	961
TEM F	NG_050272.1	TEM-52	1240	1240	94%	0.0	96.48%	861
TEM F	NG_050162.1	TEM-116	1245	1245	94%	0.0	96.62%	1061
TEM F	NG_050179.1	TEM-135	1262	1262	94%	0.0	97.02%	1061
TEM F	NG_050186.1	TEM-143	1262	1262	94%	0.0	97.02%	961
TEM F	NG_050197.1	TEM-153	1245	1245	94%	0.0	96.62%	861
TEM F	NG_050216.1	TEM-177	1218	1218	94%	0.0	95.94%	861
TEM F	NG_050220.1	TEM-183	1251	1251	94%	0.0	96.75%	1010
TEM F	NG_050222.1	TEM-185	1240	1240	94%	0.0	96.48%	861
TEM F	NG_050223.1	TEM-186	1262	1262	94%	0.0	97.02%	1061
TEM F	NG_050225.1	TEM-188	1234	1234	94%	0.0	96.35%	961
TEM F	NG_050226.1	TEM-189	1245	1245	94%	0.0	96.62%	861
TEM F	NG_050228.1	TEM-190	1234	1234	94%	0.0	96.35%	861

TEM F	NG_050229.1	TEM-193	1168	1168	94%	0.0	94.73%	861
TEM F	NG_050230.1	TEM-194	1149	1149	94%	0.0	94.32%	861
TEM F	NG_050231.1	TEM-195	1195	1195	94%	0.0	95.40%	861
TEM F	NG_055646.1	TEM-196	1256	1256	94%	0.0	96.89%	889
TEM F	NG_050232.1	TEM-197	1240	1240	94%	0.0	96.48%	861
TEM F	JX050178.1	TEM-199	1223	1223	94%	0.0	96.08%	853
TEM F	NG_050236.1	TEM-201	1256	1256	93%	0.0	97.26%	861
TEM R	NG_050145.1	TEM-1	881	881	89%	0.0	98.39%	1061
TEM R	NG_050227.1	TEM-19	870	870	89%	0.0	98.39%	961
TEM R	NG_050272.1	TEM-52	870	870	89%	0.0	98.39%	861
TEM R	NG_050162.1	TEM-116	870	870	89%	0.0	98.39%	1061
TEM R	NG_050179.1	TEM-135	881	881	89%	0.0	98.39%	1061
TEM R	NG_050186.1	TEM-143	876	876	89%	0.0	98.19%	961
TEM R	NG_050197.1	TEM-153	876	876	89%	0.0	98.19%	861
TEM R	NG_050216.1	TEM-177	854	854	89%	0.0	97.38%	861
TEM R	NG_050220.1	TEM-183	876	876	89%	0.0	98.19%	1010
TEM R	NG_050222.1	TEM-185	859	859	89%	0.0	97.59%	861
TEM R	NG_050223.1	TEM-186	881	881	89%	0.0	98.39%	1061
TEM R	NG_050225.1	TEM-188	865	865	89%	0.0	98.19%	961
TEM R	NG_050226.1	TEM-189	870	870	89%	0.0	98.39%	861
TEM R	NG_050228.1	TEM-190	859	859	89%	0.0	97.59%	861

TEM R	NG_050229.1	TEM-193	821	821	89%	0.0	96.18%	861
TEM R	NG_050230.1	TEM-194	837	837	89%	0.0	97.18%	861
TEM R	NG_050231.1	TEM-195	848	848	89%	0.0	97.18%	861
TEM R	NG_055646.1	TEM-196	870	870	89%	0.0	98.39%	889
TEM R	NG_050232.1	TEM-197	870	870	89%	0.0	98.39%	861
TEM R	JX050178.1	TEM-199	854	854	89%	0.0	97.38%	853
TEM R	NG_050236.1	TEM-201	876	876	89%	0.0	98.19%	861

APÊNDICE I: Alinhamento múltiplo a partir do sequenciamento de *mcr-1*

Código de Acesso	Variante	Max Score	Total Score	Cobertura	E value	Identidade	Tamanho (pb)
NG_050417.1	MCR-1.1	924	924	100%	0.0	100%	1826
NG_051170.1	MCR-1.2	924	924	100%	0.0	100%	1826
NG_052861.1	MCR-1.3	924	924	100%	0.0	100%	1826
NG_052664.1	MCR-1.4	924	924	100%	0.0	100%	1626
NG_052663.1	MCR-1.5	924	924	100%	0.0	100%	1626
NG_052893.1	MCR-1.6	924	924	100%	0.0	100%	1826
NG_054678.1	MCR-1.7	918	918	100%	0.0	100%	1626
NG_054697.1	MCR-1.8	924	924	100%	0.0	100%	1626
NG_055582.1	MCR-1.9	924	924	100%	0.0	100%	1826
NG_055583.1	MCR-1.10	874	874	100%	0.0	98.20%	1626

NG_055784.2	MCR-1.11	924	924	100%	0.0	100%	1829
NG_056412.1	MCR-1.12	924	924	100%	0.0	100%	1626
NG_057466.1	MCR-1.13	924	924	100%	0.0	100%	1626
NG_057460.1	MCR-1.14	918	918	100%	0.0	100%	1826
NG_061610.1	MCR-1.15	918	918	100%	0.0	100%	1823
NG_064787.1	MCR-1.16	918	918	100%	0.0	100%	1626
NG_064788.1	MCR-1.17	924	924	100%	0.0	100%	1626
NG_064789.1	MCR-1.18	924	924	100%	0.0	100%	1826
NG_065449.1	MCR-1.19	924	924	100%	0.0	100%	1626
NG_065450.1	MCR-1.20	924	924	100%	0.0	100%	1626
NG_065451.1	MCR-1.21	924	924	100%	0.0	100%	1626
NG_065944.1	MCR-1.22	924	924	100%	0.0	100%	1626
NG_067235.1	MCR-1.23	924	924	100%	0.0	100%	1626
NG_067236.1	MCR-1.24	865	865	99%	0.0	98.39%	1626
NG_067237.1	MCR-1.25	918	918	100%	0.0	100%	1626
NG_068217.1	MCR-1.26	924	924	100%	0.0	100%	1823
NG_068218.1	MCR-1.27	924	924	100%	0.0	100%	1826
NG_070762.1	MCR-1.28	918	918	100%	0.0	100%	1626
NG_070763.1	MCR-1.29	924	924	100%	0.0	100%	1626
NG_070764.1	MCR-1.30	924	924	100%	0.0	100%	1626

APÊNDICE J: Alinhamento múltiplo a partir do sequenciamento de *mcr-4*

Eletoferograma	Código de Acesso	Variante	Max Score	Total Score	Cobertura	E value	Identidade	Tamanho (pb)
	NG_057470.1	MCR-4.1	298	298	92%	2,00E-84	98.81%	1626
	NG_057471.1	MCR-4.2	298	298	92%	2,00E-84	98.81%	1626
C1GSAF1	NG_057461.1	MCR-4.3	303	303	92%	5,00E-86	99.40%	1626
MCR-4 F	NG_057465.1	MCR-4.4	298	298	92%	2,00E-84	98.81%	1626
	NG_057464.1	MCR-4.5	298	298	92%	2,00E-84	98.81%	1626
	NG_061608.1	MCR-4.6	303	303	92%	5,00E-86	99.40%	1626
	NG_057470.1	MCR-4.1	307	307	94%	4,00E-87	99.41%	1626
	NG_057471.1	MCR-4.2	307	307	94%	4,00E-87	99.41%	1626
C1GSAF1	NG_057461.1	MCR-4.3	313	313	94%	8,00E-89	100.00%	1626
MCR-4 R	NG_057465.1	MCR-4.4	307	307	94%	4,00E-87	99.41%	1626
	NG_057464.1	MCR-4.5	307	307	94%	4,00E-87	99.41%	1626
	NG_061608.1	MCR-4.6	313	313	94%	8,00E-89	100.00%	1626