

*Resistência antimicrobiana a β -lactâmicos, Colistina e
Quinolonas em enterobactérias e *Vibrio spp.* isoladas de
Ruditapes decussatus e *Ruditapes philippinarum**

Christian Andrés Valdez Álvarez

2020

Resistência antimicrobiana a β -lactâmicos, Colistina e Quinolonas em enterobactérias e *Vibrio* spp. isoladas de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum*

Christian Andrés Valdez Álvarez

Trabalho de Projeto para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos
Marinhos

Trabalho de Projeto de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Maria Jorge Geraldês
Campos co-orientação da Especialista Teresa Maria Coelho Baptista

2020

Título: Resistência antimicrobiana a β -lactâmicos, Colistina e Quinolonas em enterobactérias e *Vibrio* spp. isoladas de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum*

© Christian Andrés Valdez Álvarez

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar –Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2020

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios por darme sabiduría y fuerza para alcanzar las metas propuestas y guiarme durante todas las nuevas experiencias.

A mi familia, especialmente a mis padres Ángel y Laura por ser el pilar fundamental de mi vida por sus enseñanzas, su constante apoyo y dedicación para ayudarme a lograr mis objetivos, también a mis hermanos Geova, Beto y Naye por estar siempre presentes en cada paso y decisión tomada.

A mis orientadoras a la Doctora María Jorge Geraldés Campos y a la Especialista María Teresa Coelho Baptista por brindarme su tiempo y guiarme con todos sus conocimientos y experiencias para la realización de este proyecto.

A mi compañera de aventuras Belén Almeida por su constante apoyo, compañía y ayuda en los nuevos proyectos alcanzados.

De manera especial a Marco Aurélio Dias Simões y Catia Filipa Gaspar Veríssimo Costa por su amistad, orientación y apoyo durante todo mi tiempo de trabajo en laboratorio.

Al Instituto Politécnico de Leiria y al CETEMARES por recibirme y ayudarme a alcanzar mi formación profesional

Abstract

Currently, antibiotic resistance is presented globally as a serious problem that worsens daily, and since more resistant bacteria, with the capacity to transfer genes keep emerging, it becomes a topic of uttermost importance. Mollusks are a highly appreciated food, however, these organisms feed through filtering, which leads to the accumulation of a varied community of microorganisms in its tissues, and when consumed raw or improperly cooked, the transference of genes, from its microorganisms to the human gastrointestinal flora may occur. The interaction between these two groups of microorganisms can generate the transference of resistance genes. The main objective of this study consists in the screening of genetic determinants of resistance to antimicrobial compounds present in enterobacteria and *Vibrio* isolated from mollusks collected from two geographical zones in Portugal. Both group of microorganisms were isolated in selective media TCBS and Chromocult from *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* samples from Óbidos lagoon, and *Ruditapes decussatus* samples from Ria Formosa in Algarve. 43 microorganisms belonging to *Vibrio* genus and 18 enterobacteria were isolated. Optimal growth conditions for *Vibrio* were established, with best results determined as 28°C in both selective (TCBS) and non-selective media (Muller-Hinton) supplemented with NaCl (1,5%). Phenotypic resistance tests to five antimicrobials, namely cefotaxime, imipenem, ciprofloxacin, meropenem and colistin, were carried out. The screening of 23 resistance genes was done through PCR (*qnrS*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qepA*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9*). Phenotypic resistance to colistin and its respective genetic marker *mcr-1*, were found in three *Vibrio* spp. Isolates, EV07V isolated from *Ruditapes decussatus* from Algarve and NJ21V and NJ22V isolated from *Ruditapes philippinarum* from Óbidos.

Key-words: Antimicrobial resistance, clams, colistin, enterobacteria, *mcr-1*, *Vibrio*.

Resumo

Atualmente, a resistência global a antibióticos é um problema sério que se agrava a cada dia, sendo que o rápido aparecimento de bactérias resistentes com a capacidade de transferir genes torna-se um tópico de grande importância. Um dos alimentos bastante apreciados são os moluscos, contudo, estes organismos alimentam-se através de filtração, o que leva a que possam acumular uma variada comunidade de microrganismos nos seus tecidos. Se forem consumidos crus ou cozinhados de forma inadequada, poderá ocorrer a transferência de genes dos microrganismos presentes nos moluscos para a flora gastrointestinal humana. Havendo esta interação poderá ocorrer a transferência de genes de resistência entre os dois grupos de microrganismos. O objetivo deste trabalho consiste na pesquisa de determinantes genéticos de resistência a compostos antimicrobianos presentes em enterobactérias e *Vibrio* isolados de moluscos, recolhidos de duas zonas geográficas de Portugal. Foram isolados os dois grupos de microrganismos em meios seletivos TCBS e Chromocult a partir de amostras de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* da Lagoa de Óbidos e de *Ruditapes decussatus* da Ria Formosa no Algarve. Obtiveram-se 43 isolados pertencente ao género *Vibrio* e 18 enterobactérias. As condições ótimas de crescimento de *Vibrio* foram estabelecidas, tendo-se obtido melhores resultados de crescimento a 28°C em meios selectivos (TCBS) e não selectivos (Muller-Hinton) suplementados com NaCl (1,5%). Foram realizados testes de resistência fenotípica a cinco antimicrobianos, nomeadamente cefotaxima, imipenemo, ciprofloxacina, meropenemo e colistina. A pesquisa de 23 genes de resistência foi feita através de PCR (*qnrS*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qepA*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9*). Foram encontradas resistências fenotípicas à colistina em três isolados de *Vibrio* spp., EV07V isolado de *Ruditapes decussatus* do Algarve e NJ21V e NJ22V isolados de *Ruditapes philippinarum* de Óbidos e o respetivo marcador genético de resistência *mcr-1*.

Palavras-chave: Amêijoas, colistina, enterobactérias, *mcr-1*, resistência a antimicrobianos, *Vibrio*

Índice

Agradecimientos.....	vii
Abstract.....	ix
Resumo.....	xi
Índice.....	xiii
Índice de figuras.....	xvii
Índice de tabelas.....	xix
Índice de abreviaturas.....	xxi
1. Introdução.....	1
1.1 Aquicultura.....	2
1.1.1 Aquicultura em Portugal.....	3
1.1.1.1 <i>Ruditapes decussatus</i>	4
1.1.1.2 <i>Ruditapes philippinarum</i>	5
1.2 Antibióticos.....	7
1.2.1 Mecanismos de ação dos antimicrobianos.....	9
1.2.1.1 Inibição da síntese da parede celular.....	9
1.2.1.2 Inibição da síntese de ácidos nucleicos.....	10
1.2.1.3 Alteração na permeabilidade da parede.....	10
1.2.1 Antimicrobianos β -lactâmicos.....	10
1.2.1.1 Carbapenemos.....	11
1.2.1.2 Cefalosporinas.....	12
1.2.1.3 Colistina.....	12
1.2.1.4 Quinolonas.....	13
1.2.3 Mecanismos de resistência a antimicrobianos.....	13
1.2.3.1 Resistência a antimicrobianos β -lactâmicos.....	13
1.2.3.2 Mecanismos de resistência a quinolonas.....	14

1.2.3.3	Mecanismos de resistência à colistina.....	15
1.3	Determinantes genéticos de resistência	16
1.3.1.1	Genes <i>qnr</i>	16
1.3.1.2	Genes (<i>aac(6')-Ib-cr</i>)	17
1.3.1.3	Genes <i>qepA</i>	17
1.3.1.4	Genes <i>qnr</i> em ambientes marinhos.....	17
1.3.2	Genes <i>mcr</i> associados à resistência à Colistina.....	18
1.3.2.1	Genes <i>mcr</i> em ambientes marinhos	18
1.3.3	Genes <i>bla</i> associados à resistência a β -lactâmicos.....	19
1.3.3.1	Genes <i>bla</i> em ambientes marinhos	19
1.4	Mecanismos de transferência genética em bactérias	20
1.4.1	Transformação.....	20
1.4.2	Conjugação.....	21
1.4.3	Transdução	21
1.5	Família Vibrionaceae e Família Enterobacteriaceae	22
1.5.1	Família Vibrionaceae	23
1.5.1.1	<i>Vibrio</i> spp. patógenos em humanos.....	23
1.5.2	Enterobacteriaceae	24
1.5.2.1	Enterobactérias patogénas em humanos	24
1.6	Objetivos.....	25
1.6.1	Objetivo geral.....	25
1.6.2	Objetivos específicos.....	25
2	Metodologia	27
2.1	Recolha das amostras.....	27
2.2	Preparação da amostra e enumeração de membros das famílias Vibrionaceae e Enterobacteriaceae.....	27
2.3	Isolamento bacteriano.....	28

2.4	Conservação de isolados.....	28
2.5	Extração de DNA dos isolados	28
2.6	Otimização das condições de crescimento de <i>Vibrio</i>	29
2.7	Testes fenotípicos de resistência a antimicrobianos	29
2.8	Determinação da Concentração Mínima inibitória à colistina	30
2.9	Pesquisa de genes de resistência e Identificação de isolados	30
2.10	Purificação de produtos de PCR e sequenciação e identificação de isolados	31
2.11	Extração de plasmídeos e sequenciação	31
2.12	Transformação bacteriana.....	32
3	Resultados e discussão	33
3.1	Enumeração de <i>Vibrio</i> e Enterobacteriaceae	33
3.2	Isolamento bacteriano.....	34
Tabela 3.3 Identidade das colônias isoladas em meio Chromocult em função da cor das UFCs no meio..... 35		
3.3	Testes de viabilidade de isolados conservados.....	35
3.4	Testes de crescimento dos membros isolados do género <i>Vibrio</i>	36
3.5	Resistência a antimicrobianos e identificação dos isolados resistentes à colistina	39
3.6	Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos	42
3.7	Extração de plasmídeos	44
3.8	Transformação bacteriana.....	46
4	Conclusões	47
5	Perspetivas futuras.....	49
Referências		51
ANEXOS.....		65
Anexo 1. Lista de Primers e condições de PCR		65
Anexo 2. Antibiógramas.....		67
Anexo 3. Sequências obtidas e comparação em bancos de dados.....		69

Anexo 4. Alinhamento das sequencias dos isolados NJ21V e NJ22V	70
Anexo 5. Comparação morfológica dos isolados NJ21V e NJ22V.....	72
Anexo 6. Sequências <i>mcr-I</i> obtidas a partir de os plasmídeos e comparação em bancos de dados.....	73

Índice de figuras

Figura 1.1 Produção anual de aquacultura em Portugal desde 2000.....	3
Figura 1.2 Produção aquícola de Portugal, dados apresentados em percentagem de cada espécie produzida durante o ano 2018.....	4
Figura 1.3 Distribuição geográfica de <i>Ruditapes decussatus</i>	5
Figura 1.4 Distribuição global de <i>Ruditapes philippinarum</i>	6
Figura 1.5 Anel β -lactâmico presente na penicilina.....	11
Figura 1.6 Estrutura representativa dos carbapenemos.....	11
Figura 1.7 Estrutura da cefalosporina.....	12
Figura 1.8 Mecanismos de transferência genética em bactérias.....	22
Figura 2.1 Locais de amostragem. A Lagoa de Óbidos. B Ria Formosa, Algarve	27
Figura 3.1 Resultados de crescimentos nas condições testeadas.....	36
Figura 3.2 Antibiogramas das estirpes com resistência.....	39
Figura 3.3 Visualização dos plasmídeos extraídos dos isolados com resistência fenotípica a colistina em gel de agarose.....	44
Figura 3.4 Gel de agarose com produtos de PCR para gene <i>mcr-1</i> dos plasmídeos e do DNA total dos isolados (EB07V, NJ21V, NJ22V).....	45
Figura 3.5 Alinhamentos das sequências <i>mcr-1</i> presentes nos 3 <i>Vibrios</i> com resistência a colistina.....	46

Índice de tabelas

Tabela 1.1 Classificação taxonómica de <i>Ruditapes decussatus</i>	5
Tabela 1.2 Classificação taxonómica de <i>Ruditapes philippinarum</i>	6
Tabela 1.3 Antimicrobianos de interesse, e respectivos mecanismos de ação e seus representantes.....	8
Tabela 3.1 UFC por grama de molusco presentes em cada espécie nos diferentes meios de cultivo.....	33
Tabela 3.2 Isolados totais., presentes nas almeijoas.....	34
Tabela 3.3 Identidade das colônias isoladas em meio Chromocult em função da cor das UFCs no meio.....	33
Tabela 3.4 Testes de crescimento dos isolados presuntivamente <i>Vibrio</i> em diferentes meios, temperatura e presença de NaCl.....	37
Tabela 3.5 Concentração Inibitória Mínima (MIC) de cada isolado com resistência fenotípica a colistina.....	40
Tabela 3.6 Percentagem de identidade dos isolados.....	41
Tabela 3.7 Resultados de PCRs, pesquisa genes móveis <i>mcr</i>	43

Índice de abreviaturas

ATP- Trifosfato de adenosina

Blast- *Basic Local Alignment Search Tool*

DGRM- Direção Geral dos Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos

DNA- Ácido desoxirribonucleico

ESBLs- β -lactamases de largo espectro

FAO- *Food and Agriculture Organization of the United Nation*

LB- Luria Bertani

LPS- lipopolissacarídeos

MH- Muller-Hinton agar

MIC- Concentração mínima inibitória

NB- Caldo nutritivo

NCBI- *National Center for Biotechnology information*

NMP- número mais provável

PBPs- Proteínas de ligação a penicilina

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PMQR- Genes de Resistência a quinolonas mediados por plasmídeos

TCBS- Agar tiosulfato citrato sacarose biliar

TSA- Agar Trípico de Soja

TSB- Caldo Trípico de Soja

UCF- Unidades formadoras de colónias

WoRMS- *World Register of Marine Species*

1. Introdução

Atualmente, a resistência global a antibióticos é um problema sério que se agrava a cada dia, razão pela qual os setores farmacêutico, biotecnológico e da saúde têm um papel fundamental em fornecer soluções para evitar esse problema, sendo necessário analisar a resistência de bactérias a antibióticos e a sua presença em produtos destinados à alimentação (Matveikova, 2018). A resistência bacteriana aos antibióticos pode estar relacionada com mecanismos intrínsecos ou extrínsecos das bactérias, ou seja, adaptativos das bactérias, mas a principal causa é o uso indiscriminado desses medicamentos (Acevedo et al., 2015).

As bactérias são frequentemente consideradas agentes etiológicos de doenças (patogênicos) mas isso está longe de ser verdade, já que das milhares de espécies existentes apenas algumas são prejudiciais aos seres humanos, as restantes são até benéficas e têm papéis importantes no nosso corpo e no meio ambiente (Lima et al., 2017).

Desde a descoberta de antibióticos por Alexander Fleming em 1928, esses compostos tornaram-se drogas desenvolvidas para melhorar a saúde humana ou; para prevenir e tratar infecções de animais e plantas (Alos, 2015). Quando os antibióticos foram introduzidos na medicina, converteram-se numa das invenções mais importantes para o controlo de doenças infecciosas tendo salvado milhões de vidas (Dubert et al., 2016).

Uma ameaça crescente e prejudicial à eficácia desses medicamentos é a resistência bacteriana aos antibióticos. Esta pode ser definida como a capacidade de uma bactéria sobreviver em concentrações de antibióticos que inibem ou matam outras da mesma espécie. O uso indevido de antibióticos e agentes antimicrobianos, em medicina humana, em veterinária e na agricultura originou elevadas transformações nas comunidades de bactérias ambientais que resulta na difusão de genes de resistência; bem como de agentes seletivos (antibióticos, biocidas, poluentes ambientais, entre outros) que estão distribuídos pelos diferentes ecossistemas, aumentando a capacidade de resistência das bactérias (Dubert et al., 2016). O maior risco associado ao uso extensivo de antimicrobianos é o desenvolvimento de bactérias resistentes no ambiente aquático que

podem disseminar genes de resistência para outras bactérias, capazes de causar sérios danos à saúde humana e animal (FAO, 2019).

O rápido crescimento populacional sugere uma necessidade crescente de fontes alimentares mais sustentáveis, como a pesca, a colheita de produtos alimentares marinhos e a aquicultura (FAO, 2018a). Nessas áreas, os moluscos ganharam interesse porque a sua produção e captura são fáceis, têm baixo impacto ambiental e são uma fonte de ácidos gordos essenciais (Helm, 2006). A aquicultura de moluscos bivalves cresceu significativamente nos últimos anos, no entanto, grande parte da sua produção ainda vem de populações selvagens (IPAC, 2019).

1.1 Aquicultura

Aquicultura ou aquicultura pode ser definida como um conjunto de estratégias, técnicas e atividades para criar espécies aquáticas e vegetais, em ambientes controlados, sejam de água doce, salgada ou salobra sob cuidados humanos (Brito, 2016).

É uma prática que ganhou interesse recentemente, mas é quase tão antiga quanto os outros sistemas de produção de alimentos, sendo que a referência mais antiga sobre práticas de produção de peixes remonta há aproximadamente 4000 anos atrás na China e 3500 anos na Mesopotâmia. Na China antiga, observou-se a produção de peixes combinada com as culturas de arroz. Algumas outras civilizações, como a Babilônica, Egípcia e a Grega, deixaram evidências sobre o cultivo de espécies aquáticas, e por sua vez na Europa, os antigos romanos da Era Imperial criaram peixes como parte do sistema de produção de alimentos, uma prática habitual nos mosteiros cristãos da Europa central, que no século XIX ganhou maior importância com a criação do primeiro centro de estudos sobre aquicultura numa cidade francesa chamada Huningue (IPAC, 2019).

1.1.1 Aquacultura em Portugal

A aquacultura em Portugal desenvolveu-se bastante nas últimas décadas, sendo que em termos de produção os dois produtos mais importantes são os peixes de água doce, peixes marinhos e o terceiro grupo mais importante são os bivalves (IPAC, 2019).

Portugal possui uma grande quantidade de produção aquícola. De acordo com a Direção Geral dos Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos (DGRM) em 2017, foram produzidas 12.559 toneladas, com um crescimento médio anual de 11,5%, valor que permanece em ascensão desde 2000, como pode ser visto na figura 1.1 (INE, 2019).

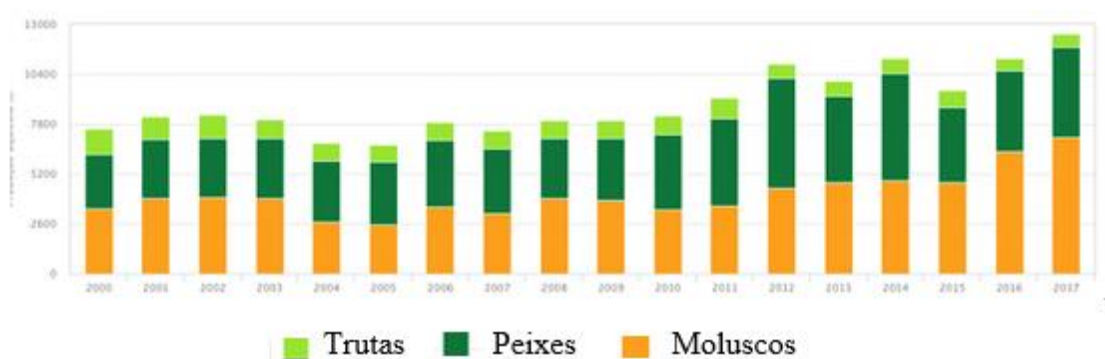


Figura 1.1 Produção anual de aquacultura em Portugal desde 2000 (INE, 2019).

O cultivo de moluscos ocupa o primeiro lugar na aquicultura portuguesa, com um total de 56,7%, e nessa classificação as amêijoas são as espécies mais relevantes, com um total de 3 887 toneladas , uma percentagem de 23,2%, como pode ser visto na figura 1.2 (Marulanda, 2019).

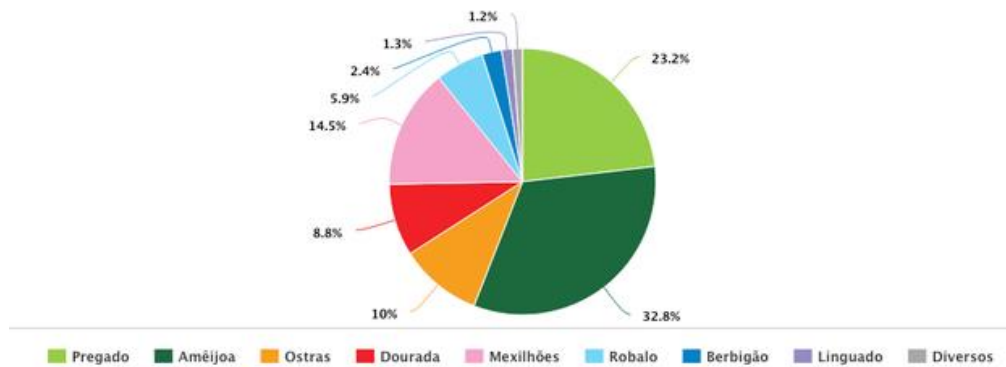


Figura 1.2 Produção aquícola de Portugal (IPAC, 2019), dados apresentados em percentagem de cada espécie produzida durante o ano 2018.

A aquacultura é uma parte importante no que corresponde aos alimentos ricos em proteínas. Pode ser catalogada como uma indústria verde, pois pode fornecer bens e serviços mais ecológicos, como redução de turbidez e hipóxia nas águas, controlo de nutrientes por filtração de partículas orgânicas em suspensão, redução de sintomas de eutrofização, além de constituir um habitat para invertebrados e uma fonte de alimento para predadores (FAO, 2019).

As duas espécies que irão ser alvo de estudo são *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum*

1.1.1.1 *Ruditapes decussatus*

É uma espécie de molusco bivalve da família Veneridae e sua classificação taxonómica está descrita na tabela 1.1. A concha é marcadamente oval ou quadrada, tem uma linha reta na dobradiça traseira e a margem posterior é truncada, a linha da dobradiça anterior inclina-se em direção à sua margem; na parte traseira possui uma concha decussada, apresenta estrias finas linhas concêntricas e radiais marcadas, cada folheto possui três dentes cardinais, o seio palial tem a forma de uma letra “U” (FAO, 2019).

Tabela 1.1 Classificação taxonómica de *Ruditapes decussatus* (Worms, 2015)

Reino:	Animália
Filo:	Mollusca
Classe:	Bivalvia
Subclasse:	Heterodonta
Ordem:	Veneroida
Família:	Veneridae
Género:	Ruditapes
Espécie:	<i>Decussatus</i>

A sua distribuição geográfica vai desde o sudoeste de Inglaterra até à Península Ibérica e o Mar Mediterrâneo, podendo ser também encontrada de sul a leste de Marrocos e Senegal e por toda a África Ocidental, como mostra na figura 1.3 (WoRMS, 2019).



Figura 1.3 Distribuição geográfica de *Ruditapes decussatus* (Cordero et al., 2017).

1.1.1.2 *Ruditapes philippinarum*

A amêijoja japónica (*Ruditapes philippinarum*), é uma espécie de molusco bivalve da família Veneridae (tabela 1.2), sendo muito apreciada como produto alimentar marinho. A sua produção representa 25% da produção mundial. Possui uma concha equivalva sólida e não-equilateral que tem picos na metade anterior, o seu perfil é tipicamente ovóide, possui um corpo elíptico castanho que se estende quase inteiramente à margem

posterior. Possui anéis de crescimento notórios, três dentes cardinais em cada valva, não possuem dentes laterais, o seio palial é profundo, mas raramente se estende além do centro (FAO, 2018b).

Tabela 1.2 Classificação taxonômica de *Ruditapes philippinarum* (WoRMS, 2015).

Reino:	Animália
Filo:	Mollusca
Classe:	Bivalvia
Subclasse:	Heterodonta
Ordem:	Veneridae
Superfamília:	Veneroidea
Family:	Veneridae
Genus:	<i>Ruditapes</i>
Espécies:	<i>Philippinarum</i>
Nome:	<i>Ruditapes philippinarum</i>

Este molusco é nativo do Japão, mas tem uma ampla distribuição nos oceanos Índico e Pacífico, do Paquistão à Rússia, foi introduzido ao longo do Pacífico Norte, ilhas do Havaí e nos últimos 20 anos ao longo da costa europeia desde Reino Unido ao Mediterrâneo, como mostra a (Figura 1.4).



Figura 1.4 Distribuição global de *Ruditapes philippinarum* (Egas et al., 2016).

1.2 Antibióticos

Antibióticos são substâncias produzidas por várias espécies de microrganismos, como bactérias e fungos, capazes de impedir o crescimento de microrganismos, sendo classificados como bacteriostáticos, ou causar a morte de microrganismos, sendo neste caso designados bactericidas (Sengupta et al., 2013). A sua descoberta foi um dos grandes avanços da medicina moderna, pois o uso dessas substâncias permite controlar os processos infecciosos. A terapia antimicrobiana teve início em 1935 com a descoberta e do uso de sulfamidas, seguindo-se o uso clínico da penicilina em 1940. Desde então, dezenas de famílias de antimicrobianos foram introduzidas na prática clínica (Sengupta et al., 2013).

O termo antibiótico significa literalmente "contra a vida e foi cunhado por Waksman em 1942 usado para descrever substâncias produzidas por bactérias capazes de inibir o crescimento de outras (Burnett & McCarthy, 2011).

Por vezes é feita uma distinção entre antibióticos e antimicrobianos, considerando-se aqueles produzidos por microrganismos como antibióticos e aqueles parciais ou totalmente sintetizados pelo homem, como antimicrobianos (Correia, 2016).

Assim, podemos definir um composto antimicrobiano como uma substância sintética ou natural que pode matar ou inibir o crescimento de microrganismos como bactérias, fungos e algas; nem todos os antimicrobianos são considerados antibióticos (Surat & Davis, 2018). Ao longo deste trabalho é utilizado o termo antimicrobiano para referir os dois tipos de compostos.

No presente trabalho, serão discutidos alguns aspetos referentes à resistência aos antimicrobianos quinolonas, colistina, carbapenemos e cefalosporina (Tabela 1.3) presente em microrganismos isolados de moluscos selvagens, *R. decussatus* e *R. philippinarum* e aos mecanismos de ação associados.

Tabela 1.3 Antimicrobianos de interesse, e respectivos mecanismos de ação e seus representantes (Calvo & Martinez, 2009).

MECANISMO DE AÇÃO	GRUPOS	SUBGRUPO	ANTIMICROBIANOS REPRESENTANTES
Inibição da síntese da parede bacteriana	β -lactâmicos	Penicilinas	Naturais: Penicilina G, penicilina V
			Res. a penicilinasas: Cloxacilina, meticilina, oxacilina
			Aminopenicilinas: Ampicilina, amoxicilina
			Carboxipenicilinas: carbenicilina,
		Cefalosporinas	1 ^a gen.: Cefalotina, cefazolina
			2 ^a gen.: Cefaclor, cefotetán, cefoxitina, cefuroxima
			3 ^a gen.: Cefixima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona
Carbapenemos	4 ^a gen.: Cefepima, cefpiroma		
Carbapenemos	Doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem		
Monobactâmicos	Aztreonam		
Metabolismo prejudicado ou estrutura de ácido nucleico	Quinolonas	1 ^a gen.: Ácido nalidíxico, ácido pipemídico	
		2 ^a gen.: Norfloxacino	
		3 ^a gen.: Ciprofloxacina, levofloxacina	
		4 ^a gen.: Gemifloxacina, moxifloxacina,	
Alterar a permeabilidade da parede	Polimixinas	Colistina	

1.2.1 Mecanismos de ação dos antimicrobianos

Os antimicrobianos geralmente atuam sobre funções biológicas essenciais para a vida ou para o crescimento dos microrganismos sendo que a forma de ação é dependente da sua estrutura química e da sua capacidade de interagir com qualquer uma das biomoléculas ou estruturas envolvidas nessas funções (Mullis et al., 2019).

1.2.1.1 Inibição da síntese da parede celular

A parede celular mantém a integridade anatômica e fisiológica das bactérias e é capaz de suportar uma forte pressão osmótica gerada internamente. A ausência dessa estrutura significaria a destruição do microrganismo, causada pelo alto gradiente osmótico que geralmente existe entre o meio e o citoplasma bacteriano (Morales, 2016). Existem vários mecanismos de ação para a inibição da síntese da parede celular, incluindo a desorganização da membrana citoplasmática.

A membrana celular é uma barreira de permeabilidade e proteção que possui funções de transporte ativo de substâncias, e por isso se a sua integridade for comprometida as macromoléculas escapam levando à morte da célula (Calvo & Martínez, 2009). Normalmente, o processo de síntese do peptidoglicano é acompanhado por uma digestão autolítica da matéria existente e, na presença de um inibidor, a digestão enzimática enfraquece a parede celular até comprometer sua estrutura; uma vez que a parede é enfraquecida, na presença de um meio hipotônico (em relação ao interior da célula) os líquidos entram facilmente, aumentando o volume das bactérias até gerar “lise osmótica”, as macromoléculas são liberadas e a célula morre (Gomez et al., 2015). As cefalosporinas e os carbapenemos são alguns dos antimicrobianos capazes de exercer essa ação.

1.2.1.2 Inibição da síntese de ácidos nucleicos

Uma grande quantidade de compostos antimicrobianos é capaz de interferir em diferentes níveis na síntese de ácidos nucleicos. Eles podem inibir a conversão de nucleotídeos ou interromper o processo de síntese de ácidos nucleicos, podendo interferir com enzimas polimerase envolvidas na replicação e transcrição do DNA (Cruz et al., 2014), antimicrobianos como as quinolonas são capazes de inibir a síntese de ácidos nucleicos (Tabela 1.3).

1.2.1.3 Alteração na permeabilidade da parede

Os antimicrobianos são capazes de alterar a permeabilidade da parede causando a saída de íons de potássio, elementos importantes para a vida bacteriana, mas requerem um meio com uma concentração de sais diferente daquele presente no ambiente interno da bactéria que é meio isotônico ou hipotônico (Raheem & Straus, 2019).

Alguns antimicrobianos possuem uma cadeia de ácidos gordos ligada ao peptídeo que se comporta de forma semelhante a detergentes catiónicos. Possui uma parte hidrofílica (o peptídeo) com uma carga positiva alta que, por atração eletrostática, une-se à superfície da membrana, cuja carga líquida é negativa. Por outro lado, a extremidade lipofílica (a cadeia lateral dos ácidos gordos) por interações hidrofóbicas liga-se aos fosfolípidos da membrana. Como resultado, a estrutura da membrana é desorganizada e sua permeabilidade aumenta, com a perda de metabólitos de sódio (Gelambi, 2018). A colistina é um dos antimicrobianos capazes de exercer esta ação (Tabela 1.3).

1.2.1 Antimicrobianos β -lactâmicos

Os antimicrobianos β -lactâmicos possuem uma estrutura chamada anel β -lactâmico, que consiste num anel heterocíclico de quatro átomos, três de carbono e um de azoto (anel mostrado em cor azul na figura 1.5). Essa estrutura é capaz de bloquear a transpeptidação do peptidoglicano e pode ativar a lisina bacteriana endógena capaz de destruir o peptidoglicano, componente essencial da parede celular (Fresnadillo et al., 2015). Também podem inibir a síntese da parede celular bacteriana interferindo com as enzimas

transpeptidase conhecidas como proteínas de ligação à penicilina (PBPs), necessárias para a síntese da cadeia de peptidoglicano (Yuson et al., 2018).

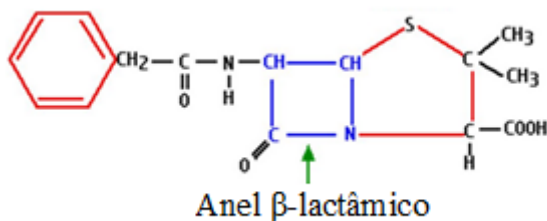


Figura 1.5 Anel β -lactâmico presente na penicilina (Bustillo, 2015).

1.2.1.1 Carbapenemos

Os carbapenemos são um grupo de antimicrobianos pertencentes à família dos β -lactâmicos, que possuem largo espectros de atividade, devido às suas características, podendo ser utilizados em vários tratamentos contra bactérias gram-negativas (Harris et al., 2018). Possuem um anel de azobicyclo carbapenemos formado pela condensação de dois anéis β -lactâmico e pirrolidínico, (Figura 1.6).

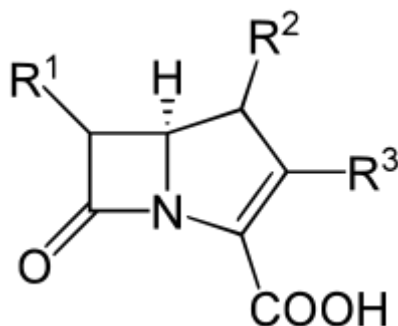


Figura 1.6 Estrutura representativa dos carbapenemos (Mella et al., 2001).

1.2.1.2 Cefalosporinas

São um grupo de antimicrobianos β -lactâmicos derivados do fungo *Acremonium*, com um espectro semelhante às penicilinas com certas vantagens relativas à sua resistência. São ativos contra uma ampla variedade de bactérias aeróbicas e anaeróbicas (Medina, 2017) e estruturalmente têm um anel β -lactâmico fundido com um anel tiazolidínico de 5 membros, estrutura chamada núcleo (cefem); que possui um grupo carboxilo, uma cadeia lateral β -acilamina no carbono da posição 7, com a possibilidade de adicionar novos substituintes no carbono 3, mostrado na Figura 1.7 (Komski, 2014).

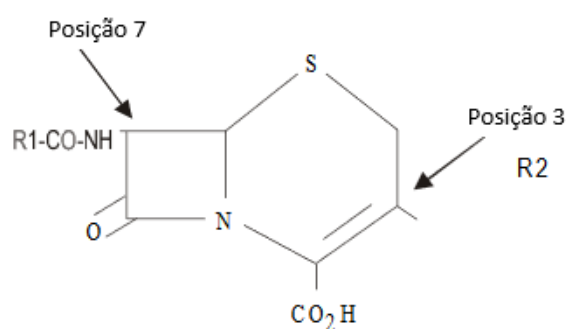


Figura 1.7 Estrutura da cefalosporina (Sosa, 2018).

1.2.1.3 Colistina

A colistina é um polipeptídeo cíclico que pertence ao grupo das polimixinas, que possui propriedades surfactantes capazes de alterar a permeabilidade da parede de bactérias gram-negativas sensíveis, que possuem uma camada externa formada por lipopolissacarídeos.

As polimixinas levam à morte celular bacteriana devido à atração eletrostática exercida entre a carga positiva dos grupos amina e os aniões fosfato e carboxilato que compõem a camada de lipopolissacarídeos. Em suma, a interação entre ácidos gordos e outras regiões hidrofóbicas da colistina com os domínios hidrofóbicos da camada de lipopolissacarídeos

que causa alterações na estrutura da parede celular, promovendo a perda do seu conteúdo, o acesso à droga e conseqüentemente o seu efeito bactericida (Álvarez et al., 2017).

1.2.1.4 Quinolonas

As quinolonas inibem a síntese de DNA bacteriano, sendo o seu alvo a topoisomerase II. Esta inibição enzimática produz o efeito bactericida das quinolonas. As enzimas topoisomerase, responsáveis por enrolar e desenrolar a cadeia de DNA são capazes de cortar o DNA num ponto específico da cadeia e desembaraçar a rotação do DNA (Sosa, 2018).

As quinolonas são capazes de interferir com os complexos enzima-substrato gerados, por exemplo na topoisomerase II e IV, em condições normais esta enzimas separa as cadeias de DNA no ponto em que o enrolamento super positivo é gerado e, ao mesmo tempo, introduz pequenos segmentos de DNA negativo para aliviar a tensão na cadeia, mantendo a sua topologia (Álvarez et al., 2015).

Após esse processo, a enzima ligase une-se às duas extremidades da cadeia separada por meio de um mecanismo dependente de ATP (Trifosfato de adenosina), momento em que as quinolonas exercem a sua ação interpondo-se entre o DNA e a enzima ligase da topoisomerase, gerando uma ligação molecular entre as duas estruturas. que interrompe o processo, impedindo a ligação do DNA (Jacoby, 2009).

1.2.3 Mecanismos de resistência a antimicrobianos

1.2.3.1 Resistência a antimicrobianos β -lactâmicos

Nas bactérias Gram-negativas, a resistência aos β -lactâmicos é causada por vários mecanismos, sendo o mais importante devido à sua frequência e eficácia, é a produção de β -lactamases. Os genes que codificam essas enzimas podem ser encontrados no cromossoma bacteriano ou em plasmídeos, e são produzidos de forma constitutiva ou induzível. As β -lactamases são um grupo de enzimas que podem inativar os

antimicrobianos da família β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos) (Gutiérrez et al., 2013).

De todas as β -lactamases descritas até agora, vale a pena apenas ressaltar, devido ao seu interesse e implicações clínicas: β -lactamases de largo espectro (ESBLs), as β -lactamases AmpC (Morejon, 2013) e as carbapenemases (Valle, 2009).

As ESBL são um grupo de enzimas capazes de degradar as penicilinas, as cefalosporinas de segunda e terceira geração, mas não degradam as combinações β -lactâmico/inibidor de β -lactâmico, como o ácido clavulânico ou o EDTA, nem os carbapenemos (Andrade & Darini, 2017).

As AmpCs são um grupo de β -lactamases, também chamadas cefalosporinases, embora seu espectro hidrolítico de ação não seja apenas cefalosporinas (Rodríguez, 2005); algumas enterobactérias possuem naturalmente β -lactamases de tipo AmpC (Maeyama et al., 2018) e estas enzimas para além de degradarem os mesmos compostos que as ESBL, podem degradar, também as combinações β -lactâmico/ inibidor de β -lactâmico, mas não conseguem degradar os carbapenemos (Morejon, 2013).

As carbapenemases são assim chamadas porque são um grupo específico de β -lactamases que possuem alta eficiência catalítica para a hidrólise de carbapenemos. Esta eficiência não se limita apenas a este grupo de antimicrobianos, pois reconhecem outros e hidrolisam quase todos os β -lactâmicos (Álvarez et al., 2015).

1.2.3.2 Mecanismos de resistência a quinolonas

A resistência às quinolonas em várias bactérias gram-negativas é causada por mutações cromossômicas:

- Em *Escherichia coli*, por exemplo, ocorrem mutações no gene *gyrA* (genes que codificam para a subunidade A da enzima DNA-girase), e no gene *parC* (que codifica a enzima topoisomerase IV); e em menor grau nos genes *gyrB* ou *parE* (genes que codificam a subunidade B da enzima girase topoisomerase) (Álvarez et al., 2015).

- Através da redução das concentrações intracitoplasmáticas de quinolonas mediada por bombas de fluxo (Medina, 2017).

A resistência a este grupo de antimicrobianos também pode ser alcançada e por genes de resistência às quinolona mediados por plasmídeo *Plasmid mediated quinolone resistance*, (PMQR) (Garcia et al., 2018).

Atualmente, estão descritos três tipos de famílias de genes de resistência (PMQR), cujas variações foram identificadas em diferentes patógenos em todo o mundo:

- Os genes *qnr* que codificam proteínas de resistência às quinolonas capazes de proteger a DNA girase (Karl & Perlin, 2011).
- Gene (*aac(6')-Ib-cr*) que codifica uma variante de aminoglicosídeo acetil transferase que degrada as quinolonas (Liu et al., 2016).
- Genes de codificação da bomba de fluxo *qepA* (Medina, 2017).

Em 2020, um plasmídeo contendo vários genes de resistência a quinolonas, (*aac(6')-Ib-cr*, *qnrS2* e *oqxA*,) foi descrito pela primeira vez, demonstrando a existência de plasmídeos com resistência múltipla a quinolonas (Tao et al., 2020).

1.2.3.3 Mecanismos de resistência à colistina

A resistência à colistina é explicada por mutações nos genes que levam a modificações na camada de lipopolissacarídeos (LPS), local de ação dessa molécula (Fonseca et al., 2008).

Além dessa adaptação, foi relatado um novo mecanismo de resistência à colistina por meio de plasmídeos, relacionado ao gene *mcr-1* (*Mobile Colistin Resistance*), produtor de uma enzima responsável pela resistência, que pode difundir-se facilmente para outras bactérias (Zhang et al., 2018).

1.3 Determinantes genéticos de resistência

A descoberta do PMQR envolve a transferência horizontal de genes que conferem resistência a quinolonas, contribuindo para uma alta disseminação desses genes para outras bactérias (Rogério et al., 2014).

1.3.1.1 Genes *qnr*

Os *qnr* são genes transferíveis que codificam proteínas chamadas QNR que pertencem à família dos pentapéptidos repetidos, nesta família foram descritos 90 membros, dois deles com interesse em relação à resistência à quinolona, o primeiro deles conhecido como McbG está presente em bactérias que sintetizam microcina e os protege de sua inibição (Rodríguez, 2005). E o segundo conhecido como MfpA, capaz de interferir na ligação das fluoroquinolonas com o complexo DNA girase (Karl & Perlin, 2011), o seu mecanismo de ação baseia-se na ligação às enzimas girase e topoisomerase IV, protegendo-as da ação das quinolonas (Salah et al., 2019). Esta ligação, por outro lado, confere baixa resistência a fluoroquinolonas (Yan et al., 2017).

O primeiro relato de um plasmídeo capaz de mediar uma proteína resistente a quinolonas, que mais tarde seria chamada *qnrA*, foi identificado em *Klebsiella pneumoniae* isolada da urina em 1994 (Baker et al., 2018).

Os *qnr* são genes que podem ser transferidos e são capazes de conferir baixa resistência a fluoroquinolonas. Foram identificadas cinco famílias: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*; sendo que existem alguns casos de combinação com outros genes dentro do mesmo plasmídeo, gerando resistências cruzada entre quinolonas e outros antimicrobianos (Liu et al., 2016). Além dos 5 conhecidos membros da família *qnr* em 2008, foi relatado um novo membro *qnrVC* descrito em *Vibrio cholerae* (Rincón et al., 2014). Desde esse momento até o presente, sete alelos *qnrVC* (*qnrVC1* a *qnrVC7*) foram relatados na família Vibrionaceae (Carroll et al., 2019).

A presença de genes da família *qnr* tem sido amplamente relatada em todo o mundo, principalmente na Europa, Estados Unidos, Ásia e África (Lozano et al., 2019).

1.3.1.2 Genes (*aac(6')-lb-cr*)

Os genes (*aac(6')-lb-cr*) foram descritos a primeira vez em 1998 em enterobactérias. São capazes de conferir susceptibilidade reduzida às quinolonas, facilitando a seleção de mutações cromossômicas que conferem resistência de alto nível (Liu et al., 2016).

A variante (*aac(6')-lb-cr*) codifica uma acetiltransferase de aminoglicosídeo que confere uma suscetibilidade reduzida a certos antimicrobianos através da N-acetilação da piperazinilamina devido à mutação de aminoácidos, Trp102Arg e Asp179Tyr, que estando presentes permitem à enzima acetilar certas variantes de antimicrobianos (Liu et al., 2016).

1.3.1.3 Genes *qepA*

Os genes *qepA* (PMQR) foram reportados pela primeira vez em *E. coli* na Argentina (Rincón et al., 2014), são genes capazes de codificar uma bomba de efluxo conhecida como QepA. Este gene confere resistência a quinolonas hidrofílicas, como norfloxacin e ciprofloxacina, por meio de um sistema de bombas de fluxo que reduz a concentração do antimicrobiano no meio intracelular, reduzindo assim o seu efeito (Zhang et al., 2018).

1.3.1.4 Genes *qnr* em ambientes marinhos

Os genes *qnr* têm sido descritos em várias bactérias presentes em ambientes marinhos nomeadamente *Shewanella algae*, *Vibrio splendidus*, *Citrobacter* spp., e outras bactérias, que foram relatadas como fontes primárias destes genes. Estas bactérias podem estar relacionadas com amêijoas e por isso podem ser potencialmente patogênicas (Shen, et al., 2018).

1.3.2 Genes *mcr* associados à resistência à Colistina

O primeiro relato de um gene *mcr-1* transmitido por plasmídeos foi descrito em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de porcos (Bajpai et al., 2017). A partir disso, vários genes *mcr* foram descritos em enterobactérias isoladas de humanos e animais na Ásia, América do Sul e Europa (Stefaniuk & Tyski, 2019).

Até 2018, foram descritos cinco tipos diferentes de genes *mcr*; com algumas variantes: *mcr-1* (11 variantes), *mcr-2* (3 variantes), *mcr-3* (10 variantes), *mcr-4* e *mcr-5*. Os três primeiros foram descritos para enterobactérias, (Lachmayr et al., 2009), mas foram também identificados noutras bactérias como *Moraxella* spp. e *Aeromonas* spp. (Bajpai et al., 2017).

No ano de 2019 foram descritos 4 novos tipos *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8* e *mcr-9* (Stefaniuk & Tyski, 2019). Os tipos *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-7* e *mcr-9* compartilham elevados graus de semelhança ao nível estrutural (Brandão et al., 2017).

Finalmente, em 2020, um novo tipo foi relatado: o *mcr-10* isolado de uma linhagem clínica de *Enterobacter roggkampii*, possui uma semelhança percentual de 82,93% ao *mcr-9*, mas é capaz de gerar maior resistência (Wang et al., 2020).

1.3.2.1 Genes *mcr* em ambientes marinhos

A maioria das variações dos genes *mcr* descritas teve origem em animais ou humanos, no entanto existem algumas bactérias presentes em fontes de água que podem ter genes dessa família, o que pode sugerir funções de defesa contra bacteriófagos ou peptídeos antimicrobianos (Khedher et al., 2020).

Existem vários relatos dos genes *mcr* em ambientes aquáticos em todo o mundo: Espanha Portugal, China, Japão, América do Norte, Brasil e África Oriental (Dahanayake et al., 2019) e foram descritos já para várias espécies de moluscos (Sun, 2018).

Estão amplamente espalhados entre bactérias gram-negativas como *E. coli* e outras enterobactérias amplamente distribuídas em ambientes aquáticos como *Aeromonas spp.* e foram também encontrados em vários organismos aquáticos, como sapos e peixes (Villa et al., 2019).

1.3.3 Genes *bla* associados à resistência a β -lactâmicos

As β -lactamases de largo espectro (ESBLs) são a principal causa de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, como cefalosporinas e carbapenemos. Vários estudos relataram os genes da família *bla* como responsáveis por essa atividade (Blakely, 2014).

Os genes *bla* são capazes de produzir β -lactamases, que inibem os antimicrobianos β -lactâmicos em vários níveis, sendo os três principais tipos associados a essa atividade o, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} (Daubin & Szöllösi, 2016).

O gene *bla*_{TEM} foi isolado pela primeira vez no início dos anos 80 de um paciente na Grécia e é considerado uma das famílias mais significativas, (Martínez, 2019), enquanto o gene *bla*_{SHV} foi observado pela primeira vez numa estirpe de *Klebsiella ozaenae* na Alemanha e a partir da sua primeira descrição a sua presença foi relatada em todo o mundo (Ianez, 2006).

Mais de 350 variantes diferentes de genes produtores de ESBLs foram descritas e classificadas em 9 famílias *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES}, *bla*_{BES}, *bla*_{TLA} e *bla*_{OXA} (Jiang et al., 2013).

1.3.3.1 Genes *bla* em ambientes marinhos

Os genes de resistência a β -lactâmicos têm sido relatados em ambientes marinhos praticamente em todo o mundo (Garcia et al., 2014).

Bactérias com resistência a β -lactâmicos foram relatadas em amêijoas, ostras e outros moluscos bivalves na Europa, Brasil e China; Estes genes são encontrados principalmente em bactérias da família Vibrionaceae e existem relatos de membros do género *Vibrio*

patógenos de *Ruditapes philippinarum* com presença de genes de resistência a β -lactâmicos na China, Espanha e França (Dahanayake et al., 2019).

1.4 Mecanismos de transferência genética em bactérias

A transferência horizontal de genes pode ser definida como a troca de material entre organismos vizinhos que pode ocorrer entre seres unicelulares e multicelulares, sem que sejam descendentes (não ocorre da bactéria progenitora para os descendentes) (Sun, 2018).

O princípio da transferência foi demonstrado por Griffith em 1928, quando um fator de virulência desconhecido de *Streptococcus pneumoniae* transmitido de alguma forma foi encontrado numa bactéria, gerou virulência, esse fator que em 1940 foi demonstrado como DNA. Foi o primeiro indicador da capacidade de transferir material genético horizontalmente (Villa et al., 2019).

Este mecanismo desempenha um papel importante na evolução e na fácil aquisição, por parte das bactérias, de novo material genético de espécies diferentes, permitindo rápidas taxas de evolução e o desenvolvimento de novos traços genéticos que permitem a adaptação bacteriana a diferentes nichos ecológicos. Esta aquisição de DNA por bactérias ocorre através de diferentes mecanismos: transformação, transdução e conjugação (Blakely, 2014).

1.4.1 Transformação

A transformação é o processo pelo qual uma bactéria adquire DNA do ambiente em que vive; sendo que esse material genético geralmente deriva de organismos mortos; (Baker et al., 2018). Pode ser definida como a variação hereditária de uma bactéria, causada pela absorção de DNA livre no ambiente em que a célula é encontrada e sua subsequente recombinação no DNA celular (Figura 1.8), descrita pela primeira vez em procariontes em 1944 (Daubin & Szöllösi, 2016).

1.4.2 Conjugação

A conjugação é um processo que pode ser definido como a transferência de material genético (plasmídeos ou cromossoma bacteriano total ou parcial) entre bactérias, sem intermediário (Figura 1.8). São conhecidos três tipos:

- Com fator de fertilidade: devido a um plasmídeo que dá às bactérias a capacidade de formar um *pilus* sexual com o qual o material genético pode ser passado para bactérias que não possuem o *pilus*.
- Algumas bactérias têm o fator integrado no seu cromossoma, portanto, devem transferir todo o seu material genético, que geralmente é de curta duração e as bactérias recetoras nem sempre adquirem o fator de forma total.
- Algumas bactérias têm o fator plasmídeo, mas também possuem material genético extra; sendo que, esse plasmídeo é o resultado de uma separação de fragmentos do cromossoma, o mecanismo é uma combinação dos dois anteriores (Martínez, 2019).

1.4.3 Transdução

A transdução é um processo que está fortemente relacionado com os ciclos virais de bacteriófagos (vírus que infetam bactérias), capazes de introduzir material genético em bactérias diretamente no cromossoma bacteriano, para finalmente se replicar com a maquinaria celular e gerar novos vírus (Baker, 2015). No entanto neste processo, o DNA da bactéria infetada é transferido para outra bactéria (Figura 1.8), gerando uma mutação genética evolutiva que aumenta a capacidade de resistência a antimicrobianos da bactéria recetora (Jiang et al., 2013).

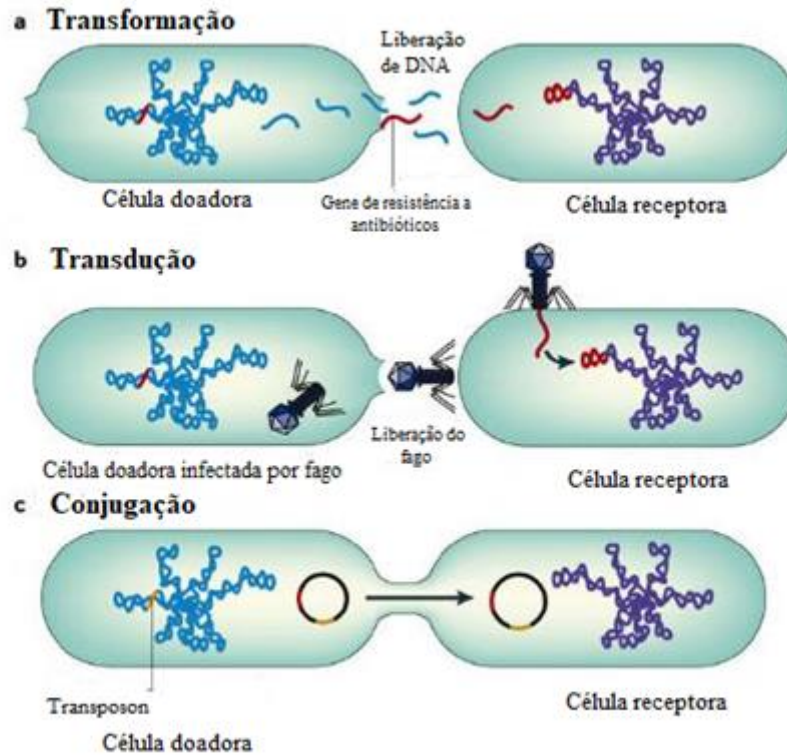


Figura 1.8 Mecanismos de transferência genética em bactérias (Curtis & Schnek, 2000).

1.5 Família Vibrionaceae e Família Enterobacteriaceae

A família Vibrionaceae é composta por bactérias agrupadas em vários gêneros de bacilos Gram-negativos, encontrados principalmente em habitats aquáticos de água doce ou marinha. Algumas espécies são patogênicas para seres humanos e animais aquáticos.

Família Vibrionaceae e especialmente o gênero *Vibrio*, que é um dos grupos bacterianos mais comuns que habitam as águas superficiais do mundo, (Pérez et al., 2014), é um gênero de grande importância, pois os organismos pertencentes são considerados responsáveis pela maioria das doenças atribuídas à microbiota natural de ambientes aquáticos (Salazar, 2018).

Por outro lado, devido à sua estreita relação com as pessoas e à sua capacidade de transmitir genes de resistência a antimicrobianos (Laranjeira, 2014), as enterobactérias também constituem um motivo de interesse especial e é por isso que ambas, a família das Enterobacteriaceae e o gênero *Vibrio* serão estudados no presente trabalho.

1.5.1 Família Vibrionaceae

A família Vibrionaceae é composta por bactérias agrupadas em vários géneros de bacilos Gram-negativos, encontrados principalmente em habitats aquáticos de água doce ou marinha. Algumas espécies são patogénicas para seres humanos e animais aquáticos (Naranjo et al., 2019).

O género *Vibrio*, taxonomicamente descrito em 1854 e considerado um dos primeiros grupos bacterianos a serem reconhecidos. São bactérias Gram-negativas, oxidase positivas, mesófilos, que geralmente são móveis por meio de um flagelo polar (Eiler et al., 2007).

Podem viver em condições ambientais hostis, como um elevado nível de salinidade de 2 a 2,5% (peso/volume) de NaCl (Leyton & Riquelme, 2008). Algumas espécies são consideradas (halófitas) e requerem pelo menos 0,5% de concentração de sal no ambiente para viver, e outras como *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* ou *Vibrio hispanicus*, não necessitam de sal (Sofia & Laranjeira, 2014).

Habitam habitualmente em ambientes marinhos e de água doce em formas de vida vegetal, interagindo com o zooplâncton e no trato intestinal de organismos marinhos (Charles et al., 2019).

1.5.1.1 *Vibrio* spp. patógenos em humanos

São considerados como responsáveis pela maioria das doenças humanas atribuídas à microbiota natural de ambientes aquáticos e de produtos alimentares marinhos (Baker et al., 2018).

As infeções por *Vibrio* spp. são geralmente iniciadas pela exposição à água contaminada ou pelo consumo de produtos alimentares marinhos contaminados crus ou mal cozinhados causando uma variedade de sintomas em humanos e podem ser divididas em dois grupos principais, o primeiro grupo chamado grupo não cólera produz doenças intestinais, como diarreia grave, por outro lado, o chamado grupo cólera, que está associado a diferentes

infecções, como vibriose, gastroenterite e septicemia primária. As infecções têm uma distribuição sazonal acentuada e a maioria dos casos ocorre nos meses mais quentes (Percival & Williams, 2014).

1.5.2 Enterobacteriaceae

A família Enterobacteriaceae é extensa e é constituída por bacilos Gram-negativos em forma de bastonetes, que podem ser encontrados no solo, na água, na vegetação e fazem parte da flora intestinal de muitos animais e seres humanos, tem um total de 238 espécies distribuídas em 51 géneros (Dellepiane & Morales, 2018)

Todos os membros desta família partilham um antígeno comum, chamado antígeno enterobacteriano, podem ser móveis ou imóveis, negativas (Garcia, 2018), podem crescer na ausência e na presença de oxigénio, são capazes de fermentar glicose, reduzir nitratos, são catalase positivas e oxidase. (Pérez et al., 2014).

1.5.2.1 Enterobactérias patogénas em humanos

As bactérias patogénicas presentes em moluscos bivalves podem ser agentes causadores de doenças como a gastroenterite e são responsáveis por vários surtos de origem alimentar, representando um risco para os consumidores de moluscos (Oliveira, 2018).

Do ponto de vista clínico, podem ser classificados em dois grupos, primeiro enterobactérias patogénicas (*Salmonella enterica*, *Shigella* spp., *Yersinia* spp. e algumas estirpes de *Escherichia coli*) que produzem sintomas gastrointestinais (Pérez et al., 2014) e enterobactérias oportunistas bactérias que podem causar doenças apenas em pessoas com deficiência no sistema imunológico (Naranjo et al., 2019).

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo geral

Pesquisar determinantes genéticos de resistência a compostos antimicrobianos presentes em enterobactérias e *Vibrios* isolados de moluscos, *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* recolhidas de duas zonas geográficas de Portugal.

1.6.2 Objetivos específicos

- Identificar as espécies dos isolados resistentes presentes em *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum*.
- Encontrar genes de resistência a quinolona, colistina e β -lactâmicos presentes em bactérias isoladas a partir de moluscos bivalves.
- Avaliar a concentração bacteriana de *Vibrio sp.* e enterobactérias isolados em amostras de *R. decussatus* obtidos Óbidos e no Algarve.
- Avaliar a concentração bacteriana de *Vibrio sp.* e enterobactérias isolados em amostras de *R. philippinarum* obtido em Óbidos.

2 Metodologia

2.1 Recolha das amostras

Um total de 10 indivíduos de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* foram recolhidos por mariscadores locais da Lagoa de Óbidos no dia 28 de novembro de 2019, e dez indivíduos de *Ruditapes decussatus* foram recolhidos na Ria Formosa no Algarve no dia 20 de janeiro de 2020 (Figura 2.1). Após a sua recolha foram transportados em malas isotérmicas (a temperatura média de 10°C) para o laboratório CETEMARES.



Figura 2.1 Locais de amostragem, A. Lagoa de Óbidos. B. Ria Formosa, Algarve.

2.2 Preparação da amostra e enumeração de membros das famílias Vibrionaceae e Enterobacteriaceae

A preparação dos bivalves foi efetuada lavando bem a parte exterior dos indivíduos, que se apresentavam inteiros e fechados, com água corrente e uma escova para eliminar toda a sujidade. Foram secos com papel absorvente.

Individualmente os bivalves foram passados brevemente pela chama do Bico de Bunsen, tendo sido abertos em câmara de fluxo laminar, introduzindo a lâmina estéril de um bisturi entre as valvas para cortar o músculo adutor, e com uma pinça retirou-se a parte edível e o líquido intervalvar para o saco de Stomacher. Adicionou-se igual volume de solução salina 0,85% (m/v) no saco e homogeneizou-se durante 3 minutos em Stomacher. Em seguida realizaram-se diluições decimais em solução salina 0,85% (m/v), seguindo-se o

plaqueamento, por espalhamento de 100 µl de cada diluição nos meios de agar tiossulfato citrato sacarose biliar (TCBS,VMR-Chemicals), para a enumeração e isolamento de Vibrionaceae e agar Chromocult (Merck) para a enumeração e isolamento de enterobactérias. As placas com TCBS e Chromocult foram incubadas durante 24 horas a 28°C a 37°C, respetivamente.

2.3 Isolamento bacteriano

As unidades formadoras de colónias (UFC) obtidas nas placas de TCBS e Chromocult, que apresentavam morfologia distinta, foram purificadas em Agar Trípico de Soja (TSA, VWR-Chemicals) suplementado com NaCl 1,5% e incubadas a 28°C durante 24h) e meio agar nutritivo (NA, VWR-Chemicals) seguindo-se incubação a 37°C durante 24h.

2.4 Conservação de isolados

Os isolados foram inoculados em 3 mL de meio líquido não seletivo, caldo nutritivo (NB, VWR-Chemical) e incubados a 28°C (vibriosis) e 37°C (enterobactérias) por 24-48 horas com agitação constante, até se atingir a fase exponencial de crescimento da cultura. Os microorganismos foram conservados em glicerol estéril a uma concentração final de 20 a 30% em micro tubos de 1,5 mL a - 80°C.

2.5 Extração de DNA dos isolados

A extração do DNA foi realizada pelo método *boiling*, descrito brevemente a seguir: foi centrifugado 1 ml de meio líquido, com crescimento *overnight*, de cada um dos isolados a 10 000xg durante 1 minuto sendo de seguida removido o sobrenadante. Posteriormente um volume de 100 µL de água MilliQ estéril foi adicionado a cada um dos tubos, o pellet foi res-suspenso e cada tubo foi colocado no termobloco a 100°C por 10 minutos. Após este tempo os tubos foram centrifugados a 10 000xg por 5 minutos e o sobrenadante foi recolhido para novos microtubos. O DNA obtido foi armazenado a -20°C.

2.6 Otimização das condições de crescimento de *Vibrio*

Surgiu a necessidade de garantir as condições ideais de crescimento dos membros do género *Vibrio* e normalizar os requisitos do seu crescimento para a realização subsequente do antibiograma. Chart (2012) menciona que alguns vibrios, incluindo *V. cholerae* e alguns outros membros do género podem crescer em meios sem sal. Cartwright & Griffin (2012) indicam que com a exceção de *V. cholerae* e *V. mimicus*, todas as espécies de *Vibrio* são halofílicas, (necessitando de sal para crescer). Por estas razões foi necessário determinar experimentalmente as condições de crescimento dos isolados.

Colónias individuais de culturas frescas dos isolados presuntivamente do género *Vibrio* foram inoculados em agar Müller-Hinton (MHA, HIMEDIA) suplementado com NaCl 1,5% em MHA sem NaCl e TCBS a 28 e 37°C

2.7 Testes fenotípicos de resistência a antimicrobianos

Os testes fenotípicos de resistência a antimicrobianos foram realizados através do método de difusão em agar. Para tal, preparou-se uma suspensão com densidade celular equivalente ao padrão McFarland 0,5, usando para um Densitómetro de bancada Grant-bio. A suspensão celular foi usada para inocular placas Müller-Hinton suplementado com NaCl, através do uso de uma zaragatoa estéril para os *Vibrios* e sem NaCl para as enterobactérias.

O teste foi realizado para os antimicrobianos colistina (10 µg), cefotaxima (30 µg), imipenemo (10 µg), ciprofloxacina (5 µg) e meropenemo (10 µg). Todos os discos usados foram da marca OXOID.

As placas finalmente foram incubadas por 24 horas a 28°C para bactérias do género *Vibrio* e 37°C para enterobactérias e os halos de inibição foram medidos em cada uma das placas.

2.8 Determinação da Concentração Mínima Inibitória à Colistina

O procedimento foi semelhante ao da seção anterior. Preparou-se uma suspensão com densidade celular equivalente ao padrão McFarland 0,5 em solução salina 0,85%. A suspensão celular foi usada para inocular placas Müller-Hinton suplementado com NaCl (1,5%), através do uso de uma zaragatoa estéril. Uma vez inoculadas as placas colocaram-se tiras de colistina (Etest, Biomerieux) em cada placa, e estas foram incubadas durante 24 h a 28°C. A MIC foi determinada através da leitura na zona da tira que interceptava o limite de crescimento microbiano na placa.

2.9 Pesquisa de genes de resistência e Identificação de isolados

A presença de genes de resistência a antimicrobianos foi realizada para um total de 23 genes de resistência a antimicrobianos pertencentes a três classes de antimicrobianos; genes de resistência a quinolonas *qnrS*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qepA*; genes de resistência a β -lactâmicos: *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e genes de resistência a colistina: *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9*. Todas as sequências estão presentes no anexo 1. Os isolados que apresentaram resistência genotípica aos antimicrobianos foram identificados através da sequenciação de vários genes *house keeping*: 16s DNA (Hossain et al., 2014), *recA* (Maeda et al., 2019), gene *groEL* (Teng et al., 2017), genes *rpoB* (Tarr et al., 2007) e o gene *gryB* (Kalia et al., 2015).

A pesquisa dos genes de resistência e a identificação dos isolados foi realizada por PCR com as seguintes condições: 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, emparelhamento entre 50 e 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 15 a 45 segundos e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Os *primers* utilizados e as respectivas condições de PCR estão listadas no Anexo 1. As misturas de PCR foram feitas num volume final de 50 μ L com a Taq polimerase (NZT taq polimerase II de marca Nzytech) e 5 μ L de DNA de cada isolado.

Todas as reações foram realizadas num termociclador da marca Bio Rad, T100 Thermal Cycler.

Os produtos de PCRs foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1% a 80 V/h, e os géis foram observados num sistema de aquisição de imagem Gel DOC EZ Imager (Bio Rad).

As sequencias obtidas foram analisadas através da base de dados *National Center for Biotechnology information* (NCBI) através da ferramenta bioinformática *Basic Local Alignment Search Tool* (Blast) em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

2.10 Purificação de produtos de PCR e sequenciação e identificação de isolados

Os produtos de PCR foram purificados através de um kit de extração da marca GeneJET PCR da Thermo Scientific, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

A concentração de DNA presente foi medida num espectrofotómetro de micro-volume UV-Vis (Thermo Scientific, Nanodrop 2000), os tubos foram preparados na concentração de DNA necessária de acordo com os parâmetros exigidos pela empresa responsável pela sequenciação (StabVida, Costa da Caparica), de 10 ng/ μ L; num volume de 10 μ L ao qual foi adicionado 3 μ L de primers. Os produtos de PCR foram sequenciados com o primer forward e reverse.

As sequencias obtidas foram analisadas através da base de dados *National Center for Biotechnology information* (NCBI) através da ferramenta bioinformática *Basic Local Alignment Search Tool* (Blast) em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

2.11 Extração de plasmídeos e sequenciação

Foram feitas extrações de plasmídeos apenas para os isolados que apresentaram resistência fenotípica a colistina (EB07V, NJ21V, NJ22V). Para a extração dos plasmídeos, os isolados foram incubados em 10 mL de meio líquido TSB suplementados com NaCl 1%, a 28°C *overnight*, , sendo transferidos para microtubos., Os tubos foram centrifugados a 12 000xg quantas vezes necessário até centrifugar os 10 mL, a extração

de plasmídeos foi realizada a seguir, usando um kit de extração Thermo Scientific Mini de GeneJET, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Após realizada a extração dos plasmídeos, estes foram observados através de eletroforese em 1% de gel de agarose a 80 V/h, colocando 3 µL de plasmídeos + 3 µL de *loading buffer* (Thermo Science), em cada poço do gel, sendo o gel observado num sistema de aquisição de imagem Gel DOC EZ Imager (Bio Rad).

Para determinar se as seqüências de *mcr-1* existentes nos *Vibrio* spp. isolados com resistência à colistina apresentam variação genética, foi necessário realizar um alinhamento de múltiplas seqüências com a ferramenta de bioinformática Clustal Omega em <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

2.12 Transformação bacteriana

De forma a confirmar se os plasmídeos são mobilizáveis realizou-se uma transformação bacteriana com os plasmídeos extraídos dos isolados resistentes à colistina (EBO7V, NJ21V e NJ22V). Para tal, adicionou-se 3 µL de plasmídeo extraído a 40 µL de bactérias competentes *Escherichia Coli* TOP-10 (Invitrogen). Colocou-se os microtubos no gelo durante 20 minutos, seguidos de 50 segundos a 42°C e 2 minutos em gelo. Adicionou-se 500 µL de meio LB (Luria Bertani (VWR-Chemicals)), incubou-se durante 1 hora a 37°C. Após deste período, centrifugou-se a 10 000 xg durante 1 minuto, o sobrenadante foi removido e o pellet foi plaqueado em meio LB com 2 µg/mL de colistina e incubou-se *overnight* a 37°C.

3 Resultados e discussão

3.1 Enumeração de *Vibrio* e Enterobacteriaceae

Após todos os processos de recolha de amostras, preparação de soluções e incubações, foi determinada a quantidade de UFC/g presente em cada uma das amostras (tabela 3.1), tendo-se obtido valores inferiores aos relatados por Tinajero em 2018 isto pode ser devido a que a quantidade de bactérias encontradas em amostras marinhas depende em grande parte de fatores como: estação do ano, condições climáticas, fatores antropogénicos, entre outros (Eiler et al., 2007). Por outro lado, a capacidade de retenção de bactérias depende da forma e tamanho dos bivalves (Charles et al., 2019).

Ochoa et al., 2018 encontraram membros da família enterobacteriaceae e membros do género *Vibrio* presentes em moluscos assim como no nosso trabalho. O número de coliformes fecais presentes varia entre 10^1 e 10^6 NMP (número mais provável) por grama de moluscos, neste estudo, as contagens finais estão dentro desse intervalo o que é considerado normal.

Os vibrios e as enterobactérias encontradas nos moluscos estudados sugerem a contaminação por fontes terrestres; num estudo realizado por Quiñones et al., 2000 identificou diferentes espécies enterobactérias como *Salmonella* e *E. coli*, espécies presentes devido à proximidade da área de captura com a costa e a clara influência antropogénica nos corpos de água onde as ameijoas são capturadas (Krus, 2017).

Tabela 3.1 UFC por grama de molusco presentes em cada espécie nos diferentes meios de cultivo

	Local de amostragem	<i>Vibrio</i> Presuntivos (UFC/ g)	Enterobactérias (UFC/ g)
<i>R. philippinarum</i>	Óbidos	$4,5 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$
<i>R. decussatus</i>		$1,1 \times 10^4$	$8,7 \times 10^3$
<i>R. decussatus</i>	Algarve	$3,8 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$

3.2 Isolamento bacteriano

Foram obtidos 61 isolados, 43 isolados presuntivos do género *Vibrio*, no meio TCBS e 18 enterobactérias no meio Chromocult, distribuídos conforme mostrado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Isolados totais, presentes nas amêijoas

Molusco	Local de amostragem	<i>Vibrio</i> presuntivo	Enterobactérias
<i>R. philippinarum</i>	Óbidos	14	5
<i>R. decussatus</i>		14	11
<i>R. decussatus</i>	Algarve	15	2
Total		43	18

Além disso, podemos mencionar que, no meio Chromocult, foi possível identificar presuntivamente, três espécies diferentes de enterobactérias, em função da cor da colónia no meio nomeadamente *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii* e *E. coli* (Tabela 3.3)

Tabela 3.3 Identidade das colônias isoladas em meio Chromocult em função da cor das UFCs no meio

Amostragem	Local de amostragem	Código	Cor colónia	Identidade presuntiva
<i>R. philippinarum</i>	Óbidos	NB01E	Branco	<i>E. faecalis</i>
		NB02E	Branco	<i>E. faecalis</i>
		NB03E	Violeta-azul	<i>E. coli</i>
		NB04E	Violeta-azul	<i>E. coli</i>
		NB05E	Violeta-azul	<i>E. coli</i>
<i>R. decussatus</i>		NJ01E	Branco	<i>E. faecalis</i>
		NJ02E	Violeta-azul	<i>E. coli</i>
		NJ03E	Violeta-azul	<i>E. coli</i>
		NJ04E	Violeta-azul	<i>E. coli</i>
		NJ05E	Vermelha	<i>C. freundii</i>
		NJ07E	Branco	<i>E. faecalis</i>
		NJ08E	Violeta-azul	<i>E. coli</i>
	NJ09E	Vermelha	<i>C. freundii</i>	
	NJ10E	Violeta-azul	<i>E. coli</i>	
	NJ11E	Branco	<i>E. faecalis</i>	
	NJ12E	Violeta-azul	<i>E. coli</i>	
	<i>R. decussatus</i>	Algarve	EB01E	Branco
EB02E			Vermelha	<i>C. freundii</i>

3.3 Testes de viabilidade de isolados conservados

Após a conservação de todos os isolados em triplicado, alguns foram testados para demonstrar a sua viabilidade e um correto processo de conservação. No total, 12 inóculos apresentaram crescimento para todos os isolados, resultados esperados devido ao uso de técnicas padronizadas para a conservação de microrganismos (Bermejo, 2000), semelhante ao trabalho de (Ianez, 2006), cujos autores procuraram padronizar métodos de preservação para isolados de laboratório, demonstrando que a preservação em glicerina, seguida de armazenamento em baixas temperaturas (-80°C), é uma boa alternativa para preservação de bactérias.

3.4 Testes de crescimento dos membros isolados do género *Vibrio*

Devido à necessidade de garantir as condições ideais de crescimento dos *Vibrio* e de normalizar as condições para a realização subsequente do antibiograma foi preciso a otimização das condições de crescimento, todos os resultados são mostrados na tabela 3.4 na Figura 3.1

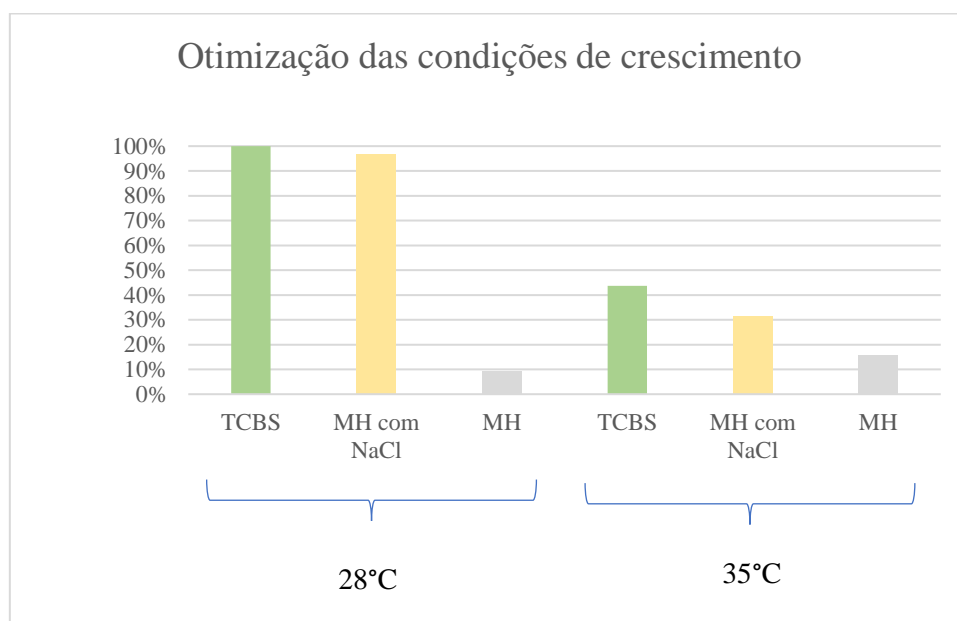


Figura 3.1 Resultados de crescimento nas condições testadas. Os dados são apresentados em crescimento percentual de isolados em cada meio. A tabela mostra Comparações entre temperaturas de crescimento para o género *Vibrio* com cada meio, meio seletivo para TCBS, Muller-Hinton suplementado com NaCl e Muller-Hinton sem suplementação a 28 e 35°C.

As condições que permitiram a crescimento de todos os isolados foram crescimento em TCBS a 28°C onde podemos observar um 100% de crescimentos, seguido de MH suplementado com NaCl com quase 100% dos crescimentos, observamos um efeito negativo do aumento da temperatura na resposta do crescimento dos isolados. A 35°C os crescimentos diminuem para valores inferiores a 50% em todas os meios testados.

Tabela 3.4 Testes de crescimento dos isoladas presuntivamente *Vibrio* em diferentes meios, temperatura e presença de NaCl.

Isolado	28°C			35°C		
	TCBS	Muller-Hinton e 1,5% NaCl	Muller-Hinton sem NaCl	TCBS	Muller-Hinton com NaCl	Muller-Hinton sem NaCl
NB04V	+	+	-	-	-	-
NB05V	+	+	-	-	-	-
NB06V	+	+	-	-	-	-
NB07V	+	+	-	+	+	-
NB08V	+	+	+	-	+	-
NB09V	+	+	-	-	+	-
NB10V	+	+	-	+	+	-
NB11V	+	+	+	-	+	-
NB12V	+	+	-	+	+	-
NB13V	+	+	-	+	+	+
NB14V	+	+	-	+	+	-
NB15V	+	+	-	-	-	-
NB16V	+	+	-	+	-	+
NB17V	+	+	-	+	-	-
NB18V	+	+	-	+	-	-
NB19V	+	+	-	+	-	-
NB20V	+	+	+	+	+	-
NB21V	+	+	-	+	-	-
NJ01V	+	+	-	-	-	-
NJ02V	+	+	-	-	-	-
NJ03V	+	+	-	-	-	-
NJ04V	+	+	-	-	-	-
NJ06V	+	+	-	+	-	+
NJ07V	+	+	-	+	-	+

NJ10V	+	+	-	-	-	-
NJ12V	+	+	-	+	+	+
NJ13V	+	+	-	-	-	-
NJ14V	+	+	-	-	-	-
NJ15V	+	+	-	-	-	-
NJ19V	+	-	-	-	-	-
NJ21V	+	+	-	-	-	-
NJ22V	+	+	-	-	-	-

Os melhores resultados de crescimento foram obtidos a 28°C na presença de NaCl a 1,5% (TCBS que contém NaCl e o meio Muller-Hinton suplementado com NaCl). O que vai de acordo com o trabalho de (Charles et al., 2019) e com o manual analítico bacteriológico da FDA (Percival & Williams, 2014) que demonstraram que microrganismos do gênero *Vibrio* crescem melhor em meios com adição de NaCl. Esta dependência de NaCl por parte dos vibrios pode ser devido a funções osmóticas, pois o Na⁺ atua nos sistemas de permeação das bactérias que originam a entrada de substratos exógenos (Soto et al., 2019), o que permite a especificidade de microrganismos para substratos sem gasto de energia (IPMA, 2020), o que comprova a necessidade de NaCl no meio para um crescimento ideal dos vibrios (Kieffer et al., 2019).

Por outro lado (Payne et al., 2015) sugere intervalos entre 20 e 40°C de temperatura nos quais os vibrios são capazes de crescer normalmente. Pesquisas recentes demonstram que os vibrios podem crescer mesmo a temperaturas abaixo de 10°C e acima de 37°C (Kalia et al., 2015), no entanto, isso é contraditório com os resultados observados neste trabalho, no qual o crescimento a 35°C foi impeditivo para a maioria dos isolados, o que pode ser devido as condições ambientais de onde provêm as nossas amostras, a água do Atlântico que raramente excede 20°C (Krus, 2017).

3.5 Resistência a antimicrobianos e identificação dos isolados resistentes à colistina

Após realizar antibiogramas de todos os isolados obtidos, apenas foram encontrados três isolados resistentes a colistina: EB07V isolado de *Ruditapes decussatus* proveniente da Ria Formosa e no Algarve e NJ21V e NJ22V isolados de *Ruditapes philippinarum* provenientes da Lagoa de Óbidos, os resultados são mostrados na Figura 3.2 e no Anexo 2. A colistina é usada para tratar infecções causadas por bactérias Gram-negativas, incluindo várias espécies de *Vibrio*, mas existem duas espécies *Vibrio vulnificus* e *Vibrio cholerae* que possuem resistência intrínseca a este antimicrobiano (Bier et al., 2015). Os resultados deste trabalho são controversos relativamente ao indicado anteriormente, pois não é expectável que os isolados obtidos neste trabalho pertençam às espécies descritas como tendo resistência intrínseca. Uma possível explicação para este facto é a aquisição de genes de resistência móveis (Kieffer et al., 2019), por parte dos isolados EB07V, NJ21V e NJ22V

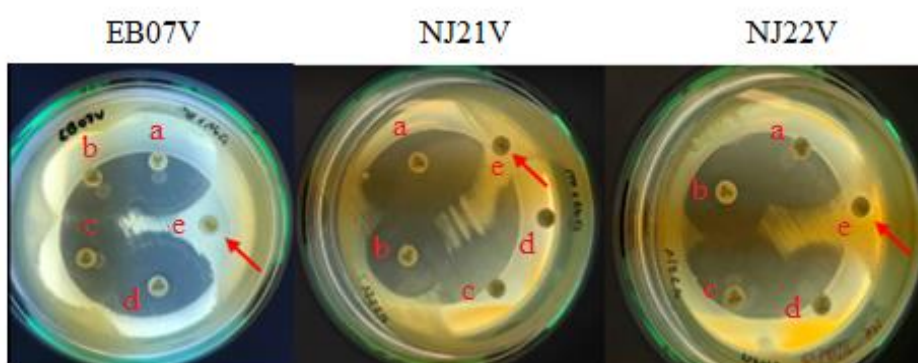


Figura 3.2 Antibiogramas das estirpes com resistência. A figura mostra os antibiogramas dos três isolados que apresentaram resistência com a seguinte rotulagem: a. Discos de cefotaxima (30 µg), b. Discos de imipenemo (10 µg), c. discos de ciprofloxacina (5 µg), d. Discos de meropenemo (10 µg) e. Discos de colistina (10 µg). A seta vermelha indica crescimento bacteriano com resistência.

A MIC dos isolados resistentes à colistina está apresentada na tabela 3.5

Tabela 3.5 Concentração Inibitória Mínima (MIC) de cada isolado com resistência fenotípica a colistina

Isolado	MIC (mg/L)
EB07V	> 256
NJ21V	48
NJ22V	0,64

Existem duas espécies *Vibrio vulnificus* e *Vibrio cholerae* com resistência intrínseca a colistina (Bier et al., 2015), sendo o uso de colistina, nos meios de cultura, usados para selecionar estes gêneros de organismos (See, 2003) contudo Lei, et al. (2020) descreve a presença de dois *V. parahaemolyticus* com resistência a colistina 2 mg/L, valores superiores ao apresentado pelo isolado NJ22V que apresentou MIC de 0,64 mg/L, mas consideravelmente menor que os isolados EB07V e NJ21V que registraram uma MIC \geq 256 mg/L e igual a 48 mg/L, respectivamente. Os resultados deste trabalho são contraditórios, devido à presença de isolados resistentes à colistina diferentes dos gêneros intrinsecamente resistentes (See, 2003).

Os microrganismos do gênero *Vibrio* não são facilmente identificados através da sequenciação do gene 16s DNA. Por esta razão optou-se por proceder a sua identificação através da sequenciação dos genes *recA* (Maeda et al., 2019), *groEL* (Teng et al., 2017), *rpoB* (Tarr et al., 2007) e *gryB* (Kalia et al., 2015) Os três isolados com resistência fenotípica à colistina foram identificados como membros do gênero *Vibrio* tabela 3.6 e anexo 3. Devido à semelhança fenotípica entre os isolados NJ21V e NJ22V foi necessário um alinhamento de suas sequências (Anexo 4) e uma comparação morfológica (Anexo 5) tendo-se concluindo que se trata de diferentes espécies.

É possível identificar *Vibrio* através da sequenciação de genes *house keeping* (Payne et al. em 2005). Estes genes estão envolvidos em diferentes mecanismos celulares importantes, como a síntese e reparação do DNA, recombinação genética e divisão celular, motivo pelo qual são amplamente utilizados para identificação e classificação bacteriana sendo considerado um método complementar de identificação de

microrganismos (Maeda et al., 2019) no entanto, a identificação dos isolados resistentes à colistina não foi possível de forma inequívoca possivelmente devido à alta heterogeneidade intra-genômica presente em membros da família Vibrionaceae (Thompson et al., 2009), portanto, análises adicionais são necessárias para a sua identificação, nomeadamente análises bioquímicas (Overman et al., 1985). As galerias API poderão ser usadas em trabalhos futuros e contribuir para a identificação destes isolados.

De acordo com a análise de caracterização bacteriana usando genes *house keeping* (*rpoA*, *recA*, *pyrH*, *gyrB* and *gapA*), um isolado é definido como pertencendo a uma espécie se possuir >95% ou mais de identidade de DNA (Thompson et al., 2009). Estes valores não são alcançados nos isolados resistentes à colistina, portanto, não foi possível identificar claramente a espécie, no entanto, os genes usados neste trabalho são suficientes para chegar a uma aproximação dos géneros presentes na amostra.

Tabela 3.6 Percentagem de identidade dos isolados

Isolado	Gene	Identidade	Percentagem
EB07V	<i>recA</i>	<i>Vibrio mediterranei</i>	91,03
		<i>Vibrio tubiashii</i>	89,51
		<i>Vibrio sinaloensis</i>	89,19
	<i>16s</i>	<i>Vibrio hangzhouensis</i>	98,56
		<i>Vibrio hangzhouensis</i>	98,5
		<i>Vibrio hangzhouensis</i>	98,1
	<i>rpoB</i>	<i>Vibrio mediterranei</i>	96,35
		<i>Vibrio mediterranei</i>	96,04
		<i>Vibrio campbellii</i>	89,63
	<i>gyrB</i>	<i>Vibrio maritimus</i>	94,82
		<i>Vibrio variabilis</i>	93,27
		<i>Vibrio mediterranei</i>	89,11
	<i>groEL</i>	<i>Vibrio mediterranei</i>	92,46
		<i>Vibrio mediterranei</i>	91,96
		<i>Vibrio alginolyticus</i>	88,89
NJ21V	<i>recA</i>	<i>Vibrio hippocampi</i>	87,61
		<i>Vibrio ichthyenteri</i>	87,58
		<i>Vibrio ichthyenteri</i>	87,46
	<i>16s</i>	<i>Vibrio hepatarius</i>	99,33
		<i>Vibrio scopthalmi</i>	99,09
		<i>vibrio atypicus</i>	99,08
<i>rpoB</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	88,75	

	<i>groEL</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	88,64
		<i>Vibrio anguillarum</i>	88,64
		<i>Vibrio mediterranei</i>	88,7
		<i>Vibrio mediterranei</i>	88,28
		<i>Vibrio alginolyticus</i>	87,81
NJ22V	<i>recA</i>	<i>Vibrio hippocampi</i>	87,6
		<i>Vibrio ichthyoenteri</i>	87,56
		<i>Vibrio ichthyoenteri</i>	87,44
	<i>16s</i>	<i>Vibrio scophthalmi</i>	98,68
		<i>Vibrio sinaloensis</i>	98,2
		<i>Vibrio sinensis</i>	98,01
	<i>rpoB</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	88,78
		<i>Vibrio anguillarum</i>	88,74
		<i>Vibrio anguillarum</i>	88,74
	<i>groEL</i>	<i>Vibrio mediterranei</i>	87,42
		<i>Vibrio crassostreae</i>	87,08
		<i>Vibrio splendidus</i>	86,86

Em verde são mostrados os valores de semelhança mais elevados obtidos para as espécies de *Vibrio*.

3.6 Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos

Dos testes realizados com os 23 pares de primers selecionados para este trabalho, foram obtidos resultados positivos apenas para o gene *mcr-1* que confere resistência à colistina, nos três isolados com resistência fenotípica ao mesmo antimicrobiano.

Várias investigações foram realizadas sobre a resistência apresentada por membros do género *Vibrio* a vários tipos de antimicrobianos sendo que a resistência a β -lactâmicos tem sido comumente demonstrada através da presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, e *bla*_{NDM-1} (Silvester et al. 2019). Resultados semelhantes aos descrito não foram encontrados neste trabalho uma vez que nenhum gene de resistência a este grupo de antimicrobianos foi encontrado.

Zhang et al., 2018 encontraram genes de resistência a quinolona (*qnr* e *qepA*) em membros do género *Vibrio*. No entanto, os resultados obtidos no nosso trabalho não mostraram a presença destes genes nos isolados.

Wise et al. em 2018 encontrou genes *mcr* de resistência a colistina em membros da família Enterobacteriaceae, *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter cloacae* entre outros, genes que não foram encontrados nos nossos isolados de enterobactérias, mas sim em três isolados pertencentes ao género *Vibrio*, EB07V, NJ21V e NJ22V.

Porém a resistência à colistina mediada por genes *mcr*, praticamente não foi relatada em bactérias do género *Vibrio*, existe apenas uma publicação para *V. parahaemolyticus* (Lei et al., 2019), cujo trabalho foi realizado a partir de alimentos na China; estudos semelhantes de *Vibrio* com resistência adquirida à colistina não foram encontrados na Europa.

Além disso, nove alelos *mcr-1* a *mcr-9* que conferem resistência à colistina foram testados para os 3 isolados que apresentaram resistência, sendo que se obtiveram resultados positivos apenas para o gene *mcr-1* (resultados presentes na Tabela 3.7).

Tabela 3.7 Resultados de PCRs, pesquisa genes móveis *mcr*

Genes <i>mcr</i>	Isolados		
	EB07V	NJ21V	NJ22V
<i>mcr-1</i>	+	+	+
<i>mcr-2</i>	-	-	-
<i>mcr-3</i>	-	-	-
<i>mcr-4</i>	-	-	-
<i>mcr-5</i>	-	-	-
<i>mcr-6</i>	-	-	-
<i>mcr-7</i>	-	-	-
<i>mcr-8</i>	-	-	-
<i>mcr-9</i>	-	-	-

3.7 Extração de plasmídeos

As extrações de plasmídeos foram feitas apenas para os isolados que apresentaram resistência fenotípica a colistina (EB07V, NJ21V, NJ22V) e os plasmídeos foram visualizados em géis de agarose, somente foi possível extrair os plasmídeos dos isolados EB07V e NJ21V não tendo sido possível o isolamento de plasmídeo do isolado NJ22V (Figura 3.3). Isto pode ser devido a problemas na extração do plasmídeo do isolado NJ22V, uma quantidade baixa do plasmídeo obtido na extração, uma possível degradação parcial do plasmídeo na amostra (Hanold & Vadamalai, 2017) ou ao facto de o isolado não conter plasmídeo. A resistência à colistina apresentada pelo isolado NJ22V poderá dever-se ao fato de o gene estar presente no DNA cromossómico (Shen, et al., 2018). Os plasmídeos são vetores importantes para a comunicação genética entre bactérias, pois a sua troca promove adaptação e taxas evolutivas rápidas das bactérias para o meio ambiente, sendo que existem atualmente mais de 4.600 sequências de plasmídeos descritas (Shintani et al., 2015), estes desempenham papéis importantes na transmissão de resistência antimicrobiana e foram encontrados em praticamente todas as famílias bacterianas (Millan, 2018).

O género *Vibrio* não é exceção, plasmídeos contendo genes de resistência a vários tipos de antimicrobianos e, em alguns casos, mais de três genes de resistência foram encontrados no mesmo plasmídeo (Tao et al., 2020), da mesma forma que neste estudo, vários plasmídeos diferentes foram relatados em *Vibrio* (Yang et al., 2019).

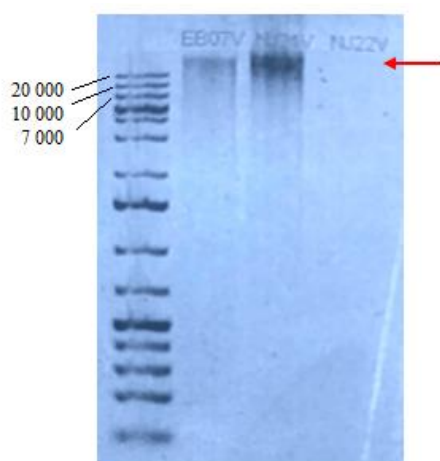


Figura 3.3 Visualização dos plasmídeos extraídos dos isolados com resistência fenotípica a colistina em gel de agarose. A figura mostra, no primeiro poço o marcador de pesos moleculares

e nos poços subsequentes os plasmídeos extraídos dos isolados EB07V e NJ21V, e NJ22V. A seta vermelha indica a posição dos plasmídeos no gel, com tamanho superior a 20.000 bp.

O resultado dos PCRs realizados mostrou a presença do gene *mcr-1* nos isolados EB07V, NJ21V e NJ22V (Figura 3.4). As sequências obtidas no PCR foram comparadas nas bases de dados e foi possível obter identidade de 100% para o gene *mcr-1*. As sequências e comparações são mostradas no Anexo 6.

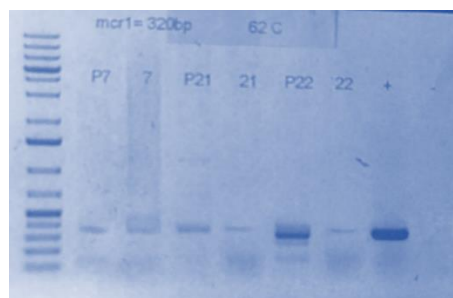


Figura 3.4 Gel de agarose com produtos de PCR para o gene *mcr-1* dos plasmídeos e do DNA total dos isolados (EB07V, NJ21V e NJ22V). No primeiro poço encontra-se o marcador de pesos moleculares e nos poços subsequentes: P7. Gene *mcr-1* presente no plasmídeo do isolado EB07V, 7. *mcr-1* presente no DNA isolado de EB07V, P21. Gene *mcr-1* presente no plasmídeo do isolado NJ21V, 21. *mcr-1* presente no DNA isolado de NJ21V, P22. Gene *mcr-1* presente no plasmídeo do NJ22V, 22 *mcr-1* presente no DNA isolado de NJ22V, (+) *mcr-1* controle positivo, (-) controle negativo.

Os resultados do alinhamento das sequências de *mcr-1* obtidas dos isolados resistentes demonstram que não há diferença entre as sequências (Figura 3.5)

```

mcr1EB07V      AAICAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGICGT      60
mcr1NJ21V      -----CCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGICGT      49
mcr1NJ22V      -----CCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGICGT      54
                *****

mcr1EB07V      GCICTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAA      120
mcr1NJ21V      GCICTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAA      109
mcr1NJ22V      GCICTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAA      114
                *****

mcr1EB07V      GCCTGTGTTGATTTTGTCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTA      180
mcr1NJ21V      GCCTGTGTTGATTTTGTCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTA      169
mcr1NJ22V      GCCTGTGTTGATTTTGTCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTA      174
                *****

mcr1EB07V      TGGCACGGTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAG      223
mcr1NJ21V      TGGCACGGTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAG      212
mcr1NJ22V      TGGCACGGTCTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAG      217
                *****

```

Figura 3.5 Alinhamentos das sequências *mcr-1* presentes nos 3 *Vibrios* com resistência à colistina. CLUSTAL *O(1.2.4)* multiple sequence alignment das As sequencias *mcr-1* presentes em *Vibrio* aislados de dos especies de almeijoas . Não se observa variação genética nos fragmentos sequenciados.

3.8 Transformação bacteriana

Depois que todo o protocolo de transformação ser concluído, não se verificou crescimento das bactérias transformadas. Este facto pode sugerir uma falha no procedimento executado devido a problemas de manipulação, má qualidade do DNA plasmídico, problemas relacionados com as células competentes (Tarr et al., 2007) ou a impossibilidade de mobilização do plasmídeo. Por este motivo é necessário repetir a transformação ou recorrer a outros métodos para demonstrar a mobilidade genética

Apesar do elevado número de publicações que associam aos genes *mcr* com as Enterobactérias, publicações recentes sugerem diferentes grupos de origem: *Moraxella*, *Enhydrobacter*, *Methylophilaceae*, *Limnobacter* e os *Vibrios* como fontes primárias do gene (Khedher et al., 2020), estas últimas estudadas neste trabalho, o que pode sugerir a presença do gene nos nosso isolados e explicar de certa maneira a sua baixa mobilidade.

4 Conclusões

Com os resultados obtidos pode concluir-se que a carga microbiana de *Vibrio* spp. e enterobactérias encontradas nos moluscos *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* é baixa, tanto na Lagoa de Óbidos como na Ria Formosa no Algarve. As enterobactérias que foram isoladas não possuem genes que lhes confirmam resistência a quinolonas, β -lactamases de largo espectro, carbapememos, nem à colistina. Enquanto os membros do género *Vibrio* isolados não possuem genes que conferem resistência às quinolonas, nem β -lactamases de largo espectro, mas possuem genes móveis de resistência à colistina. No entanto, estes genes não apresentam elevado potencial de mobilização, pelo que a sua transferência não pôde ser demonstrada. Portanto, no futuro será importante realizar testes que comprovem a transferência dos genes de resistência entre bactérias.

5 Perspetivas futuras

É necessária uma identificação mais específica das espécies de *Vibrio* presentes nas amêijoas, o qual pode ser realizado através do análises bioquímicas (Karki, 2018). Assim como a utilização de muitos outros genes para a sua identificação que poderiam ser considerados opções *dnaJ*, *flaE*, *hsp60*, *notI*, *ompW*, , *rpoA*, *rpoB*, *rpoX*, *rpoS*, *sfI*, *sodB*, *tdh*, *tlh*, *toxR*,, *trh*, *vcgC* , *vhhP2*, *viuB* e *vvhA* (Bucner et al., 2018).

Por outro lado, a realização de testes de transferência também e muito importante, A capacidade de transferir o gene *mcr-1* móvel de *Vibrio* para as enterobactérias ou outros géneros bacterianas pode ser determinado através da conjugação bacteriana.

Tambem é necessário realizar uma cura do plasmídeo para demonstrar se os genes de resistências estão efetivamente presentes nos plasmídeos o ou estes estão presentes no DNA cromossómico (Sawabe et al., 2007).

Este trabalho poderá ajudar a entender a disseminação de genes de resistência entre diferentes espécies bacterianas e auxiliaria em outras pesquisas sobre resistência à colistina, gerando um amplo panorama para futuras pesquisas sobre *Vibrio* com resistência a antimicrobianos.

Referências

- Acevedo, R., Severiche, A., & Morales, J. (2015). *Antibiotic resistant bacteria in aqueous ecosystems*.
- Andrade, L., & Darini, A. (2017). Bacilos Gramnegativos produtores de β -lactamases: *bla* genes *Journal of Infection Control*, 6(1), 16–25.
- Álvarez, D., Garza, G., & Vázquez, R. (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Revista Chilena de Infectología*, 32(5), 499–504.
- Álvarez, Martínez, López, & Alfayate. (2017). *Revisión Quinolonas en Pediatría*. 19(74), undefined-undefined.
- Bajpai, T., Pandey, M., Varma, M., & Bhatambare, G. (2017). Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M β -Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna Journal of Medicine*, 7(1), 12.
- Baker, C. (2015). Antimicrobial Resistance in *Vibrio* Species. In *Antimicrobial Resistance and Food Safety: Methods and Techniques* (pp. 105–118). Elsevier Inc.
- Baker, C., Oliver, J., Alam, M., Ali, A., Waldor, M., Qadri, F., & Martinez, J. (2018). *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1).
- Bermejo, I. (2000). Diagnóstico de las infecciones humanas causadas por especies halófilas del género *Vibrio*. *Servicio de Microbiología, Hospital de Getafe*, 1–6.
- Bina, M., Pournajaf, A., Mirkalantari, S., Talebi, M., & Irajian, G. (2015). Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in *K.pneumoniae* isolated from the clinical samples by the phenotypic and genotypic methods. *Iranian Journal of Pathology*, 10(3), 199–205.
- Blakely, G. W. (2014). Mechanisms of Horizontal Gene Transfer and DNA Recombination. In *Molecular Medical Microbiology: Second Edition* (Vols. 1–3, pp. 291–302). Elsevier Ltd.

- Brandão, M., Lopes, A. S., da Silva Neta, M., de Oliveira, R., Farias, R., Passos, R., Albuquerque, G. R., Gonçalves, V. D., dos Prazeres Rodrigues, D., Boehs, G., & Maciel, B. M. (2017). Microbiological quality and prevalence of β -lactam antibiotic resistance genes in oysters (*Crassostrea rhizophorae*). *Journal of Food Protection*, 80(3), 488–496.
- Brito, P. (2016). *Aquacultura já vale 54 milhões. E há todo um mar de oportunidades*. <https://www.dinheirovivo.pt/economia/aquacultura-ja-vale-54-milhoes-e-ha-todo-um-mar-de-oportunidades/>
- Bucner, M., Ciusa, M., & Piddock, L. (2018). *Strategies to combat antimicrobial resistance: anti-plasmid and plasmid curing*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6199537/>
- Burnett, S., & McCarthy, B. (2011). Antimicrobial treatments of textiles for hygiene and infection control applications: an industrial perspective. In *Textiles for Hygiene and Infection Control* (pp. 196–209). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857093707.3.196>
- Bustillo, F. (2015). *β -LACTAMICOS. - ppt descargar*. <https://slideplayer.es/slide/3894295/>
- Calvo, J., & Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52.
- Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldemann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M. (2019). Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype typhimurium isolate. *MBio*, 10(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00853-19>
- Cartwright, E., & Griffin, P. (2012). Other *Vibrio* Species. In *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases: Fourth Edition* (pp. 854-856.e1). Elsevier Inc.
- Charles, K., Angelo, P., & Jones, J. (2019). *BAM: Vibrio* | FDA. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-vibrio>

- Chen, Y. L., Lee, C. C., Lin, Y. L., Yin, K. M., Ho, C. L., & Liu, T. (2015). Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. *BMC Bioinformatics*, *16*(18), S13.
- Cordero, D., Delgado, M., Liu, B., Ruesink, J., & Saavedra, C. (2017). Population genetics of the *Manila clam* (*Ruditapes philippinarum*) introduced in North America and Europe. *Scientific Reports*, *7*.
- Correia, B. E. (2016). *Abundancia, diversidad y perfiles de multirresistencia de bacterias cultivables resistentes a los antibióticos en la ría de Huelva y La Chorrera de Despeñalaguna (Guadalajara)*.
- Cruz, E., Sanchez, E., & Rojas, S. (2014). *In silico study of molecular bases in the β -lactam antibiotics activity*.
<http://revzoilomarinaldo.sld.cu/index.php/zmv/article/view/168/303>
- Curtis, H., & Schnek, A. (2000). *Curtis. Biología - Helena Curtis, Adriana Schnek - Google Libros*.
https://books.google.pt/books?id=mGadUVpdTLsC&printsec=frontcover&hl=es&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Dahanayake, P. S., Hossain, S., Wickramanayake, M. V. K. S., Wimalasena, S. H. M. P., & Heo, G. J. (2019). *Manila clam* (*Ruditapes philippinarum*) marketed in Korea as a source of *vibrios* harbouring virulence and β -lactam resistance genes. *Letters in Applied Microbiology*.
- Daubin, V., & Szöllősi, G. J. (2016). Horizontal gene transfer and the history of life. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(4).
- Dellepiane, H., & Morales, S. (2018). Identification of opportunistic pathogenic bacteria in the uterus of alpaca pre-and post-copula. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *29*(2), 602–610.
- Dubert, J., Osorio, C. R., Prado, S., & Barja, J. L. (2016). Persistence of Antibiotic Resistant *Vibrio* spp. in Shellfish Hatchery Environment. *Microbial Ecology*, *72*(4), 851–860.

- Egas, C., Mishell, T., & Maldonado, M. (2016). *Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelos de las regiones naturales de Ecuador*. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/12142>
- Ehlers, M., Veldsman, C., Makgotlho, E., Dove, M., Hoosen, A., & Kock, M. (2009). Detection of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} antibiotic resistance genes in randomly selected bacterial pathogens from the Steve Biko Academic Hospital. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 56(3), 191–196. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00564.x>
- Eiler, A., Gonzalez-Rey, C., Allen, S., & Bertilsson, S. (2007). Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio* spp. to cyanobacterial dissolved organic matter and temperature in brackish water. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(3), 411–418
- FAO. (2018a). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. <https://doi.org/CC BY-NC-SA 3.0 IGO>
- FAO. (2018b). *FAO - *Ruditapes philippinarum**. http://www.fao.org/tempref/FI/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_japanesecarpshell.htm
- FAO. (2019). *FAO Fisheries & Aquaculture - Species Fact Sheets - *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758)*. <http://www.fao.org/fishery/species/3542/en>
- Fonseca, É., Freitas, F., Vieira, V., & Vicente, A. (2008). New qnr gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerging Infectious Diseases*, 14(7), 1129–1131.
- Fresnadillo, M., Garcia, M., Garcia, E., & Garcia, J. (2015). *Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias*. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X10700318>
- Garcia, A. (2018). *Detecção de Enterobactérias e vírus entéricos em frutos do mar no Estado de São Paulo*.
- Garcia, Castillo, & Salazar. (2014). *Mecanismos de resistencia a β -lactámicos en bacterias gramnegativas*.

- Gelambi, M. (2018). *Pared Celular: Características, Funciones y Estructura - Lifereder*. <https://www.lifereder.com/pared-celular/>
- Gomez, J., Vazquez, E., & Hernandez, A. (2015). Los β -lactámicos en la práctica clínica. *International Journal of Immunopharmacology*, 4(4), 361.
- Gutiérrez, C., Labarca, J., Román, J. C., Sanhueza, F., Moraga, M., Wozniak, A., & García, P. (2013). Vigilancia de Enterobacterias productoras de carbapenemasas en cultivos rectales en un hospital Universitario de Santiago, Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 30(1), 103–106.
- Hanold, D., & Vadamalai, G. (2017). Gel Electrophoresis. In *Viroids and Satellites* (pp. 357–367). Elsevier Inc.
- Harris, P., Tambyah, P., Lye, D., Mo, Y., Lee, T., Yilmaz, M., Alenazi, T., & Arabi, Y. (2018). Effect of piperacillin-tazobactam vs meropenem on 30-day mortality for patients with e coli or *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection and ceftriaxone resistance. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 320(10), 984–994.
- He, Y., Guo, X., Xiang, S., Li, J., Li, X., Xiang, H., He, J., Chen, D., & Chen, J. (2016). Comparative analyses of phenotypic methods and 16S rRNA, *khe*, *rpoB* genes sequencing for identification of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 109(7), 1029–1040.
- Helm, M. (2006). *Cultivo de bivalvos en criadero Un manual práctico*.
- Hossain, M., Kim, Y., & Kong, S. (2014). PCR-restriction fragment length polymorphism analysis using *groEL* gene to differentiate pathogenic *Vibrio* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(1), 9–11.
- Hosseinzadeh, Z., Sedigh Ebrahim-Saraie, H., Sarvari, J., Mardaneh, J., Deghani, B., Rokni-Hosseini, S. M. H., & Motamedifar, M. (2018). Emerge of bla NDM-1 and bla OXA-48-like harboring carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalized patients in southwestern Iran. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(6), 536–540.

- Ianez, E. (2006). *Microbiologia General*.
<http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/06membrana.htm>
- INE. (2019). *Estatísticas da Pesca 2018*. Instituto Nacional de Estatística, I. P.
https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=358627638&PUBLICACOESstema=55505&PUBLICACOESmodo=2
- IPAC. (2019). *La producción de acuicultura de Portugal creció en 2017 un 11,5 % - En Portada - Noticias web y revista digital de acuicultura. Publicación.*
- IPMA. (2020). *IPMA - Temperatura da superfície do mar.*
<https://www.ipma.pt/pt/maritima/sst/>
- Jacoby, G. (2009). AmpC β -Lactamases. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 22, Issue 1, pp. 161–182). American Society for Microbiology (ASM).
- Jiang, D., Zhu, W., Wang, Y., Sun, C., Zhang, K. Q., & Yang, J. (2013). Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: Recent advances and new strategies. In *Biotechnology Advances* (Vol. 31, Issue 8, pp. 1562–1574).
- Kalia, V., Kumar, P., Kumar, R., Mishra, A., & Koul, S. (2015). Genome Wide Analysis for Rapid Identification of *Vibrio* Species. *Indian Journal of Microbiology*, 55(4), 375–383.
- Karki, G. (2018). *Bacterial Conjugation: steps and mechanism of transfer of plasmid from donor to recipient cell - Online Biology Notes.*
<https://www.onlinebiologynotes.com/bacterial-conjugation/>
- Karl, D., & Perlin, D. (2011). *Antibiotic Resistance: Understanding and Responding to an Emerging Crisis.*
https://books.google.pt/books?id=YUppJBKFwPwC&pg=PA83&lpg=PA83&dq=enzyme+MfpA&source=bl&ots=LLKekd7rcy&sig=ACfU3U3ibHCsDf75L6wLUXfRMsOaidZ93Q&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjn0Zzn_NbpAhWS2BQKHUdqCUEQ6AEwAXoECAoQAQ#v=onepage&q=enzyme MfpA&f=false
- Khedher, M. ben, Baron, S. A., Riziki, T., Ruimy, R., Raoult, D., Diene, S. M., & Rolain, J. M. (2020). Massive analysis of 64,628 bacterial genomes to decipher

water reservoir and origin of mobile colistin resistance genes: is there another role for these enzymes? *Scientific Reports*, 10(1). ht

Kieffer, N., Royer, G., Decousser, J. W., Bourrel, A. S., Palmieri, M., de La Rosa, J. M. O., Jacquier, H., Denamur, E., Nordmann, P., & Poirel, L. (2019). Mcr-9, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in *Escherichia coli*, and Its Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(9).

Komski, L. (2014). 5 inhibidores de topoisomerasas y telomerasa para el estudio del cáncer / Wako. <https://www.wakolatinamerica.com/blog-reactivos/post/5-inhibidores-de-topoisomerasas-y-telomerasa-para-investigaciones-sobre-el-cancer/>

Krus, P. (2017). *Faculdade de Medicina Veterinária Instituto Superior de Agronomia Caracterização Microbiológica de Bivalves Vivos: Efeito do Transporte e Variação Temporal Entre Espécies* Patrícia Krus Policarpo
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA-PRODUÇÃO AN.
[https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/15226/1/Caracterização Microbiológica de Bivalves Vivos_Efeito do Transporte e Variação Temporal Entre Espécies.pdf](https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/15226/1/Caracterização%20Microbiológica%20de%20Bivalves%20Vivos_Efeito%20do%20Transporte%20e%20Variação%20Temporal%20Entre%20Espécies.pdf)

Lachmayr, K. L., Cavanaugh, C. M., Kerkhof, L. J., DiRienzo, A. G., & Ford, T. E. (2009). Quantifying nonspecific tem β -lactamase (blatem) genes in a wastewater stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 203–211.

Laranjeira, S. (2014). *Clams from Tagus estuary: microbiological, physiological and chemical responses to depuration, transport and environmental stress*.

Leyton, Y., & Riquelme, C. (2008). *Vibrio* en los sistemas marinos costeros. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43(3), 441–456.

Lima, C. C., Benjamim, S. C. C., & Santos, R. F. S. dos. (2017). Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. *CuidArte, Enferm*, 105–113.

Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D.,

- Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., & Shen, J. (2016). 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*, *16*(2), 161–168.
- Lozano, A., Garcia, C., Dalama, J., Rodriguez, R., Martinez, J., & Gonzalez, N. (2019). Detection of colistin resistance *mcr-1* gene in *Salmonella enterica* serovar Rissen isolated from mussels, Spain, 2012 to 2016. *Eurosurveillance*, *24*(16).
- Maeda, T., Horinouchi, T., Sakata, N., Sakai, A., & Furusawa, C. (2019). High-throughput identification of the sensitivities of an *Escherichia coli recA* mutant strain to various chemical compounds. *Journal of Antibiotics*, *72*(7), 566–573.
- Maeyama, Y., Taniguchi, Y., Hayashi, W., Ohsaki, Y., Osaka, S., Koide, S., Tamai, K., Nagano, Y., Arakawa, Y., & Nagano, N. (2018). Prevalence of ESBL/AmpC genes and specific clones among the third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae from canine and feline clinical specimens in Japan. *Veterinary Microbiology*, *216*, 183–189.
- Martínez, G. (2019). *Una pieza clave en la evolución. 1*, 1–12.
- Marulanda, J. (2019). *Cultivo de almejas (Bivalvia: Veneridae), información y especies indicadas*. <https://invertebrados.paradai-sphynx.com/informacion/cultivo-de-almejas.htm>
- Matveikova, I. (2018). *Bacterias, la revolución digestiva: los secretos de las bacterias que viven en nosotros: qué hacen, para qué sirven y cómo mandan en tu salud* (First).
- Medina, J. (2017). Actualización acerca de colistina (polimixina E): aspectos clínicos, PK/PD y equivalencias. *Revista Medica Del Uruguay*.
- Mella, M., Zemelman, M., Bello, T., Dominguez, Y., Gonzalez, R., & Zemelman, Z. (2001). Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. *Revista Chilena de Infectología*, *18*(1), 7–19.

- Morales, M. (2016). Antimicrobianos: una revisión sobre mecanismos de acción y desarrollo de resistencia. *Acta Méd. Costarric*, 28(2), 79–83.
- Morejon, M. (2013). β -lactamasas de espectro extendido. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232013000400006
- Mullis, M. M., Rambo, I. M., Baker, B. J., & Reese, B. K. (2019). Diversity, Ecology, and Prevalence of Antimicrobials in Nature. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, p. 2518). Frontiers Media S.A.
- Mulvey, M. R., Soule, G., Boyd, D., Demczuk, W., & Ahmed, R. (2003). Characterization of the first extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 460–462.
- Naranjo, J., Ortiz, S., & Lopez, L. (2019). Estandarización de un método para la conservación de cepas del laboratorio de microbiología de la Escuela de Química de la. 1–5.
- Nordmann, P., Poirel, L., Carrër, A., Toleman, M. A., & Walsh, T. R. (2011). How to detect NDM-1 producers. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(2), 718–721.
- Oliveira, V. (2018). *Segurança Sanitária Dos Moluscos Bivalves Vivos Produzidos Em Zonas Estuarinas Portuguesas E Respetivo Controlo Oficial*. 67.
- Payne, G., Vandamme, P., Morgan, S., LiPuma, J., Coenye, T., & Jones, T. H. (2015). Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3917–3927.
- Percival, S., & Williams, D. (2014). *Vibrio - an overview | ScienceDirect Topics*. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/vibrio>
- Pérez, P., Galán, F., Gutiérrez, D., & Guerrero, I. (2014). Infecciones por Enterobacterias. *Medicine (Spain)*, 11(55), 3276–3282.
- Raheem, N., & Straus, S. (2019). Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, p. 2866). Frontiers Media S.A.

- Rahimzadeh, M., Sadeghizadeh, M., Najafi, F., Arab, S., & Mobasheri, H. (2016). Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Molecular Biology Research Communications*, 5(4), 257–261.
- Rincón, G., Radice, M., Giovanakis, M., di Conza, J. A., & Gutkind, G. (2014). First report of plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump *QepA* in *Escherichia coli* clinical isolate ST68, in South America. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(1), 70–72.
- Rogério, R., Sousa, F. de, & Paulo, S. (2014). Universidade de São Paulo Faculdade de Saúde Pública Pesquisa de genes de resistência a quinolonas em bacilos Gram negativos de origem clínica e ambiental Pesquisa de genes de resistência a quinolonas em bacilos Gram negativos de origem clínica e ambiental.
- Rodriguez, J. (2005). *Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos / Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Rodríguez, M. (2005). Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(1), 25–31.
- Salah, F. D., Soubeiga, S. T., Ouattara, A. K., Sadjji, A. Y., Metuor-Dabire, A., Obiri-Yeboah, D., Banla-Kere, A., Karou, S., & Simpore, J. (2019). Distribution of quinolone resistance gene (*qnr*) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lomé, Togo. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 104.
- Salazar, N. (2018). *Vibrionaceae y Pseudomona: bacterias Gram-negativas causantes de enfermedades*.
- Sawabe, T., Kita, K., & Thompson, F. (2007). Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *Journal of Bacteriology*, 189(21), 7932–7936.
- Sedighi, M., Halajzadeh, M., Ramazanzadeh, R., Amirmozafari, N., Heidary, M., & Pirouzi, S. (2017). Molecular detection of β -lactamase and integron genes in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* by multiplex polymerase chain reaction. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(3), 321–328.

- See, H. (2003). Cellobiose polymyxin B colistin (CPC) agar. *Progress in Industrial Microbiology*, 37(C), 431–433.
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K., & Grossart, H. P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 4, Issue MAR). Frontiers Research Foundation.
- Shen, Y., Wu, Z., Wang, Y., Zhang, R., Zhou, H. W., Wang, S., Lei, L., & Li, M. (2018). Heterogeneous and flexible transmission of *mcr-1* in hospital-associated *Escherichia coli*. *MBio*, 9(4).
- Shen, Y., Xu, C., Sun, Q., Schwarz, S., Ou, Y., Yang, L., Huang, Z., Eichhorn, I., Walsh, T. R., Wang, Y., Zhang, R., & Shen, J. (2018). Prevalence and genetic analysis of *mcr-3*-positive aeromonas species from humans, retail meat, and environmental water samples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(9).
- Shirani, K., Ataei, B., & Roshandel, F. (2016). Antibiotic resistance pattern and evaluation of metallo- β -lactamase genes (VIM and IMP) in *Pseudomonas aeruginosa* strains producing MBL enzyme, isolated from patients with secondary immunodeficiency. *Advanced Biomedical Research*, 5(1), 124.
- Sosa, S. (2018). *Quinolonas: Mecanismo de Acción y Clasificación - Liferder*.
- Soto, S., Lozano, R., Palacios, D., Bolan, C., & Rendon, K. (2019). Characterization and growth conditions of *Vibrio parahaemolyticus* strains with different virulence degrees that cause acute hepatopancreatic necrosis disease in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(5), 1002–1015.
- Stefaniuk, E. M., & Tyski, S. (2019). Colistin Resistance in Enterobacterales Strains - A Current View. In *Polish journal of microbiology* (Vol. 68, Issue 4, pp. 417–427). NLM (Medline).
- Sun, D. (2018). Pull in and push out: Mechanisms of horizontal gene transfer in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP).
- Surat, P., & Davis, J. (2018). *Mecanismos de la acción antibiótico*. [https://www.news-medical.net/life-sciences/Mechanisms-of-Antibiotic-Action-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Mechanisms-of-Antibiotic-Action-(Spanish).aspx)

- Tao, Y., Zhou, K., Xie, L., Xu, Y., Han, L., Ni, Y., Qu, J., & Sun, J. (2020). Emerging coexistence of three PMQR genes on a multiple resistance plasmid with a new surrounding genetic structure of *qnrS2* in *E. coli* in China. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9(1).
- Tarr, C. L., Patel, J. S., Pühr, N. D., Sowers, E. G., Bopp, C. A., & Strockbine, N. A. (2007). Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 134–140.
- Teng, J. L. L., Tang, Y., Chiu, T. H., Cheung, C. L. W., Ngan, A. H. Y., Ngai, C., Wong, S. S. Y., Que, T. L., Lau, S. K. P., & Woo, P. C. Y. (2017). The *groEL* gene is a promising target for species-level identification of *tsukamurella*. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(2), 649–653.
- Thompson, C. C., Vicente, A. C. P., Souza, R. C., Vasconcelos, A. T. R., Vesth, T., Alves, N., Ussery, D. W., Iida, T., & Thompson, F. L. (2009). Genomic taxonomy of vibrios. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 258.
- Valle, D. (2009). (PDF) *β-lactamasas tipo AmpC: Generalidades y métodos para detección fenotípica*. https://www.researchgate.net/publication/262447017_β-lactamasas_tipo_AmpC_Generalidades_y_metodos_para_deteccion_fenotipica
- Villa, T. G., Feijoo-Siota, L., Sánchez-Pérez, A., Rama, J. L. R., & Sieiro, C. (2019). Horizontal Gene Transfer in Bacteria, an Overview of the Mechanisms Involved. In *Horizontal Gene Transfer* (pp. 3–76). Springer International Publishing.
- Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., & Zong, Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1), 508–516.
- WoRMS. (2015). *WoRMS - World Register of Marine Species - Photogallery*.
- WoRMS. (2019). *WoRMS - World Register of Marine Species - Ruditapes decussatus (Linnaeus, 1758)*.

- Yan, L., Liu, D., Wang, X. H., Wang, Y., Zhang, B., Wang, M., & Xu, H. (2017). Bacterial plasmid-mediated quinolone resistance genes in aquatic environments in China. *Scientific Reports*, 7.
- Yuson, C. L., Katelaris, C. H., & Smith, W. B. (2018). Cephalosporin allergy label is misleading. *Australian Prescriber*, 41(2), 37–41.
- Zhang, Y., Zheng, Z., Chan, E. W. C., Dong, N., Xia, X., & Chenb, S. (2018). Molecular characterization of QnrVC genes and their novel alleles in *Vibrio* spp. isolated from food products in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(7).

ANEXOS

Anexo 1. Lista de Primers e condições de PCR

Primers	Tamanho (bp)	Sequências		Tempo (seg.)	Temperatura (°C)	Referência	
		Fw	Re				
<i>recA</i>	700	Fw	GTCTACCAATGGGTCGTATC	30	60	(Chen et al., 2015)	
		Re	GCCATTGTAGCTGTACCAAG				
<i>16s</i>	1500	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	40	56	(Hossain et al., 2014)	
		1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT				
<i>groEL</i>	1100	Fw	TCCARAACATGGGGCGCACAA	35	68	(Sawabe et al., 2007)	
		Re	ACGTTTTGYTCTTCGTTGTCRC				
<i>gryB</i>	1300	Fw	GAAGTTATCATGACGGTACTTC	30	58	(He et al., 2016)	
		Re	AGCGTACGAATGTGAGAACC				
<i>rpoB</i>		vic2	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	30	51,5	(Shirani et al., 2016)	
		vic3	GGCGAAATGGCWGAGAACCA				
<i>qnrS</i>	428	Fw	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	30	54	(Cattoir et al., 2007)	
		Re	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG				
<i>qnrA</i>	580	Fw	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	30	54	(Wang et al., 2009)	
		Re	TGCCAGGCACAGATCTTGAC				
<i>qnrB</i>	264	Fw	GGMATHGAAATTCGCCACTG	30	54		
		Re	TTTGCYGYCGCCAGTCGAA				
<i>qnrC</i>	320	Fw	GGGTTGTACATTTATTGAATC	30	50		
		Re	TCCACTTTACGAGGTTCT				
<i>qnrD</i>	644	Fw	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	25	50	(Cavaco et al., 2009)	
		Re	AACAAGCTGAAGCGCCTG				
<i>qepA</i>	596	Fw	AACTGCTTGAGCCCGTAGAT	20	50	(Kim et al., 2009)	
		Re	GTCTACGCCATGGACCTCAC				
<i>bla_{IMP}</i>	232	Fw	GGAATAGAGTGGCTTAA Y TCTC	15	50	(Bina et al., 2015)	
		Re	GGTTTAA Y AAAACAACCACC				
<i>Bla_{VIM}</i>	390	Fw	GATGGTGTGGTTCGCATA	25	55		
		Re	CGAATGCGCAGCACCAG				
<i>bla_{KPC}</i>	798	Fw	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	25	52		(Nordmann et al., 2011)
		Re	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG				
<i>bla_{NDM}</i>	621	Fw	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	25	52		(Hosseinzadeh et al., 2018)
		Re	CGGAATGGCTCATCACGATC				
<i>bla_{OXA}</i>	438	Fw	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	25	52		(Mulvey et al., 2003)
		Re	CATCAAGTTCAACCCAACCG				
<i>bla_{CTX-M}</i>	593	U1	ATGTGCAG Y ACCACTAAR GT KATGGC	25	60	(Ehlers et al., 2009)	
		U2	TGGGT RAART ARGTSACCAGAA Y CAGCGG				
<i>bla_{SHV}</i>	747	Se	ATGCGTTATATTCGCCTGTG	25	55	(Sedighi et al., 2017)	
		As	TGCTTTGTTATTCGGGCCAA				

<i>bla_{TEM}</i>	445	Se	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA	25	50	(Sedighi et al., 2017)
		As	ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT			
<i>mcr-1</i>	320	Fw	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	20	58	(Rebelo et al., 2018)
		Re	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG			
<i>mcr-2</i>	715	Fw	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	25	58	
		Re	TCTAGCCCGACAAGCATACC			
<i>mcr-3</i>	929	Fw	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	30		
		Re	AATGGAGATCCCCGTTTTT			
<i>mcr-4</i>	1116	Fw	TCACTTTCATCACTGCGTTG	45		
		Re	TTGGTCCATGACTACCAATG			
<i>mcr-5</i>	1644	Fw	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	45		
		Re	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG			
<i>mcr-6</i>	556	Fw	GTCCGGTCAATCCCTATCTGT	25		
		Re	ATCACGGGATTGACATAGCTAC			
<i>mcr-7</i>	892	Fw	TGCTCAAGCCCTTCTTTTCGT	30	55	
		Re	TTCATCTGCGCCACCTCGT			
<i>mcr-8</i>	667	Fw	AACCGCCAGAGCACAGAATT	30	60	
		Re	TTCCCCAGCGATTCTCCAT			
<i>mcr-9</i>	389	Fw	CGGTACCGCTACCGCAATAT	30	58	
		Re	ATAACAGCGAGACACCGGTT			

Anexo 2. Antibiogramas

Isolado	CT Colistina (mm)	IPM Imipenemo (mm)	CTX Cefotaxima (mm)	MEM Meropenemo (mm)	CIP Ciprofloxacima (mm)
NB04V	13	32	37	30	27
NB08V	20	35	37	39	32
NB09V	22	25	32	32	34
NB10V	35	40	37	36	35
NB11V	22	32	35	36	26
NB12V	25	33	30	35	35
NB13V	40	39	40	37	36
NB14V	39	40	36	38	36
NB15V	18	30	36	34	27
NB16B	22	30	36	33	28
NB17V	22	31	35	34	29
NB18V	22	32	37	35	27
NB19V	13	30	34	32	28
NB20V	14	34	37	40	29
NB21V	20	34	40	36	30
NJ01V	19	30	36	33	28
NJ02V	18	34	38	32	30
NJ04V	19	35	40	33	29
NJ06V	13	32	37	32	26
NJ07V	15	27	35	32	27
NJ10V	40	37	36	40	34
NJ12V	20	34	40	35	30
NJ13V	20	34	34	35	28
NJ14V	22	30	36	35	35
NJ15V	20	30	34	36	27
NJ18V	10	25	30	36	29
NJ21V	0	35	35	32	35
NJ22V	0	34	37	33	32
NB01E	14	35	25	30	40
NB02E	13	32	17	26	30
NB03E	12	32	35	35	34
NB04E	12	30	32	33	33
NB05E	12	29	33	33	37
NJ01E	14	32	20	22	32
NJ02E	12	29	32	32	35
NJ03E	13	32	35	35	33
NJ04E	12	30	33	30	32
NJ05E	13	29	32	32	30

NJ07E					
NJ08E	1,3	3	3,2	3,3	2,7
NJ09E	1,2	2,7	3,2	3,3	3,3
NJ10E	1,3	3	3,6	3,6	3,5
NJ11E	1,5	3,2	2	2,7	3,5
NJ12E	1,3	3,1	3,3	3,4	3
EB01V	2	3,4	3,6	3,6	3,2
EB02V	1,5	3,4	4	3,6	2,7
EB03V	1,5	3,5	4	3,2	2,8
EB04V	1,5	3,4	3,8	3,5	2,6
EB05V	1,6	3,5	3,2	3	3,7
EB06V	2,1	3	3,4	3,2	3,6
EB07V	0	2,8	3,4	3	3,6
EB08V	1,6	2,8	3,2	3,4	2,5
EB09V	2	4	3,6	3,6	3,5
EB10V	1,6	3,2	3,5	3,3	2,4
EB11V	2,6	3,8	4	3,7	3,2
EB12V	1,6	3,3	3,5	3,5	2,9
EB13V	2	3,9	4	4	3,2
EB14V	1,5	3,5	4	3,8	2,5
EB15V	1,5	3	3,6	3,5	2,7
EB01E	1	2,8	3,3	3,5	3,6
EB02E	1,2	3,5	3,2	3,7	3,7

Anexo 3. Sequências obtidas e comparação em bancos de dados

EB07V

TCGTATCGTTGAGATCTACGGTCCAGATCATCAGGTAACAACCGTTACTCTTGAGTGTATTGCTGCTGCTCAAAAAGCAGGTAAAA
 CCTGTGCGTTTATCGATGCTGAGCACGCGCTAGACCCCTGTTATGCGAAGAAGCTAGGTGTTGATATCGACGCGCTACTTGTGCTCAG
 CCAGATACAGGTGAACAAGCACTTGAAATCTGTGACGCACTGGCACGTTCTGGCGCGATTGACGTAATGGTTATCGACTCGGTTGCAG
 CACTGACACCAAAAAGCGGAAATCGAAGGTGAGATGGGCGATAGCCACATGGGTCTGCAAGCTCGTATGCTTTCTCAAGCGATGCGTAA
 GCTTACAGGTAACCTAAAGCAGTCTAACTGTATGTGTATCTTCATTAACCAAAATTCGTATGAAGATTGGTGTATGTTTCGGTAACCCAG
 AAACGACTACGGGTGGTAACGCACTTAAATTCACGCGTCTGTTCTGTTGATATCCGCCGACTGGCTCTATCAAAAAGCGGACGAA
 GTGGTGGTAACGAACTCGCATTAAGTGGTTAAGAACAAGATCGCAGCGCCATTAAGCAAGCGGAAACGCAAAATTCATACGGTC
 AAGGCTTCAACCGTTACGGCGA

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio sp. R-616 recombination-repair protein (recA) gene, partial cds	876	876	92%	0.0	93.40%	EU716985.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio sp. AmSamH42 recombinase A (recA) gene, partial cds	806	806	84%	0.0	93.38%	JN715114.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio sp. R-91 recombination-repair protein (recA) gene, partial cds	819	819	86%	0.0	93.32%	EU716972.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio variabilis strain R-40492 recombinase A (recA) gene, partial cds	773	773	86%	0.0	91.73%	GU929934.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio sp. R-78 recombination-repair protein (recA) gene, partial cds	771	771	86%	0.0	91.71%	EU716968.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio mediterranei strain R-12 recombination-repair protein (recA) gene, partial cds	782	782	90%	0.0	91.03%	EU716942.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio sp. cn83 RecA (recA) gene, partial cds	832	832	99%	0.0	90.14%	FJ178183.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio tubiashii strain R-659 recombination-repair protein (recA) gene, partial cds	747	747	91%	0.0	89.51%	EU717015.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio sinaloensis strain R-701 recombination-repair protein (recA) gene, partial cds	728	728	90%	0.0	89.19%	EU717054.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio sinaloensis strain R-654 recombination-repair protein (recA) gene, partial cds	736	736	91%	0.0	89.15%	EU717013.1

NJ21V

GGTGTATCGTTGAAAGTTTACGGTCCAGAATCATCAGGTAACAACCGTTAACTCGAACTGATTGCGGCAGCGCAACGTGTTGGTA
 AAACCTGTGCTTTCATCGATGCAGAACACGCACTCGACCCGATTTATGCTAAAAAGCTAGGTGTAGATATCGATGCGCTGTTGGTTTCT
 AGCCCGATACGGGTGAGCAAGCGCTTGAAATTTGTGATGCATTAGCCGCTTCTGGTGCATTGATGTCATGGTTGTCAGCTCGGTTGC
 AGCACTAACGCCAAAAGCTGAAATGAAGGCGAAAATGGGCGATAGCCACATGGGTCTGCAAGCTCGTATGTTATCTCAAGCAATGCGT
 AAGCTAACAGGTAACCTTAAAGCAGTCTAACTGTATGTGATTTTCATCAACCAAAATTCGTATGAAGATTGGTGTGATGTTGGTAACCC
 AGAGACAACACGGGTGGTAACGCACTTAAGTTTTATGCTCCGTTCTGTTGATATCCGTCGCACAGGTTCTATCAAGAAGCGCGATG
 AGATTGTTGGTAACGAAACCGTATCAAGGTCGTTAAGAACAATAATTGCTGCGCCATTTAAGCAAGCAGAAACGCAAAATTTGTATGG
 CAAAGGTTTTAACCGTGAAGGTGAGCTGATTGAC

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio hippocampi partial recA gene for recombinase A, type strain BFLP-4T	760	760	100%	0.0	87.61%	FN421435.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio ichthyenteri partial recA gene for recombinase A, isolate DCR 1-4-11	710	710	93%	0.0	87.58%	LN626595.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio ichthyenteri partial recA gene for recombinase A, isolate DAQ 2-1-1B	754	754	100%	0.0	87.46%	LN626594.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio ichthyenteri partial recA gene for recombinase A, isolate DAQ 2-1-1A	754	754	100%	0.0	87.46%	LN626593.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio ichthyenteri partial recA gene for recombinase A, strain CECT 8171	754	754	100%	0.0	87.46%	LN626592.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio ichthyenteri partial recA gene for recombinase A, strain CECT 7096	754	754	100%	0.0	87.46%	LN626591.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio ichthyenteri partial recA gene, strain R-3774	754	754	100%	0.0	87.46%	AJ842447.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio ichthyenteri partial mRNA for recombination-repair protein (recA gene), type strain LMG 19664T	754	754	100%	0.0	87.46%	AJ580858.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio plantisponsor strain MS5RF60 recombinant DNA repair protein (recA) gene, partial cds	749	749	100%	0.0	87.31%	HM640386.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio ichthyenteri partial recA gene, strain R-3789	749	749	100%	0.0	87.31%	AJ842448.1

NJ22V

GTCGTATCGTTGAAAGTTTACGGTCCAGAATCATCAGGTAACAACCGTTAACTCGAACTGATTGCGGCAGCGCAACGTGTTGGTAA
 AACCTGTGCTTTCATCGATGCAGAACACGCACTCGACCCGATTTATGCTAAAAAGCTAGGTGTAGATATCGATGCGCTGTTGGTTTCTC
 AGCCCGATACGGGTGAGCAAGCGCTTGAAATTTGTGATGCATTAGCCGCTTCTGGTGCATTGATGTCATGGTTGTCAGCTCGGTTGCA
 GCACTAACGCCAAAAGCTGAAATGAAGGCGAAAATGGGCGATAGCCACATGGGTCTGCAAGCTCGTATGTTATCTCAAGCAATGCGTAA
 AGCTAACAGGTAACCTTAAAGCAGTCTAACTGTATGTGATTTTCATCAACCAAAATTCGTATGAAGATTGGTGTGATGTTGGTAACCCA
 GAGACAACACGGGTGGTAACGCACTTAAGTTTTATGCTCCGTTCTGTTGATATCCGTCGCACAGGTTCTATCAAAAAGCGCGATGA
 GATTGTTGGTAACGAAACACGATCAAGGTCGTTAAGAACAATAATTGCTGCGCCATTTAAGCAAGCAGAAACGCAAAATTTGTATGGC
 AAAGGTTTTAACCGTGAAGGTGAGCTGATTGAC

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio hippocampi partial recA gene for recombinase A, type strain BFLP-4T	758	758	100%	0.0	87.60%	FN421435.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio ichthyenteri partial recA gene for recombinase A, isolate DCR 1-4-11	708	708	93%	0.0	87.56%	LN626595.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio ichthyenteri partial recA gene for recombinase A, isolate DAQ 2-1-1B	752	752	100%	0.0	87.44%	LN626594.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio ichthyenteri partial recA gene for recombinase A, isolate DAQ 2-1-1A	752	752	100%	0.0	87.44%	LN626593.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio ichthyenteri partial recA gene for recombinase A, strain CECT 8171	752	752	100%	0.0	87.44%	LN626592.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio ichthyenteri partial recA gene for recombinase A, strain CECT 7096	752	752	100%	0.0	87.44%	LN626591.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio ichthyenteri partial recA gene, strain R-3774	752	752	100%	0.0	87.44%	AJ842447.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio ichthyenteri partial mRNA for recombination-repair protein (recA gene), type strain LMG 19664T	752	752	100%	0.0	87.44%	AJ580858.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio cincinnatiensis partial recA gene, strain LMG 13217	749	749	99%	0.0	87.40%	AJ842395.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio comitans strain LMG 23416 RecA (recA) gene, partial cds	747	747	99%	0.0	87.38%	EU541597.1

Anexo 4. Alinhamento das sequencias dos isolados NJ21V e NJ22V

- *recA*

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

NJ21V      -----GGTCGTATCGTTGAAG 16
NJ22V      CTGTCTCCTGCCGACAAGACCAACGTCAAGGCCGCTGGGGTAAGTCGTATCGTTGAAG 60
                *****

NJ21V      TTTACGGTCCAGAATCATCAGSTAAAACCAAGTTAACACTCGAACTGATTGCGGCAGCGC 76
NJ22V      TTTACGGTCCAGAATCATCAGSTAAAACCAAGTTAACACTCGAACTGATTGCGGCAGCGC 120
                *****

NJ21V      AACGTGTTGGTAAAACCTGTGCTTTTCATCGATGCAGAACACGCACTCGAACCGATTATG 136
NJ22V      AACGTGTTGGTAAAACCTGTGCTTTTCATCGATGCAGAACACGCACTCGAACCGATTATG 180
                *****

NJ21V      CTA AAAAGCTAGGTGTAGATATCGATGCGCTGTTGGTTTCTCAGCCCGATACGGGTGAGC 196
NJ22V      CTA AAAAGCTAGGTGTAGATATCGATGCGCTGTTGGTTTCTCAGCCCGATACGGGTGAGC 240
                *****

NJ21V      AAGCGCTTGAAATTTGTGATGCATTAGCGGTTCTGGTGGCATTGATGTCATGGTTGTG 256
NJ22V      AAGCGCTTGAAATTTGTGATGCATTAGCGGTTCTGGTGGCATTGATGTCATGGTTGTG 300
                *****

NJ21V      ACTCGGTTGCAGCACTAACGCCAAAAGCTGAAATTGAAGGCGAAATGGGCCENTAGCCACA 316
NJ22V      ACTCGGTTGCAGCACTAACGCCAAAAGCTGAAATTGAAGGCGAAATGGGCCENTAGCCACA 360
                *****

NJ21V      TGGSTCTGCAAGCTCGTATGTTATCTCAAGCAATGCGTAAGCTAACAGSTAACCTTAAGC 376
NJ22V      TGGSTCTGCAAGCTCGTATGTTATCTCAAGCAATGCGTAAGCTAACAGSTAACCTTAAGC 420
                *****

NJ21V      AGTCTAACTGTATGTGTATTTTCATCAACCAAATTCGTATGAAGATTGGTGTGATGTTG 436
NJ22V      AGTCTAACTGTATGTGTATTTTCATCAACCAAATTCGTATGAAGATTGGTGTGATGTTG 480
                *****

NJ21V      GTAACCCAGAGACAACCACGGGTGGTAACGCACTTAAGTTTTATGCTTCCGTTCCGTCCTG 496
NJ22V      GTAACCCAGAGACAACCACGGGTGGTAACGCACTTAAGTTTTATGCTTCCGTTCCGTCCTG 540
                *****

NJ21V      ATATCCGTCGCACAGTTCTATCAAAAGAAGGCGATGAGATTGTTGGTAACGAAACACGTA 556
NJ22V      ATATCCGTCGCACAGTTCTATCAAAAGAAGGCGATGAGATTGTTGGTAACGAAACACGTA 600
                *****

NJ21V      TCAAGGTCGTTAAGAACAAAATTGCTGCGCCATTTAAGCAAGCAGAAACGCAAATTTTGT 616
NJ22V      TCAAGGTCGTTAAGAACAAAATTGCTGCGCCATTTAAGCAAGCAGAAACGCAAATTTTGT 660
                *****

NJ21V      ATGGCAAAGGTTTTAACCGTGAAGGTGAGCTGATTGAC 654
NJ22V      ATGGCAAAGGTTTTAACCGTGAAGGTGAGCTGATTGAC 698
                *****

```

- *groEL*

```

CLUSTAL O(1.2.4) Multiple sequence alignment

g=oEL21      ---CAAAGCTAATGATGCGGGGGGTGACGGGAACAACAACCTGCAACCGTACTGGCTCAATCT      57
g=oEL22      AAAAAAGCCCGTTTGGC-----T-----GGGGGGTTATTGAAACC      36
          **** * ** *
          * * * * *

g=oEL21      ATCATCTCTGAAGGTCTAAAAGCCGTTGCTGCGGGTATGAACCC--AATGGATCTTA---      112
g=oEL22      CCCAAATGGGATTCITTTAAAGCCGTTGGTATTGGAACAAAAGCCGGTGGTTTGGCTGC      96
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * *

g=oEL21      -AGCGTGGTATCGACAAGCGGTGGTTGCTGCGAGTTGAAGAATAAA-----G      159
g=oEL22      CAGTTTGAAGAATAAAAGCGCTTTATTCTGTTTGAATGTAAAAGAATACCCAAA      156
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * *

g=oEL21      GCGTATCTGTTGAATGTAAGATACCAAGCCATCGCTCAGTGGGTAATACTCTCAGCA      219
g=oEL22      GCCCATTCGCTTCCAGGGTGGGTTACTTATT-----CTCCAGCCAAA---ACTTC--TG      206
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * *

g=oEL21      AACTTGACCGGACAGTGGGTAA-CATTATT-GCTGAAGCGATGGAAAAA-GTA-GGCGG      275
g=oEL22      AACGCCGACCAGGTGGGGTAAACATTATTGCTGAAGCGATGGAAAAAAGTAGGCCCG      266
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * *

g=oEL21      TGAT---GGCGTTATTACCGTT--GAAGAAGTCCAGGCGTTACAAGATGAGCTAGACGTA      330
g=oEL22      TGATGGCGCTTTATTACCGTTGAAGAAGTCCAGGCGTTACAAGATGAGCTAGACGTA      326
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * *

g=oEL21      GTAGAAGTATGCAATTTGATCGCGGTT--ACCT-ATCTCCTTACTTCATCAACAACCAA      387
g=oEL22      GTAGAAGTATGCAATTTGATCGCGGTTACCTATCTCCTTACTTCATCAACAACCAA      386
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * *

g=oEL21      GAAGTGGCAGTGTGATCTAGAGAGCCCGTTCATTCTTCTTATCGACAAGAAAGTATCG      447
g=oEL22      GAAGTGGCAGTGTGATCTAGAGAGCCCGTTCATTCTTCTTATCGACAAGAAAGTATCG      446
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * *

g=oEL21      AACATCCGTGAGCTGCTACCAACACTAGAAGCGGTTGC-TAAAGCATCTCG--TCCACTG      504
g=oEL22      AACATCCGTGAGCTGCTACCAACACTAGAAGCGGTTGCTAAGCATCTCGTCCACTTGG      506
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * *

g=oEL21      CTTATCATTTGCAGAGACGTAGAAGGTGAAGCACTAGCAACGTTAGTAGTGAACAACATG      564
g=oEL22      CTTATCATTTGCAGAGACGTAGAAGGTGAAGCACTAGCAACGTTAGTAGTGAACAACATG      566
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * *

g=oEL21      CCGGSCATCGTGAAGTGGCTGCTGTTAAAGCGCGTGGTTGCGTGACCG---TCGTAAG      621
g=oEL22      CCGGSCATCGTGAAGTGGCTGCTGTTAAAGCGCGTGGTTACGGTGACCGTGGTGGGTT      626
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * *

g=oEL21      TCTATGCTACAAGATATCGCTATTCTAACGGGCGGTACGGTTATTTCTGAAGAAATCGGC      681
g=oEL22      TCTATGCTACAAGATATCGCTATTCTAACGGGCGGTACGGTTATTTCTGAAGAAATCTGG      686
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * *

g=oEL21      CTAGA-CCTTGAGAAAGTAACATTAGAGATCTAGSTCAAGCCAAAGCGGTGACGATCAC      740
g=oEL22      CCTAGACCTTGAGAAAGTAACA----- * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * *

```

- 16s





CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

16a21 -----TTTGTGGGGCTCGAGCGGG-----A--- 23
16a22 GCCTCCTCCCGAAGGTTAAACTACCCACTTCTTTTGCAGCCCACTCCCATGCTGTGACGG 60
      * * * * *
16a21 --CGGGTGAGTAATGCCTGGGAAAT----TGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAAC 77
16a22 GCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGC 120
      * * * * *
16a21 GATGGCTAATACCG-----CATAATGCCTTCGGGCCAAGAGGGG----- 117
16a22 GATCCGACTTTCATGGAGTGGAGTTGCAGACTCCCAATCCGGACTACGACGCACTTTTGG 180
      * * * * *
16a21 -----GACCTTCGGGCTCTCGGCTCAGGATATGCCAGGTGGGATT 159
16a22 GATTCGCTCACTATCGCTAGCTTGGCTGCGCCTCTGTATGGGCAATTGTAGCAGGTGTAG 240
      * * * * *
16a21 AGCTAGT---TGSTGAGSTAATGGCTCACCAAGGGGAGGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG 216
16a22 CCTACTCTGTAAGGGCCATGATGACTTGAAGTGGTCCCGCACC-----TTCCTCCGG 291
      * * * * *
16a21 ATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACAGGCTCCAGA-----CTCCTACGG 261
16a22 TTTATCACCGGCAGTCTCCCTGGAGTTCACCACATTATGTGCTGGCAACACAGGATAAGG 351
      * * * * *
16a21 GAGCAGCAGTGG-----GGAAATATTGCACAAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC 310
16a22 GTTGGCCTCGTTGGGGGACTTAAACCAACATTTCAACACAGGAGCTG---ACGACAGCC 407
      * * * * *
16a21 ATGCCCGCTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTGAGCAGTGGGAAAGGTT 370
16a22 ATGCAGCACCTGTCTTAGAGTTCCC--GAAGGCACACCTGCGTCTCCGCTGGCTTCTCTA 465
      * * * * *
16a21 CATACGTTA-ATAGCGTATGGATTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG 429
16a22 GATGTCAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGGGTTGCATCGAATTAACCCACATGCTCCACCGC 525
      * * * * *
16a21 TGCCAGCAGCCCGGTAATACCGAGGCTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG 489
16a22 TTGTGGGGCCCGGCTCAAT----TCATTGAGTTTTAATCTTG-----CGACCGTACTC 576
      * * * * *
16a21 CGCATGCAGTGGTTCGTTAAGTCAGATGTGAAGCCCGAGGCTCAACCTCGGAAGTGC 549
16a22 CCCAGCCGCTCTACTTAAACCGCTTAGCTCCGGAAGCCACGGCTCAAGGSCACAACTCCA 636
      * * * * *
16a21 TTTGAACAGCCGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGTAGAATTTGAGGTGTAGCGGTGA 609
16a22 AGTAGACATCGTT-TACGGCGTGGACTACAGGATCTAATCC--TGTT--GCTCCCG 691
      * * * * *
16a21 ATGCGTAGAGTCTGAAGGAATACCAGTGGCGAAGGGCGCCCGCTGGACAGATACTGACA 669
16a22 ACGCTTTCGCATCTGAGTGTGAGTATCTGTCCAGGGGGCGCCCTTCGCCACTGSTATTC 751
      * * * * *

```

Anexo 5. Comparação morfológica dos isolados NJ21V e NJ22V.

Código	Cor	Núcleo	Tamanho (aprox.) mm.	Borde	Anéis	Fotografia 1	Fotografia 2
NJ21V	Amarelo	Amarelo	<1	Regular	No		
NJ22V	Amarelo	Amarelo	2	Regular	Si		

Anexo 6. Sequências *mcr-1* obtidas a partir de os plasmídeos e comparação em bancos de dados

- *mcr-1* do Plasmideo do isolado EB07V

AATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCA
CGCTGTTATCATCGTATCGTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTACTGACACTT
ATGGCAGGTCTATGATACGACCATGTCTCCAAAATGCCCTACAGTATCTTGACCAAGCCGAGACCAAGGTATCTATA

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 91 plasmid unnamed_complete_sequence	446	446	99%	3e-121	98.43%	MK940858.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 11 plasmid unnamed_complete_sequence	446	446	99%	3e-121	98.43%	MK940857.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2018-10-2CC plasmid p2018-10-2CC DNA_complete_genome	446	446	99%	3e-121	98.43%	LC511662.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2018-06-1CC plasmid p2018-06-1CC DNA_complete_genome	446	446	99%	3e-121	98.43%	LC511661.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2017-19-01CC plasmid p2017-19-01CC DNA_complete_genome	446	446	99%	3e-121	98.43%	LC511660.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2017-15-03CC plasmid p2017-15-03CC DNA_complete_genome	446	446	99%	3e-121	98.43%	LC511659.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2017-03-03CC plasmid p2017-03-03CC DNA_complete_genome	446	446	99%	3e-121	98.43%	LC511658.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2017-02-01CC plasmid p2017-02-01CC DNA_complete_genome	446	446	99%	3e-121	98.43%	LC511657.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2017-02-2CC plasmid p2017-02-2CC DNA_complete_genome	446	446	99%	3e-121	98.43%	LC511656.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2018-02-02CC plasmid p2018-02-02CC DNA_complete_genome	446	446	99%	3e-121	98.43%	AP021897.1

```

gene      <1..>251
          /gene="mcr1"
          /locus_tag="mima_00037"
CDS       <1..>251
          /gene="mcr1"
  
```

- *mcr-1* do Plasmideo do isolado NJ21V

CCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCAAGCTGTTA
TCATCGTATCGTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTACTGACACTTATGG
CAGGCTTATGATACGACCATGTCTCCAAAATGCCCTACAGACCCGACCAAGCCGAGACCAAGGATCTAA

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 91 plasmid unnamed_complete_sequence	442	442	99%	3e-120	100.00%	MK940858.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 11 plasmid unnamed_complete_sequence	442	442	99%	3e-120	100.00%	MK940857.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2018-10-2CC plasmid p2018-10-2CC DNA_complete_genome	442	442	99%	3e-120	100.00%	LC511662.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2018-06-1CC plasmid p2018-06-1CC DNA_complete_genome	442	442	99%	3e-120	100.00%	LC511661.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2017-19-01CC plasmid p2017-19-01CC DNA_complete_genome	442	442	99%	3e-120	100.00%	LC511660.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2017-15-03CC plasmid p2017-15-03CC DNA_complete_genome	442	442	99%	3e-120	100.00%	LC511659.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2017-03-03CC plasmid p2017-03-03CC DNA_complete_genome	442	442	99%	3e-120	100.00%	LC511658.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2017-02-01CC plasmid p2017-02-01CC DNA_complete_genome	442	442	99%	3e-120	100.00%	LC511657.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2017-02-2CC plasmid p2017-02-2CC DNA_complete_genome	442	442	99%	3e-120	100.00%	LC511656.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2018-02-02CC plasmid p2018-02-02CC DNA_complete_genome	442	442	99%	3e-120	100.00%	AP021897.1

```

gene      <1..>239
          /gene="mcr1"
          /locus_tag="mima_00037"
CDS       <1..>239
          /gene="mcr1"
  
```

- *mcr-1* do Plasmideo do isolado NJ22V

CCAAACCTATCCCATCGCGGACAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTTTGGCGCGATGCTACTGATCACCAAGC
TGTTATCATCGTATCGTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTACTGACACTT
ATGGCAGGTCTATGATACGACCATGTCTCCAAAATGCCCTACAGACCCGACCAAGCCGAGACCAAGGATCTAAG

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 91 plasmid unnamed_complete_sequence	451	451	99%	6e-123	100.00%	MK940858.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 11 plasmid unnamed_complete_sequence	451	451	99%	6e-123	100.00%	MK940857.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2018-10-2CC plasmid p2018-10-2CC DNA_complete_genome	451	451	99%	6e-123	100.00%	LC511662.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2018-06-1CC plasmid p2018-06-1CC DNA_complete_genome	451	451	99%	6e-123	100.00%	LC511661.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2017-19-01CC plasmid p2017-19-01CC DNA_complete_genome	451	451	99%	6e-123	100.00%	LC511660.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2017-15-03CC plasmid p2017-15-03CC DNA_complete_genome	451	451	99%	6e-123	100.00%	LC511659.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2017-03-03CC plasmid p2017-03-03CC DNA_complete_genome	451	451	99%	6e-123	100.00%	LC511658.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2017-02-01CC plasmid p2017-02-01CC DNA_complete_genome	451	451	99%	6e-123	100.00%	LC511657.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2017-02-2CC plasmid p2017-02-2CC DNA_complete_genome	451	451	99%	6e-123	100.00%	LC511656.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli 2018-02-02CC plasmid p2018-02-02CC DNA_complete_genome	451	451	99%	6e-123	100.00%	AP021897.1

```

gene      <1..>244
          /gene="mcr1"
          /locus_tag="mima_00037"
CDS       <1..>244
          /gene="mcr1"
  
```