



**Andreia Filipa da Silva Rocha**

**Resistência aos antibióticos em bactérias de Gram-negativo  
isoladas de amostras de carne de aves e suíno de diferentes  
origens**

**Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Controlo da  
Qualidade**

**Trabalho realizado sob orientação da Professora Doutora Helena Maria Neto  
Ferreira de Sousa**

**Setembro de 2019**

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

## Agradecimentos

À minha orientadora Professora Doutora Helena Maria Neto Ferreira de Sousa o meu muito obrigada por me ter incutido o gosto pela microbiologia, por estar sempre disponível para ajudar, e pela orientação durante este percurso.

À Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira por sempre que precisei se ter mostrado disponível para me ajudar.

À minha família não tenho palavras para agradecer por todo o apoio, aos meus pais Emília e Paulo pelo apoio incondicional e pela a educação que me deram, são os meus pilares. Aos meus avós maternos Fátima e Alcino pela preocupação, força e carinho. Aos meus padrinhos Soraia e Francisco por tudo o que fazem diariamente por mim, por me terem dado a oportunidade de trabalhar com eles e por terem sido tão flexíveis e disponíveis para me ajudarem sempre que precisei, sem vocês todos nada disto seria possível.

Ao meu namorado Tiago por me ter aturado em todos os dias que estive mais em baixo e com mau feitio e mesmo assim não me largar nem um bocadinho.

Às minhas colegas com quem partilhei o laboratório, Catarina Henriques, Catarina Braga, Ana, Joana e a Diana, o meu obrigada a todas que de alguma forma me ajudaram.

*“Matar o sonho é matarmo-nos. É mutilar a nossa alma. O sonho é o que temos de realmente nosso, de impenetravelmente e inexpugnavelmente nosso.”*

Fernando Pessoa

## Resumo

A resistência aos antibióticos tem tido um impacto a nível global cada vez maior. O uso de antibióticos na produção animal iniciou-se desde cedo, mostrando-se importante para a sustentabilidade da produção animal e para o controlo de infeções. O uso excessivo ou indevido de antibióticos levou ao aparecimento de isolados resistentes.

Existe uma sobreposição substancial entre os medicamentos necessários para uso humano e os atualmente utilizados na produção animal, ou seja, são utilizados na produção animal vários antibióticos medicamente importantes para a saúde humana.

Neste estudo foram adquiridas amostras de carne de aves e suíno de diferentes origens, nomeadamente, hipermercados, comércio local e produção “caseira”, com o objetivo de pesquisar bactérias de Gram negativo resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não  $\beta$ -lactâmicos.

Todos os isolados selecionados mostraram resistência a diversas classes de antibióticos, penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas e tetraciclina. A caracterização molecular mostrou isolados de *E. coli* produtores de ESBLs do tipo TEM, OXA e CTX-M grupo 9, e genes de resistência às fluoroquinolonas *gyrA*, *parC* e *acc(6')-Ib-cr*.

É de extrema importância que a resistência aos antibióticos seja interpretada numa perspetiva “*One Health*” de modo a perceber que tudo está interligado, animais, humanos e o ambiente e que a resistência é transmitida de animais para humanos e vice-versa e que o meio ambiente é um elo de ligação entre ambos.

**Palavras Chave:** resistência aos antibióticos, produção animal, bactérias Gram negativo,  $\beta$ -lactamases, “*One Health*”

## Abstract

Antibiotic resistance has had an increasing impact globally. Use in animal production started early, and is important for the sustainability of animal production and for the control of infections. Overuse or misuse of antibiotics has led to the emergence of resistant isolates.

There is a substantial overlap between the medicines needed for human use and those currently used in animal production, so several antibiotics that are medically important for human health are used in animal production.

In this study meat samples were obtained from poultry and swine from different sources, namely, hypermarkets, local commerce and “home-grown” production, with the objective of researching Gram negative bacteria resistant to  $\beta$ -lactam and non  $\beta$ -lactam antibiotics.

All selected isolates showed resistance to different classes of antibiotics, penicillins, cephalosporins, fluoroquinolones and tetracyclines. Molecular characterization showed *E. coli* isolates producing TEM, OXA and CTX-M group 9 ESBLs, and *gyrA*, *parC* and *acc(6')-Ib-cr* fluoroquinolone resistance genes.

It is extremely important that antibiotic resistance is interpreted from a “One Health” perspective to understand that everything is interconnected, animals, humans and the environment and that resistance is transmitted from animals to humans and vice versa and that the environment is a link between them.

**Keywords:** antibiotic resistance, animal production, Gram negative bacteria,  $\beta$ -lactamases, “One Health”

## Índice

|                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Agradecimentos .....                                                                                                                               | III |
| Resumo.....                                                                                                                                        | IV  |
| Índice de Figuras.....                                                                                                                             | IX  |
| Índice de Tabelas.....                                                                                                                             | X   |
| Lista de Abreviaturas e Símbolos.....                                                                                                              | XI  |
| I - INTRODUÇÃO .....                                                                                                                               | 14  |
| 1. Os antibióticos e as utilizações na produção animal .....                                                                                       | 15  |
| 2. A resistência aos antibióticos .....                                                                                                            | 16  |
| 2.1 Vias de circulação da resistência aos antibióticos entre humanos e animais para alimento e o ambiente – Perspetiva “ <i>One Health</i> ” ..... | 17  |
| 2.1.1 Transmissão da resistência aos antibióticos de animais para humanos por contacto direto .....                                                | 17  |
| 2.1.2 Transmissão da resistência aos antibióticos de animais para humanos através da cadeia alimentar.....                                         | 18  |
| 2.1.3 Transmissão da resistência aos antibióticos para o ambiente via animais e humanos .....                                                      | 18  |
| 3. Antibióticos $\beta$ -lactâmicos.....                                                                                                           | 19  |
| 3.1 Mecanismos de Resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos.....                                                                            | 20  |
| 3.1.1 Modificação das PLPs .....                                                                                                                   | 20  |
| 3.1.2 Alteração das porinas .....                                                                                                                  | 21  |
| 3.1.3 Mecanismos de efluxo .....                                                                                                                   | 22  |
| 3.1.4 Produção de $\beta$ -lactamases .....                                                                                                        | 23  |
| 3.2 $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado – ESBLs <sup>1</sup> .....                                                                            | 26  |
| 3.2.1. Combinação de antibióticos $\beta$ -lactâmicos com inibidores de $\beta$ -lactamases .....                                                  | 27  |
| 3.3 Carbapenemases.....                                                                                                                            | 27  |

|                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4 Antibióticos não $\beta$ -lactâmicos e principais mecanismos de resistência .....                                              | 28 |
| II - OBJETIVOS.....                                                                                                                | 30 |
| III – MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                                                    | 32 |
| 1. Processamento das amostras de carne .....                                                                                       | 33 |
| 2. Identificação dos isolados.....                                                                                                 | 33 |
| 3. Determinação do fenótipo de resistência aos antibióticos.....                                                                   | 34 |
| 3.1 Teste de suscetibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em agar.....                                                  | 34 |
| 3.2 Avaliação da expressão de $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado .....                                                       | 35 |
| 3.2.1 Detecção de sinergismo no teste de suscetibilidade aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos pelo método de difusão em agar ..... | 35 |
| 3.2.2. Teste da aproximação de disco ou Teste de duplo disco .....                                                                 | 36 |
| 4. Caracterização de genes de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos e não $\beta$ -lactâmicos .....                     | 36 |
| 4.1 Extração do DNA bacteriano.....                                                                                                | 37 |
| 4.2 Condições de amplificação das reações de PRC .....                                                                             | 37 |
| 4.3 Caracterização dos genes que codificam $\beta$ -lactamases .....                                                               | 38 |
| 4.4 Caracterização dos genes que codificam carbapenemases .....                                                                    | 38 |
| 4.5 Caracterização dos genes que codificam resistência aos antibióticos.....                                                       | 39 |
| não $\beta$ -lactâmicos.....                                                                                                       | 39 |
| 5. Caracterização molecular de isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado.....     | 42 |
| 5.1 Identificação do grupo clonal O25b-ST131 .....                                                                                 | 42 |
| 5.2 Identificação do grupo filogenético dos isolados de <i>Escherichia coli</i> .....                                              | 42 |
| produtora de $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado.....                                                                         | 42 |
| 5.3 Caracterização de genes que codificam fatores de virulência em isolados .....                                                  | 43 |
| de <i>Escherichia coli</i> produtores de $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado .....                                            | 43 |
| IV - RESULTADOS .....                                                                                                              | 46 |
| 1. Identificação dos isolados.....                                                                                                 | 47 |

|                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos provenientes de amostras de carne de aves e suínos de diferentes origens .....                                                  | 47 |
| 2.1 Suscetibilidade aos antibióticos .....                                                                                                                                            | 48 |
| 2.2 Pesquisa de produção de beta lactamases de espectro alargado .....                                                                                                                | 48 |
| 2.3 Multirresistência .....                                                                                                                                                           | 52 |
| 3. Caracterização genotípica dos isolados bacterianos.....                                                                                                                            | 52 |
| 3.1 Caracterização dos genes codificadores de $\beta$ -lactamases em isolados de <i>Escherichia coli</i> .....                                                                        | 53 |
| 3.2 Detecção do grupo filogenético nos isolados de <i>Escherichia coli</i> .....                                                                                                      | 53 |
| 3.3 Detecção do grupo clonal O25b-ST131 nos isolados de <i>Escherichia coli</i> .....                                                                                                 | 53 |
| 3.4 Caracterização dos fatores de virulência em isolados de <i>Escherichia coli</i> ....                                                                                              | 54 |
| 3.5 Caracterização dos genes codificadores de mecanismos de resistência aos antibióticos não $\beta$ -lactâmicos em isolados de <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas</i> spp..... | 54 |
| 3.6 Caracterização dos isolados de <i>Pseudomonas putida</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com redução da suscetibilidade aos carbapenemos.....                                     | 54 |
| V - DISCUSSÃO .....                                                                                                                                                                   | 58 |
| VI - CONCLUSÃO .....                                                                                                                                                                  | 58 |
| VII - BIBLIOGRAFIA.....                                                                                                                                                               | 58 |



## Índice de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos em diferentes nichos e transmissão para os humanos. ADAPTADO DE (CDC, 2015).....                                                                                      | 19 |
| <b>Figura 2</b> - Estrutura química representativa dos quatro grupos de antibióticos $\beta$ -lactâmicos ADAPTADO DE. (Lumen Learning, 2019) .....                                                                                             | 20 |
| <b>Figura 3</b> – Exemplo de detecção da expressão de ESBLs pela presença de sinergismo entre os discos de oximino- $\beta$ -lactâmicos e o disco da associação amoxicilina com ácido clavulânico. Fonte: O presente trabalho.....             | 35 |
| <b>Figura 4</b> – Exemplo de Teste da aproximação de disco ou Teste de duplo disco, indicando a formação de uma zona fantasma entre os antibióticos e o disco de amoxicilina/ácido clavulânico. Fonte: O presente trabalho.....                | 36 |
| <b>Figura 5</b> - Árvore de decisão dicotômica para determinar o grupo filogenético de uma estirpe de <i>E. coli</i> usando os resultados da amplificação por PCR dos genes <i>chuA</i> e <i>yjaA</i> e fragmento de DNA <i>tspE4.C2</i> ..... | 42 |

## Índice de Tabelas

|                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1-</b> Exemplos de como antibióticos usados em animais podem causar resistência a medicamentos usados em humanos. ADAPTADO DE (Compassion in World Farming, 2011) .....                             | 16 |
| <b>Tabela 2</b> - Classificação das $\beta$ -lactamases segundo Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros. ADAPTADO DE: (Karen Bush & Jacoby, 2010; da Silva et al., 2013) .....                                          | 25 |
| <b>Tabela 3</b> - Lista de antibióticos e as respectivas concentrações que foram utilizados na realização dos testes de suscetibilidade organizados por classes. ....                                         | 35 |
| <b>Tabela 4</b> - Sequência nucleotídica dos primers utilizados nas reações de PCR e de sequenciação. ....                                                                                                    | 40 |
| <b>Tabela 5</b> - Sequência nucleotídica dos primers utilizados nas reações de amplificação para detecção de genes codificadores de fatores de virulência. ....                                               | 45 |
| <b>Tabela 6</b> - Número de isolados que apresentaram resistência a cada uma das classes de antibióticos.....                                                                                                 | 47 |
| <b>Tabela 7</b> - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos de isolados provenientes do estudo. ....                                                                     | 50 |
| <b>Tabela 8</b> - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos não $\beta$ -lactâmicos de isolados provenientes do estudo. ....                                                                 | 51 |
| <b>Tabela 9</b> - Caracterização molecular e relações clonais de isolados de <i>Escherichia coli</i> produtores de ESBLs provenientes deste estudo.....                                                       | 56 |
| <b>Tabela 10</b> - Caracterização molecular de isolados de <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas</i> spp que apresentaram genes codificadores de mecanismos de resistência aos ..... 56                    | 56 |
| <b>Tabela 11</b> - Caracterização molecular de isolados de <i>Pseudomonas putida</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> que apresentaram genes codificadores de mecanismos de resistência aos carbapenemos. .... | 57 |

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

- ABC - ATP-binding cassette
- ADN - Ácido desoxirribonucleico
- AK - Amicacina
- AMC - Amoxicilina + Ácido clavulânico
- AMP - Ampicilina
- ARN - Ácido ribonucleico
- ATCC - American Type Culture Collection
- ATM - Aztreonamo
- ATP - Adenosina trifosfato
- C - Cloranfenicol
- CAZ - Ceftazidima
- CIP - Ciprofloxacina
- CLED - Cistina-Lactose eletrólito deficiente
- CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute
- CN - Gentamicina
- CPT - Ceftarolina
- CT - Colistina
- CTX - Cefotaxima
- CXM - Cefuroxima
- DOR - Doripenemo
- EDTA - ácido etilenodiamina tetra-acético
- EFT - Ceftiofur
- EMA – European Medicine Agency
- ENR - Enrofloxacin
- ESBL - Extended spectrum  $\beta$ -lactamase
- *et al.* – et alia, e outras pessoas
- ETP - Ertapenemo
- EU – União Europeia
- EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testin
- F - Nitrofurantoína
- FDA – Food and Drugs Administration
- FEP - Cefepime

- FOT - Fosfomicina
- FOX - Cefoxitina
- IMI - Imipenemo
- MATE - Multidrug and Toxic Compounds Extrusion
- MBLs - metalo- $\beta$ -lactamases
- MDR - multidrug-resistant
- MFP - Membrane Fusion Protein
- MFS - Major Facilitator Superfamily
- MRP - Meropenemo
- MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina
- NA - Ácido nalidixico
- NDM - New Delhi metallo  $\beta$ -lactamases
- NET - Netilmicina
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development
- OEP - Outer membrane Efflux Protein
- OMPs - Outer Membrane Proteins
- ONU - Organização das Nações Unidas
- PCR - Polymerase Chain Reaction
- PDR - pandrug-resistant
- PLPs – Proteínas de Ligação à Penicilina
- PMF - Proton Motive Force
- PRL - Piperacilina
- rARN - Ácido ribonucleico ribossômico
- RND - Resistance Nodulation Division
- SMR - Small Multidrug Resistance
- SXT - Sulfametoxazole/trimetoprima
- TAE - Tris-Acetato-EDTA
- tARN - Ácido ribonucleico de transferência
- TE - Tetraciclina
- TGC - Tigeciclina
- TOB - Tobramicina
- TSB - Caldo Tryptic Soy
- TZP - Piperacilina + Tazobactame
- UFC - Unidade Formadora de Colônia
- XDR - extensively drug-resistant

---

# **I - INTRODUÇÃO**

### **1. Os antibióticos e as utilizações na produção animal**

Um dos maiores avanços na história da medicina é, sem dúvida, a descoberta dos antibióticos, estes fazem parte da existência humana desde a década de 1940, permitindo-nos alcançar melhorias extraordinárias na medicina humana e veterinária (Rushton, Ferreira, & Katharina D. C. Stärk, 2014). O uso de antibióticos na produção animal iniciou-se desde cedo, mostrando-se importante para a sustentabilidade da produção animal e para o controlo de infeções. O uso excessivo ou indevido de antibióticos levou ao aparecimento de isolados resistentes (Economou & Gousia, 2015).

A população mundial tem vindo a aumentar encontrando-se neste momento com cerca de 7,5 biliões de pessoas (The World Bank, 2019). A ONU - Organização das Nações Unidas prevê que em 2100 a população aumente para 11,2 biliões (Organização das Nações Unidas, 2019). O aumento da população mundial e a mudança das populações para os centros urbanos é um determinante pela cada vez maior procura de proteína animal (Dyck & John, 2001; FAO, 2006). Estes hábitos alimentares exigem mudanças na forma como os animais são criados, sendo a sua produção maior, mais rápida, e cada vez mais animais são mantidos em sistemas de produção intensiva, sendo este tipo de produção caracterizado pelo confinamento de animais (incluindo aves, suínos e bovinos) (Grace, 2015; Coyne et al., 2019; Graham, Boland, & Silbergeld, 2007). Este tipo de produção intensiva requer o uso de antibióticos para garantir a saúde animal, manter a produtividade e o lucro, levando consequentemente ao aumento da resistência (Van Boeckel et al., 2015; Coyne et al., 2019). A produção intensiva de animais para alimentação humana, levou à utilização de antibióticos como promotores de crescimento, assim a utilização de doses sub-terapêuticas, promove um crescimento mais rápido ajudando o animal a atingir o peso necessário para entrar no mercado em menor tempo. Como qualquer tipo de uso indevido de antibióticos, a utilização como promotores de crescimento, aumenta a possibilidade de as bactérias virem a desenvolver resistência (Allen, 2014; O'Neill, 2015). Na UE - União Europeia, a autorização de introdução no mercado para todos os antibióticos promotores de crescimento foi retirada em janeiro de 2006 como resposta às crescentes preocupações sobre resistência e eficácia reduzida. Nos Estados Unidos a *Food and Drug Administration* (FDA) introduziu novas regras em janeiro de 2017 exigindo que os agricultores obtenham prescrições para todos os antibióticos e proibindo o uso como promotores de crescimento (OECD, 2014; FDA, 2017).

## Introdução

Na produção de animais para alimentação os antibióticos podem ser usados para: fins terapêuticos (tratamento de animais doentes); profilaxia (administrados para prevenção de doenças, mesmo não apresentando sinais clínicos); ou metafilaxia (no caso de doenças infecciosas, geralmente o lote inteiro é tratado para prevenir a disseminação da doença, apesar de haver sintomas clínicos em apenas em alguns animais) (OECD, 2014).

Existe uma sobreposição substancial entre os medicamentos necessários para uso humano e os atualmente utilizados na produção animal, ou seja, são utilizados na produção animal vários antibióticos medicamente importantes para a saúde humana. Segundo a FDA, nove classes de antibióticos que são medicamente importantes para a saúde humana, nomeadamente, aminoglicosídeos, anfenicóis, cefalosporinas, fluoroquinolonas, lincosamidas, macrólidos, penicilinas, sulfonamidas e tetraciclina são utilizados na produção animal (FDA, 2018). Na Europa e segundo a EMA - *European Medicines Agency*, os antibióticos mais vendidos para a produção animal são as tetraciclina (32%), penicilina (26%) e as sulfonamidas (12%) (EMA, 2018).

Os antibióticos de uma classe têm uma estrutura química, modo de ação e alcance de eficácia semelhantes. As bactérias que possuem um mecanismo de resistência a um antibiótico têm maior probabilidade de desenvolver resistência a um antibiótico que pertença à mesma classe. Portanto, mesmo que um antibiótico específico seja usado em animais e não em pessoas, a resistência ao antibiótico de uso animal também pode conferir resistência a um antibiótico de uso humano (Compassion in World Farming, 2011). Como é o caso dos seguintes exemplos:

| Classe de antibiótico                                  | Antibiótico usado em animais | Antibiótico relacionado utilizado em humanos |
|--------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------|
| Fluoroquinolonas                                       | Enrofloxacina                | Ciprofloxacina                               |
| Cefalosporinas de 3 <sup>o</sup> geração (β-lactâmico) | Ceftiofur                    | Cefotaxima                                   |

**Tabela 1-** Exemplos de como antibióticos usados em animais podem causar resistência a medicamentos usados em humanos. ADAPTADO DE (Compassion in World Farming, 2011)

## **2. A resistência aos antibióticos**

Os antibióticos são agentes químicos utilizados para prevenir ou combater infecções bacterianas, tendo a capacidade de eliminar microrganismos ou de impedir o seu crescimento e multiplicação, sem produzir efeitos tóxicos para o homem ou para os

## Introdução

animais. Estes compostos podem ter uma origem natural, sendo, maioritariamente, produzidos por fungos e bactérias, ou uma origem totalmente sintética. De acordo com a sua atividade, os antibióticos podem ser divididos em bactericidas, se a sua ação provoca a morte bacteriana, ou em bacteriostáticos, se apenas inibem a multiplicação e o crescimento dos microrganismos (Kohanski, Dwyer, & Collins, 2010). As bactérias são resistentes na medida em que se adaptam rapidamente em resposta a mudanças no seu ambiente. Na prática, a resistência reduz a eficácia de um antibiótico na prevenção ou tratamento de uma infeção causada pelo microrganismo, aumentando assim a morbimortalidade e, conseqüentemente, levando a custos económicos mais elevados para os produtores (Morel, 2019).

### **2.1 Vias de circulação da resistência aos antibióticos entre humanos e animais para alimento e o ambiente – Perspetiva “One Health”**

A resistência aos antibióticos é reconhecida como um desafio “One Health” devido ao rápido surgimento e disseminação de bactérias e genes resistentes entre seres humanos, animais e o meio ambiente, em escala global (Rousham, Unicomb, & Islam, 2018). É fundamental compreender a ligação que existe entre humanos, animais e o ambiente e o impacto que esta ligação tem na transmissão da resistência aos antibióticos. Assim, existem três principais vias de transmissão entre humanos e animais e vice-versa: contacto direto entre humanos e animais; a cadeia alimentar; o meio ambiente, com foco nos locais de produção agrícola.

#### **2.1.1 Transmissão da resistência aos antibióticos de animais para humanos por contacto direto**

O contato direto ocorre após a exposição de humanos a animais e substâncias biológicas (sangue, urina, fezes, leite, saliva e sêmen) levando à rápida e fácil disseminação de bactérias resistentes de hospedeiro para hospedeiro. Trabalhadores expostos, como veterinários, agricultores, trabalhadores de matadouros e manipuladores de alimentos, bem como aqueles que estão diretamente em contato com os animais, correm alto risco de serem colonizados por bactérias resistentes a antibióticos (Founou, Founou, & Essack, 2016). Deste modo os trabalhadores colonizados podem facilmente transmitir para os familiares, formando assim um canal favorável para a transmissão de genes de resistência para a comunidade em geral e também em hospitais onde é possível uma maior e mais facilitada disseminação da resistência (Marshall & Levy, 2011).



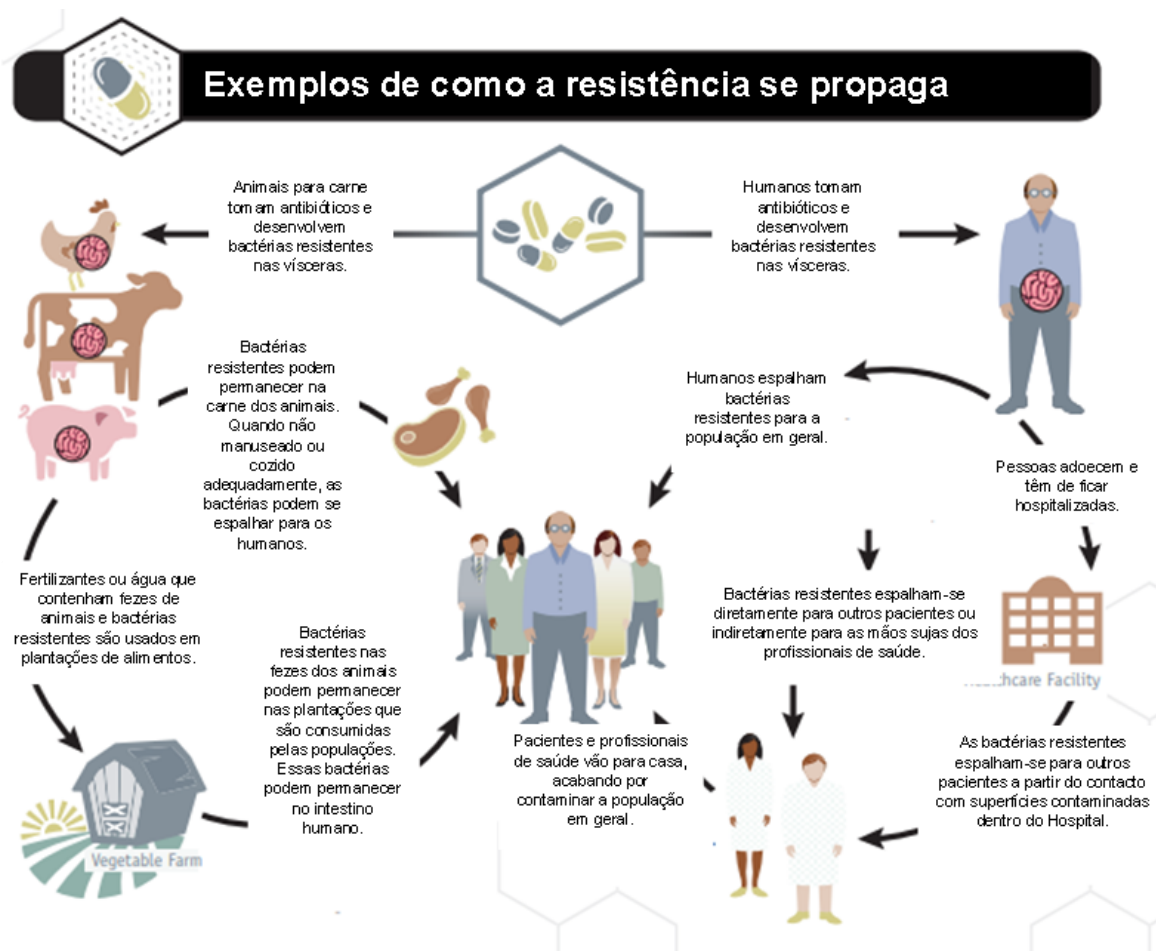
## **Introdução**

### **2.1.2 Transmissão da resistência aos antibióticos de animais para humanos através da cadeia alimentar**

A via de transmissão mais comum é através dos alimentos, em que as bactérias colonizam o trato intestinal do hospedeiro. O uso excessivo de antibióticos na produção animal leva a que estes fiquem colonizados com bactérias resistentes (Morel, 2019). Por vezes produtos alimentícios de origem animal podem estar contaminados com bactérias resistentes aos antibióticos. Geralmente a contaminação resulta do contacto com material fecal se a carne não for corretamente manuseada durante o abate e a retirada das vísceras. É também de notar que a carne infetada pode também contaminar outros alimentos em cozinhas domésticas ou em restaurantes via contaminação cruzada (Compassion in World Farming, 2011). Outros alimentos como frutas e vegetais podem ser contaminados com bactérias resistentes provenientes de adubos que contenham fezes dos animais e águas utilizadas para rega que estejam também elas contaminadas (CDC, 2015).

### **2.1.3 Transmissão da resistência aos antibióticos para o ambiente via animais e humanos**

Uma proporção dos medicamentos utilizados na medicina humana e veterinária acabam por ser excretados para o meio ambiente chegando às estações de tratamento de águas residuais. Estas não se encontram preparadas para a remoção total dos princípios ativos dos antibióticos ou para a inativação de genes de resistência (Morel, 2019). Baixos níveis de antibióticos nas águas residuais podem gerar adaptação de algumas estirpes de bactérias tornando-as resistentes o que pode ter como consequência aumento da proliferação da resistência aos antibióticos (Gullberg et al., 2011).

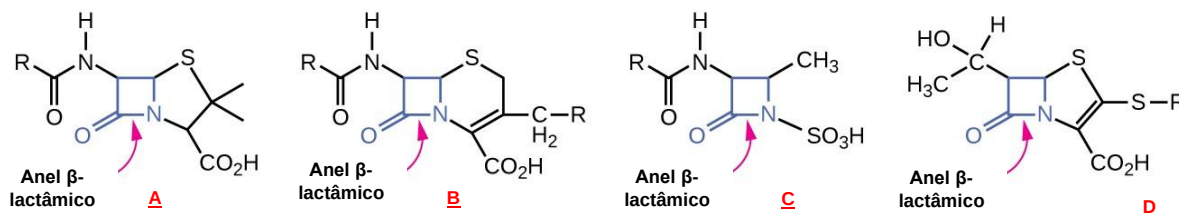


**Figura 1** - Disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos em diferentes nichos e transmissão para os humanos. ADAPTADO DE (CDC, 2015)

### 3. Antibióticos $\beta$ -lactâmicos

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são a classe de antibióticos mais utilizada (Karen Bush & Bradford, 2016). Alexander Fleming notou pela primeira vez a natureza antimicrobiana da penicilina em 1928, mas o primeiro ensaio clínico só foi efetuado em 1940, marcando a descoberta do primeiro antibiótico  $\beta$ -lactâmico. Neste grupo, incluem-se as penicilinas, as cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> geração, os carbapenemos, os monobactams e os inibidores de  $\beta$ -lactamases (K. Bush, 2012; Fernandes, Amador, & Prudêncio, 2013). Caracterizam-se pela presença comum de estrutura cíclica, denominada anel  $\beta$ -lactâmico, constituído por três átomos de carbono e um átomo de azoto, com cadeias laterais que determinam propriedades farmacocinéticas e antibacterianas das diferentes classes (Zeng & Lin, 2013).

## Introdução



**Figura 2** - Estrutura química representativa dos quatro grupos de antibióticos β-lactâmicos ADAPTADO DE. (Lumen Learning, 2019) **Legenda:** A - penicilinas; B - cefalosporinas; C - monobactams; D - carbapenemos

Assim, todos os antibióticos β-lactâmicos desempenham a sua atividade antibacteriana promovendo a inibição da síntese de parede celular bacteriana. Mais concretamente, é inibida a síntese da camada de peptidoglicano da parede celular. Os alvos primários dos antibióticos β-lactâmicos são as PLPs (Proteínas de Ligação à Penicilina) ligam-se a estas covalentemente e bloqueiam a sua ação essencial na catálise das ligações cruzadas dos polímeros de peptidoglicano (ligações interpeptídicas), ação necessária à formação da parede. Esta ligação ocorre porque as moléculas dos antibióticos funcionam como análogos da região terminal do dipéptido D-Ala-D-Ala do peptidoglicano. Após ligação às PLPs ocorre a acilação da serina presente no sítio ativo das enzimas, o que resulta na sua inativação, conduzindo assim ao bloqueio da reação de transpeptidação (K. Bush, 2012; Karen Bush & Bradford, 2016). As PLPs, que englobam as carboxipeptidases, as endopeptidases e as transpeptidases, apresentam diferentes afinidades para os vários antibióticos β-lactâmicos (Kohanski et al., 2010).

### 3.1 Mecanismos de Resistência aos antibióticos β-lactâmicos

São quatro os mecanismos de resistência aos antibióticos β-lactâmicos, sendo que podem atuar individualmente ou em conjunto de forma a aumentar e tornar mais eficaz a resistência (Rúben et al., 2013; Zeng & Lin, 2013; Karen Bush & Bradford, 2016).

#### 3.1.1 Modificação das PLPs

A interação entre antibióticos e moléculas-alvo é um processo extremamente específico. Como tal, qualquer modificação na estrutura da proteína alvo, por mais pequena que seja, vai influenciar o processo de ligação do antibiótico. No entanto, desde que permitam manter o seu funcionamento normal, podem contribuir para um fenótipo de resistência a esse mesmo antibiótico (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, & Piddock, 2015).

## Introdução

A redução da afinidade dos antibióticos às PLPs pode acontecer por diferentes motivos. Uma das razões é a mutação de genes que codificam as PLPs, conduzindo a alterações estruturais que impedem a correta ligação do antibiótico  $\beta$ -lactâmico à proteína alvo (Blair et al., 2015). Um exemplo bem estudado é o caso MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina). A presença do gene *mecA* codifica a proteína PLP2a, responsável por conferir o fenótipo de resistência à meticilina. Esta proteína é uma transpeptidase, que atua na síntese do peptidoglicano, sendo diferente da produzida endogenamente por *S. aureus*. Desta forma, a PLP2a está associada a uma forte resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, assegurando a síntese da parede celular na presença de uma concentração de antibiótico, supostamente, letal, o que apenas é possível devido à manutenção da atividade enzimática da PLP2a, uma vez que esta, estando mutada, não se liga aos antibióticos (Drawz & Bonomo, 2010; K. Bush, 2012; Rúben et al., 2013; Blair et al., 2015; Karen Bush & Bradford, 2016; Kapoor, Saigal, & Elongavan, 2017).

Outra forma de reduzir a afinidade é a alteração da estrutura do local alvo sem que haja mutações nos genes codificadores das PLPs. Um exemplo deste mecanismo é a metilação do gene que codifica o 16S rARN de forma a alterar o sítio de ligação e impedindo, assim, a ligação dos antibióticos (Blair et al., 2015).

Pode haver também a aquisição de novas PLPs (Zeng & Lin, 2013). Este forma é a mais comum em bactérias de Gram-positivo (K. Bush, 2012).

### **3.1.2 Alteração das porinas**

As bactérias de Gram negativo são por natureza menos permeáveis aos antibióticos do que as bactérias de Gram positivo, pois a sua membrana externa forma uma barreira de permeabilidade (Blair et al., 2015). A diminuição da expressão de proteínas da membrana externa, *Outer Membrane Proteins* (OMPs), também designados por canais de porina, é um mecanismo de resistência. De modo a alcançar as PLPs, os antibióticos hidrofílicos devem ser capazes de atravessar os canais de porina na membrana externa das bactérias de Gram negativo, assim a diminuição da permeabilidade da membrana externa diminui a suscetibilidade aos antibióticos. (Drawz & Bonomo, 2010). A redução da permeabilidade é alcançada pelo aparecimento de mutações e pela inserção de elementos genéticos móveis nos genes que codificam as porinas ou nas sequências que regulam a sua expressão. Estes eventos podem ser responsáveis pela produção de porinas com menor atividade/menor seletividade e pela sub-regulação das porinas (Blair et al., 2015;

## Introdução

Drawz & Bonomo, 2010). Algumas *Enterobacteriaceae* como por exemplo a *Escherichia coli* exibem resistência aos carbapenemos com base na perda de OMPs. Dados recentes mostraram que em *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp., as reduções na expressão de porinas contribuem significativamente para a resistência a antibióticos como carbapenemos e cefalosporinas, aos quais a resistência é geralmente mediada pela degradação enzimática (Blair et al., 2015; Drawz & Bonomo, 2010).

A pressão exercida pela exposição aos antibióticos pode favorecer o aparecimento de mutações nos genes da porinas, assim como nos genes que regulam a expressão das porinas. Um estudo de Tängdén e colaboradores, 2013 comprovou que a exposição de *Escherichia coli* a carbapenemos provocou alterações nos genes codificadores das porinas levando a uma rápida acumulação dessas mutações.

É importante notar que a interrupção das OMPs por si só nem sempre é suficiente para produzir o fenótipo de resistência e, normalmente, esse mecanismo é encontrado em combinação com a expressão de  $\beta$ -lactamase (Doumith, Ellington, Livermore, & Woodford, 2009).

### **3.1.3 Mecanismos de efluxo**

Bombas de efluxo são proteínas membranares, codificadas no cromossoma ou em plasmídeos (El Salabi, Walsh, & Chouchani, 2013), que exportam ativamente os antibióticos para fora da célula, de forma a manterem baixas concentrações destas drogas no seu interior. Estas bombas podem ser específicas para determinados antibióticos. Porém, a sua maioria tem a capacidade de exportar antibióticos de várias classes, sendo designadas por bombas de efluxo que conferem multirresistência (MDR). Assim, este tipo de mecanismo de resistência contribui, de forma significativa, para o desenvolvimento de multirresistência aos antibióticos (Drawz & Bonomo, 2010; Giedraitiene, Vitkauskienė, Naginiene, & Pavilonis, 2011; Blair et al., 2015). Embora todas as bactérias possuam múltiplos genes que codificam bombas de efluxo de MDR nos cromossomas, alguns desses genes são movidos para plasmídeos que podem ser transferidos entre bactérias (Rúben et al., 2013).

Existem dois tipos de bombas de efluxo: as bombas dependentes de ATP e as bombas de transporte secundário, movidas por uma força motriz protônica (PMF – *Proton Motive Force*). Há quatro famílias de bombas que usam força motriz protônica: RND (*Resistance Nodulation Division*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), SMR (*Small Multidrug Resistance*) e MATE (*Multidrug and Toxic Compounds Extrusion*). A única família

## Introdução

de bombas de efluxo que usa a energia da hidrólise do ATP é a ABC (*ATP-binding cassette*) (El Salabi et al., 2013; Fernandes et al., 2013).

O tipo RND, bombas de efluxo que conferem multirresistência, são as mais estudadas em bactérias de Gram negativo. Quando excessivamente expressas as bombas RND conferem níveis de multirresistência relevantes e são capaz de exportar uma ampla gama de compostos tóxicos, incluindo antibióticos, biocidas e metais pesados (Guérin et al., 2016). Estão localizadas na membrana citoplasmática da bactéria, trabalham em conjunto com uma proteína de fusão da membrana (MFP – *Membrane Fusion Protein*) que se estende pelo espaço periplasmático e uma proteína de efluxo da membrana externa (OEP – *Outer membrane Efflux Protein*). Essas três proteínas (RND-MFP-OEP) formam um complexo que pode mover um substrato (por exemplo, um antibiótico) do interior da bactéria para o exterior. O melhor caracterizado para esses complexos em *E. coli* é o complexo AcrAB-TolC, no qual AcrB é o RND, AcrA é o MFP e TolC é o OEP. Estas três proteínas formam um complexo com a capacidade de transportar substratos do interior para o exterior da célula bacteriana. Os exemplos melhor caracterizados são os complexos AcrAB-TolC e MexAB-OprM, presentes, respectivamente em *E. coli* e *P. aeruginosa*. Nestas, AcrB e MexB são as proteínas presentes na membrana citoplasmática, o AcrA e MexA são as MFP e as proteínas TolC e OprM são as OEP. Em *P. aeruginosa*, foi ainda demonstrado que uma bomba de efluxo semelhante, o complexo MexEF-OprN, tem como substrato os inibidores de  $\beta$ -lactamases (Rúben et al., 2013; Blair et al., 2015).

### **3.1.4 Produção de $\beta$ -lactamases**

Identificadas em 1940, um ano antes da utilização da penicilina, por Abraham e Chain num isolado de *Escherichia coli*, representam o principal mecanismo de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Drawz & Bonomo, 2010; Tooke et al., 2019). A produção de  $\beta$ -lactamases é o principal mecanismo de resistência aos antibióticos em bactérias de Gram-negativo (Giedraitiene et al., 2011; K. Bush, 2012; El Salabi et al., 2013). O termo  $\beta$ -lactamase refere-se às enzimas produzidas por microrganismos que hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, tornando-os inativos antes de atuarem nas PBPs (Drawz & Bonomo, 2010; El Salabi et al., 2013). Devido à rápida evolução e diversificação observada ao nível da resistência a antibióticos por produção de  $\beta$ -lactamases, existem, atualmente 4453 variantes conhecidas destas enzimas hidrolíticas (<http://www.bldb.eu/>) (Naas et al., 2019).

Assim, houve necessidade de organizar esta grande variedade de  $\beta$ -lactamases utilizando uma nomenclatura bem definida. A classificação molecular de Ambler e a

## Introdução

classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros representam os esquemas de classificação das  $\beta$ -lactamases mais utilizados, fundamentados de acordo com a sua estrutura primária e sequência nucleotídica (Doumith et al., 2009; Drawz & Bonomo, 2010; Giedraitiene et al., 2011; El Salabi et al., 2013; Tängdén et al., 2013; Guérin et al., 2016; Naas et al., 2019; Tooke et al., 2019) (Tabela 2)

A classificação proposta por Ambler baseia-se na homologia das sequências de nucleótidos e de aminoácidos das  $\beta$ -lactamases, agrupando-as em quatro classes: A, B, C e D. As  $\beta$ -lactamases podem ser divididas em dois grupos, de acordo com o aminoácido presente no sítio ativo: as metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs) e as serina- $\beta$ -lactamases. As MBLs, que englobam apenas a classe B, requerem a presença de um ou dois íons de zinco no sítio ativo para hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico. As serina- $\beta$ -lactamases, que incluem as classes A, C e D, hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico por intermédio do sítio ativo com o aminoácido serina (Drawz & Bonomo, 2010; Karen Bush & Jacoby, 2010; Giedraitiene et al., 2011; da Silva, Moreno, & Knöbl, 2013; El Salabi et al., 2013; Toussaint & Gallagher, 2015; Karen Bush & Bradford, 2016; Tooke et al., 2019).

As quatro classes moleculares de  $\beta$ -lactamases podem ainda ser divididas, de acordo com Bush e Jacoby, em grupos funcionais, os quais se baseiam na sua capacidade em hidrolisar antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e no seu perfil de inibição pelos inibidores de  $\beta$ -lactamases. O grupo 1 (1 e 1e) associado à classe molecular C de Ambler incluem cefalosporinas e, como tal, hidrolisam cefalosporinas apresentando, maioritariamente, resistência aos inibidores de  $\beta$ -lactamases, em especial ao ácido clavulânico. Enzimas do grupo 1, quando produzidas em grandes quantidades, podem conferir resistência a carbapenemos, em particular ao ertapenemo. O grupo 2 inclui as classes moleculares A e D de Ambler, representa o maior e mais abrangente grupo de  $\beta$ -lactamases. Subdividido em vários subgrupos, o grupo 2 possui enzimas com a capacidade de hidrolisar, globalmente, todas as classes de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Os seus subgrupos mais importantes são o subgrupo 2be, que engloba as ESBLs, e o subgrupo 2f, das carbapenemases com sítio ativo serina. O grupo 3 inclui a classe molecular B de Ambler onde estão englobadas as MBLs. Destacam-se pela capacidade de hidrolisar carbapenemos. Este é também um grupo de enzimas com bastante interesse ao nível da resistência, uma vez que conseguem hidrolisar todas as classes de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, à exceção dos monobactâmicos, em relação aos quais possui fraca capacidade hidrolítica. Ao contrário do que acontece com as carbapenemases de sítio ativo serina, estas enzimas não são inibidas por nenhuma das combinações de inibidores de  $\beta$ -lactamases utilizadas atualmente, sendo inibidos apenas por agentes quelantes de metais como, por exemplo, o EDTA (ácido etilenodiamina tetra-acético) (Drawz & Bonomo, 2010;



## Introdução

Karen Bush & Jacoby, 2010; Giedraitiene et al., 2011; da Silva, Moreno, & Knöbl, 2013; El Salabi et al., 2013; Toussaint & Gallagher, 2015; Karen Bush & Bradford, 2016; Tooke et al., 2019).

| Bush-Jacoby (2009) | Ambler | Substratos preferenciais                                      | Inibido por       |      | $\beta$ -lactamases representativas                                                          |
|--------------------|--------|---------------------------------------------------------------|-------------------|------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
|                    |        |                                                               | Ácido clavulânico | EDTA |                                                                                              |
| <b>1</b>           | C      | Cefalosporinas                                                | -                 | -    | <i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1, ACC-1, LAT, MOX-1, MOX-2, DHA-1, CFE-1 |
| <b>1e</b>          | C      | Cefalosporinas                                                | -                 | -    | GC1, CMY-37                                                                                  |
| <b>2a</b>          | A      | Penicilinas                                                   | +                 | -    | PC1                                                                                          |
| <b>2b</b>          | A      | Penicilinas, Cefalosporinas 1ª geração                        | +                 | -    | TEM-1, TEM-2, SHV-1                                                                          |
| <b>2be</b>         | A      | Penicilinas, Cefalosporinas (1ª a 4ª geração), monobactâmicos | +                 | -    | ESBL: TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1                                                   |
| <b>2br</b>         | A      | Penicilinas, inibidores das $\beta$ -lactamases               | -                 | -    | TEM-30, SHV-10                                                                               |
| <b>2ber</b>        | A      | Cefalosporinas de largo espectro, monobactâmicos              | -                 | -    | TEM-50                                                                                       |
| <b>2c</b>          | A      | Penicilinas, Carbenicilina                                    | +                 | -    | PSE-1, CARB-3                                                                                |
| <b>2ce</b>         | A      | Carbenicilina, cefepime                                       | +                 | -    | RTG-4                                                                                        |
| <b>2d</b>          | D      | Penicilinas, cloxacilina                                      | Variável          | -    | OXA-1, OXA-10                                                                                |
| <b>2de</b>         | D      | Penicilinas, Cefalosporinas de largo espectro, Monobactâmicos | Variável          | -    | OXA-11, OXA-15                                                                               |
| <b>2df</b>         | D      | Carbapenemos                                                  | Variável          | -    | OXA-23, OXA-48                                                                               |
| <b>2e</b>          | A      | Cefalosporinas de largo espectro                              | +                 | -    | CepA                                                                                         |
| <b>2f</b>          | A      | Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemos                     | Variável          | -    | KPC-2, IMI-1, SME-1                                                                          |
| <b>3a</b>          | B (B1) | Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemos                     | -                 | +    | IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1                                                                    |
|                    | B (B3) |                                                               |                   |      | L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1                                                                      |
| <b>3b</b>          | B (B2) | Carbapenemos                                                  | -                 | +    | CphA, Sfh-1                                                                                  |

**Tabela 2** - Classificação das  $\beta$ -lactamases segundo Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros. ADAPTADO DE: (Karen Bush & Jacoby, 2010; da Silva et al., 2013) **Legenda:** EDTA - ácido etilenodiaminotetracético; NI = não incluído, ND - não determinada; (-) - não inibido; (+) - inibido;



### **3.2 $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado – ESBLs<sup>1</sup>**

O principal mecanismo de resistência às oximino-cefalosporinas, é a produção de ESBLs. Atualmente, este grupo de enzimas constitui uma das maiores preocupações em termos de resistência aos antibióticos. Tal deve-se ao facto destas  $\beta$ -lactamases, para além de conferirem resistência a penicilinas, terem a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de espectro alargado ou estendido, como os monobactams (aztreoname) e cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima, ceftazidima, cefpodoxima, ceftriaxona e ceftiofur) de 4ª geração (cefepima) e 5ª geração (Drawz & Bonomo, 2010; Fernandes et al., 2013).

*Escherichia coli* é uma das principais espécies da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs. Outras espécies de bactérias de Gram negativo como *Pseudomonas aeruginosa* são também produtores destas enzimas (da Silva et al., 2013).

As enzimas descritas originando fenótipo ESBL, são exclusivas do grupo 2, classe A de Ambler, e são, na sua maioria, variantes das famílias TEM, SHV, CTX-M, GES e VEB, sendo estas duas últimas menos comuns. A família OXA também integra o grupo das ESBLs, mas pertence ao subgrupo 2de, sendo englobada na classe D de Ambler. As ESBLs das famílias TEM, SHV e OXA tiveram origem em mutações pontuais ocorridas nos genes plasmídicos parentais *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>TEM-2</sub>, *bla*<sub>SHV-1</sub> e *bla*<sub>OXA-10</sub>. Ao contrário destas, as  $\beta$ -lactamases CTX-M tiveram origem na mobilização de genes *bla* cromossómicos de *Kluyvera* spp., através da sua incorporação em elementos genéticos móveis (Karen Bush & Jacoby, 2010; Drawz & Bonomo, 2010).

A família CTX-M, contrariamente às famílias TEM e SHV, é bastante heterogénea, incluindo cinco grupos principais: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25. Cada grupo de CTX-M é constituído por variantes alélicas. No entanto, a sua maioria pertence ao grupo 1 e 9, o que sugere que estes grupos apresentem maior capacidade de adaptação (Fernandes et al., 2013; Shaikh, Fatima, Shakil, Rizvi, & Kamal, 2015). As  $\beta$ -lactamases CTX-M são assim denominadas devido às suas propriedades funcionais, uma vez que possuem uma forte atividade cefotaximase. Assim, esta família de ESBLs é caracterizada por ter uma maior eficiência catalítica à cefotaxima do que a qualquer outro antibiótico oximino- $\beta$ -lactâmico (Karen Bush & Jacoby, 2010; Drawz & Bonomo, 2010; Fernandes et al., 2013; Shaikh et al., 2015; Tooke et al., 2019).

<sup>1</sup>Neste trabalho é utilizada a sigla ESBL da designação em inglês *Extended Spectrum Beta-Lactamase* para designação de Beta-Lactamases de Espectro Alargado

## Introdução

### **3.2.1. Combinação de antibióticos $\beta$ -lactâmicos com inibidores de $\beta$ -lactamases**

Os inibidores de  $\beta$ -lactamases apresentam estrutura química semelhante aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos com presença do anel  $\beta$ -lactâmico, fundamental na ligação irreversível ao local de ação das  $\beta$ -lactamases, tornando-as inativas. Desde a descoberta e desenvolvimento do ácido clavulânico como um inibidor irreversível das enzimas da classe A (por exemplo, as classes TEM, SHV e CTX-M), combinações de inibição da penicilina (amoxicilina-clavulanato, ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam) encontraram uma ampla aplicação em tratamento de infecções (Drawz & Bonomo, 2010; Tooke et al., 2019).

### **3.3 Carbapenemases**

Carbapenemases, são  $\beta$ -lactamases com a capacidade de hidrolisar carbapenemos, que estão distribuídas por 3 classes moleculares: as pertencentes à classe A, as MBLs, pertencentes à classe B e as OXA-carbapenemases, pertencentes à classe D (Rolain & Cornaglia, 2014).

As carbapenemases da classe molecular A de Ambler pertencem ao subgrupo funcional 2f, e as  $\beta$ -lactamases representativas são KPC-2, IMI-1, SME-1. Para além de hidrolisarem carbapenemos, estas  $\beta$ -lactamases podem conferir resistência a cefalosporinas e a penicilinas, mas podem ser inibidas por inibidores de  $\beta$ -lactamases. Clinicamente, o grupo mais importante é o das KPC, pois estas enzimas estão associadas a infecções causadas por bactérias de Gram-negativo multirresistentes, muitas vezes na origem de surtos clínicos (Karen Bush & Jacoby, 2010; Drawz & Bonomo, 2010; Rolain & Cornaglia, 2014).

As carbapenemases da classe molecular D de Ambler pertencem ao subgrupo funcional 2df, e as  $\beta$ -lactamases representativas são OXA-23 e OXA-48. Este tipo de carbapenemases baseia-se em mecanismos sinérgicos, como bombas de efluxo, sendo desta forma capaz de produzir resistência a carbapenemos. Podem ser inibidas por inibidores de  $\beta$ -lactamases (Karen Bush & Jacoby, 2010; Drawz & Bonomo, 2010; Rolain & Cornaglia, 2014).

Por fim, o último grupo de carbapenemases, e de grande importância, são as MBLs que são frequentemente encontradas em *Enterobacteriaceae*. Estas são as carbapenemases com maior diversidade molecular e que representam uma das maiores

## Introdução

ameaças clínicas. Pertencentes à classe molecular B de Ambler pertencem ao subgrupo funcional 3<sup>a</sup> e 3b, e as  $\beta$ -lactamases representativas são IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 e CphA, Sfh-1, respetivamente. Mais recentemente as NDM (*New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase*) Ao contrário das carbapenemases da classe A e D, as MBLs são resistentes aos inibidores de  $\beta$ -lactamase (ácido clavulânico), mas inibidas por quelantes de metais (EDTA) (Karen Bush & Jacoby, 2010). Esta resistência deve-se ao mecanismo único de hidrólise utilizado por estas enzimas. No seu sítio ativo, possuem um ião de zinco que vai coordenar e apresentar iões de água polarizados para o ataque oxianiónico ao anel  $\beta$ -lactâmico (Drawz & Bonomo, 2010; Tooke et al., 2019).

### **3.4 Antibióticos não $\beta$ -lactâmicos e principais mecanismos de resistência**

Os antibióticos podem ser classificados com base em diferentes critérios, entre os quais se destacam os seus mecanismos de ação, espectros de ação e estruturas químicas. Uma vez que antibióticos com estruturas químicas semelhantes apresentam também padrões de atividade, efetividade e toxicidade semelhantes, este é o critério de classificação mais utilizado, e segundo o qual serão enumeradas as várias classes de antibióticos no presente trabalho. Existem diferentes tipos de antibióticos que, apesar da sua diversidade, podem ser agrupados num reduzido número de classes. De entre as grandes classes de antibióticos, encontram-se os aminoglicosídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas e outros agentes (Agnese Lupo, A. Bonomo, Andrea Endimiani, & Krisztina, 2015).

Os aminoglicosídeos e as tetraciclina atuam de forma similar. O modo de ação dos aminoglicosídeos resulta da sua ligação à subunidade 30S do ribossoma, que conduz à inibição da síntese proteica. As tetraciclina também inibem a síntese proteica, comprometendo a ligação estável do aminoacil-tARN ao local A do ribossoma bacteriano. O principal mecanismo de resistência a estes antibióticos é a eliminação dos mesmos para fora da bactéria através de bombas de efluxo, e através de mutações no 16S rARN (Lambert, 2012).

A resistência às fluoroquinolonas pode estar codificada no cromossoma ou em plasmídeos. A resistência codificada pelo cromossoma pode conduzir à diminuição da permeabilidade da membrana externa (devido à perda de porinas), à expressão excessiva de bombas de efluxo naturais ou a mutações nas subunidades da DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) e da topoisomerase IV (*parC* e *parE*). (Hooper & Jacoby, 2016). Na resistência codificada

## Introdução

em plasmídeos destaca-se o determinante qnr (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD*), que codifica para uma proteína que protege a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição pelas quinolonas; e uma variante *aac(6')-Ib-cr*, que tem uma substituição em dois aminoácidos e que codifica para uma aminoglicosilacetiltransferase capaz de acetilar a ciprofloxacina (Van Hoek et al., 2011; Hooper & Jacoby, 2016).

É também de destacar neste trabalho a resistência ao cloranfenicol. O mecanismo de resistência mais comum é a inativação enzimática por produção de diferentes acetiltransferases codificadas pelos genes *cat*. Outros mecanismos já observados são: a inativação por produção de fosfotransferases, impermeabilidade, mutações no sítio alvo e sistemas de efluxo (Fernández et al., 2012).

---

## **II - OBJETIVOS**

## **Objetivos**

Este trabalho consistiu numa abordagem exploratória para a deteção e caracterização bactérias de Gram negativo resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não  $\beta$ -lactâmicos, em amostras de carne de aves e suíno de diferentes origens e recolhidas em hipermercados, comércio local e produção “caseira”.

---

## **III – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. Processamento das amostras de carne**

As amostras foram obtidas em vários hipermercados, talhos de comércio local e produção “caseira”. O transporte foi realizado em mala térmica através de arrefecimento por termoacumuladores.

Cerca de 4g de amostra foram inoculadas em meio de enriquecimento TSB (Caldo *Tryptic Soy*), e homogeneizadas. Logo de seguida cerca de 100 µl do sobrenadante foram inoculados e o restante foi incubado durante 24h a 37°C. Após o período de incubação foram inoculados mais 100 µl já enriquecidos, pela técnica de espalhamento em meio de cultura MacConkey agar, meio de cultura seletivo e diferencial para diferenciação de bacilos de Gram negativo fermentadores e não fermentadores da lactose, sem e com antibiótico: ampicilina (100µg/mL), cefotaxima (2µg/mL), meropenemo (2µg/mL) e ciprofloxacina ((2µg/mL).

Após 24h a 37°C foi realizada, em cada meio de cultura, a avaliação da densidade das unidades formadoras de colónia por mililitro (UFC/mL), o que permitiu conhecer aproximadamente a densidade de bacilos de Gram negativos resistentes aos antibióticos presentes nos meios de cultura. A seleção dos isolados relevantes fermentadores e não fermentadores da lactose, de morfotipos diferentes, foi efetuada reisolando-se os bacilos de Gram negativo nos respetivos meios de seleção, com o objetivo de obter culturas puras para a realização de testes de suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos e não β-lactâmicos.

Como controlo negativo, e para avaliar a capacidade de seleção dos meios de cultura de MacConkey agar e MacConkey com antibiótico: ampicilina (100µg/mL), cefotaxima (2µg/mL), meropenemo (2µg/mL) e ciprofloxacina (2µg/mL), foi utilizada uma estirpe *Escherichia coli* ATCC® 25922 (ATCC, Virginia, U.S.A.), sensível aos antibióticos incorporados nos meios de cultura. A inibição do crescimento da estirpe controlo permitiu garantir a capacidade de seleção dos meios de cultura com antibiótico, após confirmação do seu crescimento em meio de cultura sem antibiótico.

### **2. Identificação dos isolados**

A identificação dos isolados foi realizada com recurso às características morfológicas das colónias, utilização de meio de cultura CHROMagar™ Orientation (CHROMagar, Paris,



## Materiais e Métodos

França), e galeria de identificação ID 32 GN para identificação de bacilos de Gram negativo (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, França).

### 3. Determinação do fenótipo de resistência aos antibióticos

#### 3.1 Teste de suscetibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em agar

Com o objetivo de caracterizar o fenótipo de resistência dos isolados aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não  $\beta$ -lactâmicos, foram realizados testes de suscetibilidade pelo método de difusão em agar. Assim, foram preparadas suspensões bacterianas com turvação de 0,5 na escala de McFarland, ressuspendendo entre uma a três colônias de culturas puras em cerca de 2mL de soro fisiológico estéril. Posteriormente procedeu-se à inoculação em meio de cultura Mueller-Hinton II (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, França), utilizando zaragatoas estéreis e espalhando por toda a superfície do meio de cultura e em direções perpendiculares. De seguida foram colocados discos impregnados com os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não  $\beta$ -lactâmicos a testar (tabela X). Após incubação de 24h a 37°C, os halos de inibição de crescimento bacteriano foram determinados e, foi analisada a presença de sinergismos e/ou antagonismos. Os diâmetros dos halos de inibição foram classificados como sensível (S), intermédio (I) ou resistente (R). Esta classificação foi dada seguindo os critérios do EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2019 (EUCAST, 2019) e da Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2019). Foi também utilizada a estirpe *Escherichia coli* ATCC® 25922, como forma de controlo para verificação da eficácia dos discos dos antibióticos testados.

| Classe de Antibiótico                          | Antibiótico                           | Concentração ( $\mu$ g) |
|------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| <b>Penicilinas</b><br>( $\beta$ -lactâmico)    | Ampicilina (AMP)                      | 10                      |
|                                                | Amoxicilina + Ácido clavulânico (AMC) | 30                      |
|                                                | Piperacilina (PRL)                    | 36 e 110                |
|                                                | Piperacilina + Tazobactame (TZP)      | 30 e 100                |
| <b>Cefalosporinas</b><br>( $\beta$ -lactâmico) | Cefotaxima (CTX)                      | 30                      |
|                                                | Ceftazidima (CAZ)                     | 10 e 30                 |
|                                                | Ceftiofur (EFT)                       | 30                      |
|                                                | Ceftarolina (CPT)                     | 5                       |
|                                                | Cefepime (FEP)                        | 30                      |
|                                                | Cefoxitina (FOX)                      | 30                      |
|                                                | Cefuroxima (CXM)                      | 30                      |
| <b>Carbapenemos</b><br>( $\beta$ -lactâmico)   | Meropenemo (MRP)                      | 10                      |
|                                                | Ertapenemo (ETP)                      | 10                      |
|                                                | Imipenemo (IMI)                       | 10                      |
|                                                | Doripenemo (DOR)                      | 10                      |

## Materiais e Métodos

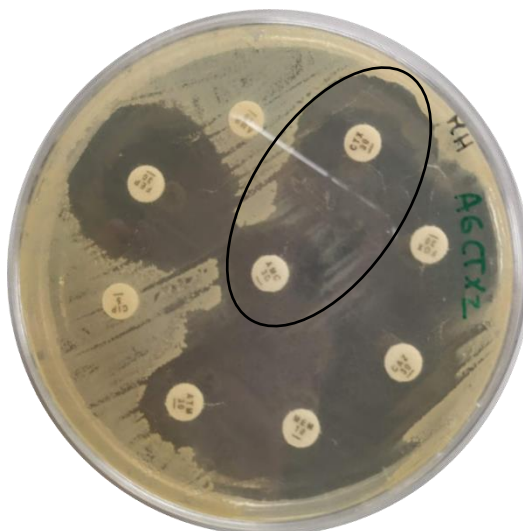
|                                                |                                    |           |
|------------------------------------------------|------------------------------------|-----------|
| <b>Monobactâmicos</b><br>( $\beta$ -lactâmico) | Aztreonamo (ATM)                   | 30        |
| <b>Floroquinolonas</b>                         | Ciprofloxacina (CIP)               | 5         |
|                                                | Ácido nalidixico (NA)              | 30        |
|                                                | Enrofloxacin (ENR)                 | 5         |
| <b>Aminoglicosídeos</b>                        | Amicacina (AK)                     | 30        |
|                                                | Gentamicina (CN)                   | 10        |
|                                                | Netilmicina (NET)                  | 10        |
|                                                | Tobramicina (TOB)                  | 10        |
| <b>Outros Agentes</b>                          | Fosfomicina (FOT)                  | 200       |
|                                                | Nitrofurantoína (F)                | 100 e 300 |
|                                                | Colistina (CT)                     | 25        |
|                                                | Cloranfenicol (C)                  | 30        |
|                                                | Sulfametoxazole/trimetoprima (SXT) | 25        |
| <b>Tetraciclina</b>                            | Tetraciclina (TE)                  | 30        |
|                                                | Tigeciclina (TGC)                  | 15        |

**Tabela 3** - Lista de antibióticos e as respectivas concentrações que foram utilizados na realização dos testes de suscetibilidade organizados por classes.

### 3.2 Avaliação da expressão de $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado

#### 3.2.1 Detecção de sinergismo no teste de suscetibilidade aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos pelo método de difusão em agar

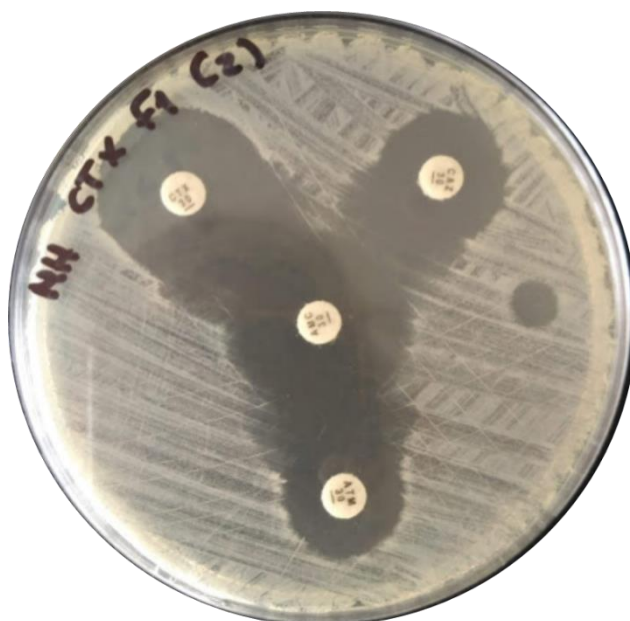
A detecção da expressão de ESBLs foi avaliada pela presença de sinergismo entre os discos de oximino- $\beta$ -lactâmicos e o disco da associação amoxicilina com ácido clavulânico, no teste de suscetibilidade pelo método de difusão em agar.



**Figura 3** – Exemplo de detecção da expressão de ESBLs pela presença de sinergismo entre os discos de oximino- $\beta$ -lactâmicos e o disco da associação amoxicilina com ácido clavulânico. Fonte: O presente trabalho.

### 3.2.2. Teste da aproximação de disco ou Teste de duplo disco

A detecção de ESBL foi realizada pelo teste fenotípico de aproximação de disco ou teste de duplo disco, primeiramente descrito por Jarlier *et al.* 1988. No centro da placa foi colocado o disco com amoxicilina/ácido clavulânico e ao redor os outros antibióticos a uma distância de 30 mm em relação ao disco central. A leitura do teste foi realizada após 24 h de incubação a 37°C. O resultado positivo para ESBL é indicado pelo aumento do halo de inibição ou pela a formação de uma zona fantasma entre os antibióticos e o disco de amoxicilina/ácido clavulânico (Harada, Ishii, & Yamaguchi, 2008). Para a realização deste teste foram preparadas suspensões bacterianas com turvação de 0,5 na escala de McFarland, ressuspendendo entre uma a três colônias de culturas puras em cerca de 2mL de soro fisiológico estéril. Posteriormente procedeu-se à inoculação em meio de cultura Mueller-Hinton II (Biomériux, Marcy-l'Etoile, França), utilizando zaragatoas estéreis e espalhando por toda a superfície do meio de cultura e em direções perpendiculares.



**Figura 4** – Exemplo de Teste da aproximação de disco ou Teste de duplo disco, indicando a formação de uma zona fantasma entre os antibióticos e o disco de amoxicilina/ácido clavulânico. Fonte: O presente trabalho.

## 4. Caracterização de genes de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos e não $\beta$ -lactâmicos

A presença de genes de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não  $\beta$ -lactâmicos foi avaliada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), após leitura interpretativa

## **Materiais e Métodos**

dos antibiogramas. Nas reações de amplificação por PCR foram utilizados primers e condições específicas.

### **4.1 Extração do DNA bacteriano**

Para a caracterização genotípica dos isolados em estudo, foi primeiramente realizada pelo método convencional a extração do DNA bacteriano, que consiste na lise de suspensão bacteriana por fervura. Todos os isolados foram previamente repicados para o meio de cultura CLED (Cistina-Lactose eletrólito deficiente), e submetidos a um período de incubação de 24h a 37°C. Posteriormente, uma quantidade de colónias de uma cultura pura correspondente a uma ansa de 10 µL foi ressuspensa, em 20 µl de água ultra pura estéril num microtubo. De seguida a suspensão foi submetida a um ciclo de aquecimento no equipamento *T100™ Thermal Cycler* (Biorad) durante 15 minutos a 99°C. Após este ciclo foram adicionados 180µl de tampão TE 1X (Tris 10mM – EDTA 1mM) com o objetivo de inibir a ação de RNases e DNases. Posteriormente para a remoção dos resíduos celulares a suspensão foi centrifugada durante 15 minutos a 13000 RPMs. O sobrenadante obtido contendo o DNA foi guardado e conservado a -20°C para utilização posterior nas reações de PCR.

### **4.2 Condições de amplificação das reações de PRC**

Todas as misturas de PCR foram constituídas de forma a perfazerem um volume final de 25 µl, com os seguintes componentes: água ultra pura estéril, tampão da reação, cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), primers (forward e reverse), desoxirribunocleotídeos (dNTP's) e Taq polimerase (Finnzymes DyNAzyme II DNA Polymerase). As concentrações dos componentes e condições das reações de amplificação foram ajustadas de acordo com o descrito na bibliografia para os primers utilizados e o tamanho do fragmento a amplificar. O DNA foi, por último, adicionado à mistura de PCR, sendo de imediato iniciado o programa de amplificação. Todas as reações de PCR foram realizadas no termociclador *T100™ Thermal Cycler* (Biorad), e de forma a obter resultados mais confiáveis foi sempre utilizado como controlo negativo água ultra pura estéril e sempre que possível um controlo positivo para o gene a amplificar.

Após conclusão de cada reação de PCR, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose para averiguar a presença dos genes em estudo. Para reações de PCR multiplex foram preparados géis de agarose a 2% (2g de agarose em 100mL de tampão TAE (Tris-

## **Materiais e Métodos**

Acetato-EDTA), e para reações de PCR simples géis com concentração de 1,5% (1,5g de agarose em 100mL de tampão TAE). Após estabilização da temperatura do gel, foi ainda adicionado o marcador molecular *MIDORI<sup>Green</sup> Advanced* (NIPPON Genetics Europe, Dueren, Germany). Nos poços do gel, foram aplicadas amostras de produto de PCR juntamente com o corante azul de bromofenol, de forma a perfazerem um volume final de 8µl. As amostras foram corridas a 90v durante 90 minutos para o gel de 2% e a 100V durante 30 minutos para o gel de 1,5% em tampão TAE. Num dos poços foi sempre aplicado um marcador de peso molecular para estimar o tamanho dos produtos amplificados das amostras. A identificação do(s) gene(s) presentes nos produtos de PCR foi realizada por comparação do tamanho dos produtos (pb) com os controlos positivos presentes e com base na bibliografia.

### **4.3 Caracterização dos genes que codificam $\beta$ -lactamases**

A caracterização dos genes produtores de  $\beta$ -lactamases foi realizada após confirmação fenotípica de produção de ESBL. Foi efetuada a pesquisa dos genes pertencentes à família da classe A segundo a classificação de Ambler, *bla<sub>TEM</sub>* (variantes TEM-1 e TEM-2), *bla<sub>SHV</sub>* (variantes SHV e SHV-1) e *bla<sub>CTX-M</sub>* grupo 1, 2, 8, 9 e 25. E pertencente à classe D o gene *bla<sub>OXA</sub>* (inclui as variantes OXA-1, OXA-4 e OXA-30). A caracterização foi realizada através de duas reações de PCR multiplex distintas, uma para os genes *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>OXA</sub>*, e outra para os genes *bla<sub>CTX-M</sub>* grupo 1, 2, 8, 9 e 25, utilizando primers específicos (Tabela 4).

### **4.4 Caracterização dos genes que codificam carbapenemases**

A caracterização dos genes que codificam carbapenemases foi realizada após deteção de redução da suscetibilidade aos carbapenemos no teste de suscetibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em agar. Foi realizada uma reação de PCR multiplex para os genes *bla<sub>IMP</sub>* (variante IMP-1), *bla<sub>VIM</sub>* (variante VIM-2) e *bla<sub>NDM</sub>* (variante NDM-1) (classe B das carbapenemases), *bla<sub>KPC</sub>* (variante KPC-2) (classe A) e o gene *bla<sub>OXA-48</sub>* (classe D), utilizando primers específicos (Tabela 4).

### **4.5 Caracterização dos genes que codificam resistência aos antibióticos não $\beta$ -lactâmicos**

A caracterização dos genes que codificam resistência aos antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos, foi realizada após avaliação dos testes de suscetibilidade, nomeadamente a resistência ao antibiótico ciprofloxacina (CIP). Foram efetuadas, utilizando primers específicos, reações de PCR simplex para cada um dos seguintes genes: *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *gyrA* e *parC*. (Tabela 4).

## Materiais e Métodos

| Objetivo                                             | Gene                               | Nome do Primer           | Sequência do Primer (5'→3')  | Tamanho do Produto Amplificado (pd) | Referência                                         |
|------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <b><math>\beta</math>-lactamases</b>                 | <i>bla<sub>TEM</sub></i>           | TEM F                    | 5'-CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC-3' | 800                                 | (Dallenne, da Costa, Decré, Favier, & Arlet, 2010) |
|                                                      |                                    | TEM R                    | 5'-CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC-3' |                                     |                                                    |
|                                                      | <i>bla<sub>SHV</sub></i>           | SHV F                    | 5'-AGCCGCTTGAGCAAATTAAC-3'   | 713                                 | (Dallenne et al., 2010)                            |
|                                                      |                                    | SHV R                    | 5'-ATCCCGCAGATAAATCACCAC-3'  |                                     |                                                    |
|                                                      | <i>bla<sub>OXA</sub></i>           | OXA F                    | 5'-GGCACCAGATTCAACTTTCAAG-3' | 564                                 | (Dallenne et al., 2010)                            |
|                                                      |                                    | OXA R                    | 5'-GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG-3' |                                     |                                                    |
|                                                      | <i>bla<sub>CTX-M grupo1</sub></i>  | multiplex CTX GROUP 1 F  | 5'-AAAAATCACTGCGCCAGTTC-3'   | 415                                 | (Woodford, Fagan, & Ellington, 2006)               |
|                                                      |                                    | multiplex CTX GROUP 1 R  | 5'-AGCTTATTCATCGCCACGTT-3'   |                                     |                                                    |
| <b>MBLs</b>                                          | <i>bla<sub>IMP</sub></i>           | IMP F                    | 5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3' | 232                                 | (Poirel, Walsh, Cuvillier, & Nordmann, 2011)       |
|                                                      |                                    | IMP R                    | 5'-GGTTTAAYAAAACAACCACC-3'   |                                     |                                                    |
|                                                      | <i>bla<sub>VIM</sub></i>           | VIM F                    | 5'-GATGGTGTTTGGTCGCATA-3'    | 390                                 | (Poirel et al., 2011)                              |
|                                                      |                                    | VIM R                    | 5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'      |                                     |                                                    |
|                                                      | <i>bla<sub>NDM</sub></i>           | NDM F                    | 5'-GGTTTGGCGATCTGGTTTC-3'    | 621                                 | (Poirel et al., 2011)                              |
|                                                      |                                    | NDM R                    | 5'-CGGAATGGCTCATCACGATC-3'   |                                     |                                                    |
|                                                      | <i>bla<sub>CTX-M grupo8</sub></i>  | multiplex CTX GROUP 8 F  | 5'-TCGCGTTAAGCGGATGATGC-3'   | 666                                 | (Woodford et al., 2006)                            |
|                                                      |                                    | multiplex CTX GROUP 8 R  | 5'-AACCCACGATGTGGGTAGC-3'    |                                     |                                                    |
| <b>Carbapenemases classe A</b>                       | <i>bla<sub>CTX-M grupo9</sub></i>  | multiplex CTX GROUP 9 F  | 5'-CAAAGAGAGTGCAACGGATG-3'   | 205                                 | (Woodford et al., 2006)                            |
|                                                      |                                    | multiplex CTX GROUP 9 R  | 5'-ATTGGAAGCGTTCATCACC-3'    |                                     |                                                    |
|                                                      | <i>bla<sub>CTX-M grupo25</sub></i> | multiplex CTX GROUP 25 F | 5'-GCACGATGACATTCGGG-3'      | 327                                 | (Woodford et al., 2006)                            |
|                                                      |                                    | multiplex CTX GROUP 25 R | 5'-AACCCACGATGTGGGTAGC-3'    |                                     |                                                    |
|                                                      | <i>bla<sub>KPC</sub></i>           | KPC Fm                   | 5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3'   | 798                                 | (Poirel et al., 2011)                              |
|                                                      |                                    | KPC Rm                   | 5'-CTGTGCATCCTTGTTAGGCG-3'   |                                     |                                                    |
|                                                      | <i>bla<sub>OXA-48</sub></i>        | OXA F                    | 5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3'   | 438                                 | (Poirel et al., 2011)                              |
|                                                      |                                    | OXA R                    | 5'-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3'   |                                     |                                                    |
| <b>Resistência aos aminoglicosídeos e quinolonas</b> | <i>aac(6')-Ib-cr</i>               | aac-cr- F                | 5'-TTGCGATGCTCTATGAGTGG-3'   | 400                                 | (Coque et al., 2008)                               |
|                                                      |                                    | aac-cr-R                 | 5'-GCGTGTTCCGCTCGAATGCC-3'   |                                     |                                                    |
| <b>Resistência às quinolonas</b>                     | <i>qnrA</i>                        | qnrA F                   | 5'-GGATGCCAGTTTCGAGGA-3'     | 580                                 | (Cavaco LM et al. 2007)                            |
|                                                      |                                    | qnrA R                   | 5'-TGCCAGGCACAGATCTTG-3'     |                                     |                                                    |

**Tabela 4** - Sequência nucleotídica dos primers utilizados nas reacções de PCR e de sequenciação. **Legenda:** A - adenina, T - timina, C - citosina, G - guanina; F - forward, R - reverse; Y=T ou C; R=A ou G; S=G ou C; D=A or G or T.

## Materiais e Métodos

| Objetivo                                 | Gene              | Nome do Primer              | Sequência do Primer (5'→3')  | Tamanho do Produto Amplificado (pd) | Referência                                              |
|------------------------------------------|-------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Resistência às quinolonas                | <i>qnrB</i> (1-6) | qnrB (1-6) F                | 5'-GGMATHGAAATTCGCCACTG-3'   | 264                                 | (Cattoir et al., 2007)                                  |
|                                          |                   | qnrB (1-6) R                | 5'-TTTGCYGYTCGCCAGTCGAA-3'   |                                     |                                                         |
|                                          | <i>qnrC</i>       | qnrC F                      | 5'-GGGTTGTACATTTATTGAATC-3'  | -                                   | (Wang et al., 2009)                                     |
|                                          |                   | qnrC R                      | 5'-TCCACTTTACGAGGTTCT-3'     |                                     |                                                         |
|                                          | <i>qnrD</i>       | qnrD F                      | 5'-CGAGATCAATTTACGGGGAATA-3' | -                                   | (Cavaco, Hasman, Xia, & Aarestrup, 2009)                |
|                                          |                   | qnrD R                      | 5'-AACAAGCTGAAGCGCCTG-3'     |                                     |                                                         |
| <i>qnrS</i> (1-2)                        | qnrS (1-2) F      | 5'-TCGACGTGCTAACTTGCG-3'    | -                            | (Cavaco LM <i>et al.</i> 2007)      |                                                         |
|                                          | qnrS (1-2) R      | 5'-GATCTAAACCGTCGAGTTCGG-3' |                              |                                     |                                                         |
|                                          | <i>Coli gyrA</i>  | Coli gyrA F                 | 5'-ACGTACTAGGCAATGACTGG-3'   | 189                                 | (Sorlozano, Gutierrez, Jimenez, Luna, & Martínez, 2007) |
|                                          |                   | Coli gyrA R                 | 5'-AGAAGTCGC CGTCGATAGAAC-3' |                                     |                                                         |
|                                          | <i>Coli parC</i>  | Coli parC F                 | 5'-TGTATGCGATGTC TGAAGT-3'   | 264                                 | (Sorlozano et al., 2007)                                |
|                                          |                   | Coli parC R                 | 5'-CTCAATAGCAGCTCGGAATA-3'   |                                     |                                                         |
| Identificação do grupo clonal O25b-ST131 |                   | O25pabBspe-F                | 5'-TCCAGCAGGTGCTGGATCGT-3'   | 347                                 | (Clermont et al., 2009)                                 |
|                                          |                   | O25pabBspe-R                | 5'- GCGAAATTTTCGCCGTACTGT-3' |                                     |                                                         |
| Grupos filogenéticos A, B1, B2 e D       | <i>chuA</i>       | ChuA. 1                     | 5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3'   | 279                                 | (Clermont <i>et al.</i> 2000)                           |
|                                          |                   | ChuA. 2                     | 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'   |                                     |                                                         |
|                                          | <i>yjaA</i>       | YjaA. 1                     | 5'-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-3'   | 211                                 |                                                         |
|                                          |                   | YjaA. 2                     | 5'-ATGGAGAATGCGTTCCCTCAAC-3' |                                     |                                                         |
|                                          | <i>tspE4C2</i>    | TspE4C2. 1                  | 5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3'   | 152                                 |                                                         |
|                                          |                   | TspE4C2. 2                  | 5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'   |                                     |                                                         |

**Tabela 4 (continuação)** - Sequência nucleotídica dos primers utilizados nas reacções de PCR e de sequenciação. **Legenda:** A - adenina, T - timina, C - citosina, G - guanina; F - forward, R - reverse; Y=T ou C; R=A ou G; S=G ou C; D=A or G or T.



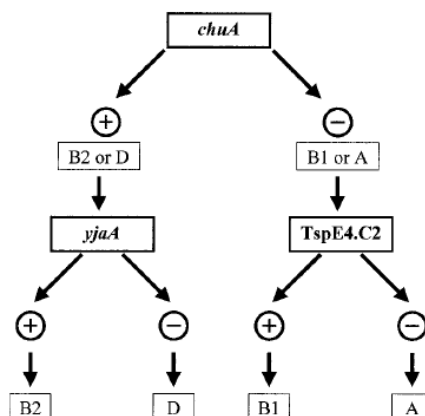
### 5. Caracterização molecular de isolados de *Escherichia coli* produtores de $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado

#### 5.1 Identificação do grupo clonal O25b-ST131

Para a detecção da presença do grupo clonal O25b-ST131 em isolados de *Escherichia coli*, foi realizada uma reação de PCR multiplex utilizando primers específicos (Tabela 4) e seguindo o descrito por Clermont et al., 2009. A detecção foi baseada na presença de dois genes: o gene *trpA* e o gene *pabB*. Apenas os isolados que amplificaram para os estes dois genes foram considerados positivos para o grupo clonal O25b-ST131.

#### 5.2 Identificação do grupo filogenético dos isolados de *Escherichia coli* produtora de $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado

Foi efetuada uma reação de PCR multiplex em isolados de *Escherichia coli* com o objetivo de identificar os grupos filogenéticos A, B1, B2 e D, sendo que as estirpes pertencentes aos últimos dois grupos (B2 e D) são consideradas patogênicas (Clermont et al., 2000). Seguindo o descrito por Clermont et al., 2000 e utilizando primers específicos (Tabela 4), a determinação dos grupo filogenéticos foi baseada na presença e ausência dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA *tspE4.C2*. A classificação dos grupos filogenéticos nos isolados de *Escherichia coli* baseou-se no seguinte: grupo filogenético A: ausência do gene *chuA* e ausência do fragmento *tspE4.C2*; grupo filogenético B1: ausência do gene *chuA* e presença do fragmento *tspE4.C2*; grupo filogenético B2: presença dos genes *chuA* e *yjaA*; grupo filogenético D: presença do gene *chuA* e ausência do gene *yjaA*.



**Figura 5** - Árvore de decisão dicotômica para determinar o grupo filogenético de uma estirpe de *E. coli* usando os resultados da amplificação por PCR dos genes *chuA* e *yjaA* e fragmento de DNA *tspE4.C2*.

### **5.3 Caracterização de genes que codificam fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* produtores de $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado**

Para identificação dos fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* foram realizadas reações de PCR multiplex seguindo o descrito por Johnson & Stell, 2000 e utilizando primers específicos. (Tabela 5). Foram testados um total de trinta e um fatores de virulência e os resultados das amplificações foram avaliados por comparação do tamanho do produto amplificado e o marcador molecular utilizado.

## Materiais e Métodos

| Gene                          | Nome do Primer         | Sequência do Primer (5'→3') | Tamanho do Produto Amplificado (pd) | Referência              |
|-------------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| <b>Ilha de Patogenicidade</b> | PAI                    | RPAi F<br>RPAi R            | 930                                 | (Johnson & Stell, 2000) |
| <b>Adesinas</b>               | <i>papAH</i>           | PapA F<br>PapA R            | 720                                 |                         |
|                               | <i>papC</i>            | PapC F<br>PapC R            | 200                                 |                         |
|                               | <i>papEF</i>           | PapEF F<br>PapEF R          | 326                                 |                         |
|                               | <i>papG II, III</i>    | pG F<br>pG R                | 1070                                |                         |
|                               | <i>papG I</i>          | pG1''R                      | 1190                                |                         |
|                               | <i>papG allele I</i>   | AlleleI F<br>AlleleI R      | 461                                 |                         |
|                               | <i>paG allele I'</i>   | AlleleI' F<br>AlleleI' R    | 474                                 |                         |
|                               | <i>papG allele II</i>  | AlleleII F<br>AlleleII R    | 190                                 |                         |
|                               | <i>papG allele III</i> | AlleleIII F<br>AlleleIII R  | 258                                 |                         |
|                               | <i>sfalfocDE</i>       | Sfa 1<br>Sfa 2              | 410                                 |                         |
|                               | <i>SfaS</i>            | SfaS F<br>SfaS R            | 240                                 |                         |
|                               | <i>focG</i>            | FocG F<br>FocG R            | 360                                 |                         |
|                               | <i>afaldraBC</i>       | Afa F<br>Afa R              | 559                                 |                         |
|                               | <i>bmaE</i>            | bmaE F<br>bmaE R            | 507                                 |                         |
|                               | <i>gafD</i>            | gafD F<br>gafD R            | 952                                 |                         |

## Materiais e Métodos

|             |                 |                      |                                                                        |      |                         |
|-------------|-----------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------|------|-------------------------|
| Adesinas    | <i>nfaE</i>     | nfaE F<br>nfaE R     | 5'- GCTTACTGATTCTGGGATGGA-3'<br>5'- CGGTGGCCGAGTCATATGCCA-3'           | 559  | (Johnson & Stell, 2000) |
|             | <i>fimH</i>     | fimH F<br>fimH R     | 5'- TGCAGAACGGATAAGCCGTGG-3'<br>5'- GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA-3'           | 508  |                         |
| Toxinas     | <i>hlyA</i>     | hly f<br>hly r       | 5'-AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT-3'<br>5'-ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA-3'     | 1177 |                         |
|             | <i>cnf-1</i>    | cnf1<br>cnf2         | 5'-AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG-3'<br>5'-CATTCCAGAGTCCTGCCCTCATTATT-3'     | 498  |                         |
|             | <i>cdt B</i>    | cdt-a 1<br>cdt-a 2   | 5'- AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA-3'<br>5'- AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTTA-3'    | 430  |                         |
|             |                 | cdt-s 1<br>cdt-s 2   | 5'- GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG-3'<br>5'- GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG-3' |      |                         |
|             | <i>kpsMTII</i>  | kpsII F<br>kpsII R   | 5'- GCGCATTGCTGATACTGTTG-3'<br>5'- CATCCAGACGATAAGCATGAGCA-3'          | 272  |                         |
|             |                 | kpsIII F<br>kpsIII R | 5'- TCCTCTTGCTACTATTCCTCCCT-3'<br>5'- AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC-3'        | 392  |                         |
| Cápsulas    | <i>kpsMT K1</i> | K1-f*                | 5'- TAGCAAACGTTCTATTGGTGC-3'                                           | 153  |                         |
|             | <i>KpsMT K5</i> | K5-f**               | 5'- CAGTATCAGCAATCGTTCTGTA-3'                                          | 159  |                         |
| Sideróforos | <i>fyuA</i>     | FyuA f<br>FyuA r     | 5'- TGATTAACCCCGCGACGGGAA-3'<br>5'- CGCAGTAGGCACGATGTTGTA-3'           | 880  |                         |
|             | <i>iutA</i>     | AerJ f<br>AerJ r     | 5'- GGCTGGACATCATGGGAACTGG-3'<br>5'-CGTCGGGAACGGGTAGAATCG-3'           | 300  |                         |
| Diversos    | <i>Rfc</i>      | rfc - f<br>rfc - r   | 5'- ATCCATCAGGAGGGGACTGGA-3'<br>5'- AACCATACCAACCAATGCGAG-3'           | 788  |                         |
|             | <i>ibeA</i>     | ibe10 F<br>ibe10 R   | 5'- AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC-3'<br>5'- TGGTGCTCCGGCAAACCATGC-3'           | 170  |                         |
|             | <i>cvaC</i>     | ColV-Cf<br>ColV-Cr   | 5'- CACACACAAACGGGAGCTGTT-3'<br>5'- CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT-3'           | 680  |                         |
|             | <i>traT</i>     | TraT F<br>TraT R     | 5'- GGTGTGGTGCATGAGCACAG-3'<br>5'- CACGGTTCAGCCATCCCTGAG-3'            | 290  |                         |

**Tabela 5** - Sequência nucleotídica dos primers utilizados nas reacções de amplificação para detecção de genes codificadores de fatores de virulência. **Legenda:** Y=T ou C; R=A ou G; S= G ou C; D=A ou G ou T; F - forward, R - reverse; \* - utilizar com o primer KpsII reverse; \*\* - utilizar com o primer KpsIII reverse

---

## **IV - RESULTADOS**

## Resultados

### 1. Identificação dos isolados

A identificação dos isolados foi realizada com recurso às características morfológicas das colónias, utilização de meio de cultura CHROMagar™ Orientation (CHROMagar, Paris, França), e galeria de identificação ID 32 GN para identificação de bacilos de Gram negativo (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, França). De um total de dezasseis isolados doze foram identificados como *Escherichia coli*, dois como *Pseudomonas putida* e os restantes dois como *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas* spp.

### 2. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos provenientes de amostras de carne de aves e suínos de diferentes origens

A caracterização fenotípica obtida através da realização dos testes de suscetibilidade pelo método de difusão em agar, permitiu aferir a resistência de um total de dezasseis isolados em estudo aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não  $\beta$ -lactâmicos como demonstrado na seguinte tabela:

| Classe de antibiótico                          | Número de isolados resistentes |
|------------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Penicilinas</b><br>( $\beta$ -lactâmico)    | 16                             |
| <b>Cefalosporinas</b><br>( $\beta$ -lactâmico) | 13                             |
| <b>Carbapenemos</b><br>( $\beta$ -lactâmico)   | 7                              |
| <b>Monobactâmicos</b><br>( $\beta$ -lactâmico) | 7                              |
| <b>Floroquinolonas</b>                         | 12                             |
| <b>Aminoglicosídeos</b>                        | 5                              |
| <b>Agentes Miscelâneos</b>                     | 11                             |
| <b>Tetraciclinas</b>                           | 13                             |

**Tabela 6** - Número de isolados que apresentaram resistência a uma das classes de antibióticos.

## Resultados

### 2.1 Suscetibilidade aos antibióticos

Os resultados obtidos para a suscetibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não  $\beta$ -lactâmicos dos dezasseis isolados estão apresentados na tabela 7 e 8.

Relativamente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, e às penicilinas, podemos observar que todos os dezasseis isolados testados são resistentes à ampicilina e à piperacilina em ambas as concentrações de 30 e 100  $\mu$ g e que sete isolados ou seja aproximadamente 44% são resistentes à amoxicilina com ácido clavulânico. No que diz respeito às cefalosporinas é de salientar que todos os isolados testados apresentaram resistência ceftarolina (cefalosporina de 5<sup>a</sup> geração), 75% demonstram redução da suscetibilidade à cefotaxima (cefalosporina de 3<sup>a</sup> geração), e 50% ao ceftiofur (cefalosporina de 3<sup>a</sup> geração), sendo este um antibiótico de uso veterinário. É ainda de evidenciar que três isolados identificados como *Pseudomonas putida* e os restantes dois como *Pseudomonas aeruginosa*, são naturalmente resistentes à cefoxitina, apresentam também redução da suscetibilidade ao meropenemo, ao representante dos antibióticos monobactâmicos, o aztreonamo e à conjugação de amoxicilina com ácido clavulânico. Foi detetado ainda que aproximadamente 63% dos isolados testados apresentam redução da suscetibilidade ao imipenemo (Tabela 7 e 8).

Para os antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos testados 75% dos isolados testados são resistentes às fluoroquinolonas, nomeadamente à ciprofloxacina, ácido nalidixico e à enrofloxacin sendo este último um antibiótico de uso veterinário. Em relação a outros agentes, aproximadamente 69% apresentaram resistência ao cloranfenicol. Observou-se ainda que 100% dos isolados testados demonstraram resistência à tetraciclina (Tabela 7 e 8).

### 2.2 Pesquisa de produção de beta lactamases de espectro alargado

A produção de ESBLs foi avaliada pelo método de difusão em agar através da presença de sinergismo entre o disco de oxiiimino- $\beta$ -lactâmico e o disco de amoxicilina com ácido clavulânico de acordo com diretrizes do EUCAST (EUCAST, 2019) e CLSI (CLSI, 2019). Na ausência de sinergismo a deteção de ESBLs foi efetuada pelo teste da aproximação de disco ou Teste de duplo disco anteriormente descrito.

Foi observado o sinergismo e posteriormente confirmado pelo teste acima referido em seis isolados sendo que todos foram identificados como *Escherichia coli* e com origens

## **Resultados**

diferentes, nomeadamente amostras de frango de produção “caseira”, peru e suíno adquiridos em hipermercado (Tabela 7 e 8).



## Resultados

| Amostra | Origem                              | Isolado                               | MS* | Suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos (halo em mm) |       |        |       |        |     |     |     |     |     |     |        |        |     |     |     |     |     |     | Pesquisa de ESBLs |
|---------|-------------------------------------|---------------------------------------|-----|------------------------------------------------------------|-------|--------|-------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------|
|         |                                     |                                       |     | AMP                                                        | PRL30 | PRL100 | TZP36 | TZP110 | AMC | ATM | CTX | EFT | FOX | FEP | CAZ 30 | CAZ 10 | CPT | CXM | MRP | ETP | IMP | DOR |                   |
| 1       | Frango produção "caseira"           | A <sub>1</sub> CTX <sub>1</sub>       | CTX | 6                                                          | 12    | 14     | 22    | 24     | +   | 16  | 20  | 20  | 28  | 30  | 19     | 10     | 10  | 20  | 38  | 28  | 22  | 25  | X                 |
| 2       | Frango produção "caseira"           | A <sub>2</sub> MRP <sub>1</sub>       | MRP | 6                                                          | na    | na     | na    | na     | 6   | 12  | 15  | na  | 6   | 27  | 29     | na     | na  | na  | 15  | na  | na  | na  |                   |
| 2       | Frango produção "caseira"           | A <sub>2</sub> MRP <sub>2</sub>       | MRP | 6                                                          | na    | na     | na    | na     | 9   | 12  | 15  | na  | 6   | 24  | 30     | na     | na  | na  | 18  | na  | na  | na  |                   |
| 2       | Frango produção "caseira"           | A <sub>2</sub> MRP <sub>3</sub>       | MRP | 6                                                          | na    | na     | na    | na     | 6   | 9   | 13  | na  | 6   | 25  | 23     | na     | na  | na  | 16  | na  | na  | na  |                   |
| 3       | Peru Hipermercado                   | A <sub>3</sub> CTX <sub>1</sub> -PÓS  | CTX | 6                                                          | 10    | 13     | 20    | 28     | 19  | 19  | 15  | 14  | 20  | 25  | 25     | 20     | 6   | 0   | 23  | 26  | 20  | 25  | X                 |
| 3       | Peru Hipermercado                   | A <sub>3</sub> CIP <sub>1</sub> -PÓS  | CIP | 6                                                          | 10    | 11     | 13    | 25     | 18  | 22  | 16  | 14  | 27  | 29  | 28     | 23     | 6   | 0   | 20  | 26  | 10  | 27  |                   |
| 4       | Suíno Hipermercado                  | A <sub>6</sub> CTX <sub>2</sub> -PÓS  | CTX | 6                                                          | 10    | 13     | 22    | 25     | 18  | 12  | 22  | 20  | +   | 25  | 20     | 10     | 10  | 19  | +   | 24  | 23  | 26  | X                 |
| 5       | Peru Hipermercado                   | A <sub>7</sub> CIP <sub>1</sub> -PÓS  | CIP | 6                                                          | 10    | 12     | 26    | 30     | 19  | 27  | 15  | 14  | 28  | 20  | +      | 22     | 6   | 6   | 22  | 26  | 9   | 26  | X                 |
| 6       | Suíno Hipermercado                  | A <sub>8</sub> CTX <sub>1</sub> -PÓS  | CTX | 6                                                          | 10    | 11     | 32    | 25     | 22  | 28  | 14  | 8   | 27  | 20  | 27     | 24     | 6   | 6   | 30  | 30  | 20  | 23  | X                 |
| 7       | Frango Hipermercado                 | A <sub>9</sub> CIP <sub>1</sub> -PÓS  | CIP | 6                                                          | 11    | 13     | 20    | 21     | 20  | 28  | 30  | 20  | 28  | 35  | +      | 20     | 15  | 20  | 28  | 30  | 20  | 22  |                   |
| 8       | Peru Hipermercado                   | A <sub>11</sub> AMP <sub>2</sub> -PRÉ | AMP | 6                                                          | 13    | 18     | 26    | 27     | 20  | 40  | 32  | 24  | 26  | 32  | +      | 25     | 14  | 24  | 30  | 28  | 22  | 25  |                   |
| 8       | Peru Hipermercado                   | A <sub>11</sub> CIP <sub>3</sub> -PRÉ | CIP | 6                                                          | 12    | 14     | 23    | 14     | 15  | 14  | 18  | 18  | 22  | 25  | 20     | 22     | 10  | 22  | 30  | 28  | 20  | 24  | X                 |
| 9       | Suíno Hipermercado                  | A <sub>12</sub> CIP <sub>1</sub> -PÓS | CIP | 6                                                          | 11    | 12     | 20    | 30     | 20  | 30  | 25  | 26  | 23  | 34  | 29     | 25     | 16  | 21  | 26  | 28  | 21  | 30  |                   |
| 10      | Peru Comércio Local                 | A <sub>13</sub> CIP <sub>1</sub> -PÓS | CIP | 6                                                          | 12    | 15     | 27    | 30     | 20  | 34  | 32  | +   | 25  | 30  | +      | 20     | 21  | 25  | +   | 30  | 20  | 26  |                   |
| 11      | Frango Comércio Local               | A <sub>14</sub> CIP <sub>1</sub> -PÓS | CIP | 6                                                          | 14    | 12     | 20    | 24     | 18  | 25  | 25  | 24  | 23  | 30  | +      | 20     | 18  | 22  | 24  | 28  | 16  | 23  |                   |
| 12      | Suíno Comércio Local (carne picada) | A <sub>15</sub> CIP <sub>1</sub> -PÓS | CIP | 6                                                          | 10    | 14     | 26    | 27     | 19  | 34  | 32  | 24  | 26  | 38  | +      | 22     | 18  | 24  | 30  | 30  | 21  | 27  |                   |

**Tabela 7** - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos β-lactâmicos de isolados provenientes do estudo. **Legenda:** MS\* - meio de seleção de MacConkey agar com antibiótico β-lactâmico: AMP, CTX, CIP ou MRP. Siglas utilizadas para os antibióticos: ver Tabela 3. Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos β-lactâmicos e não β-lactâmicos segundo directrizes do CLSI e EUCAST (2019): **Isolado resistente;** **Isolado com sensibilidade intermédia;** **Isolado sensível;** **+**: **isolado sensível;** **na** - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos

## Resultados

| Amostra | Origem                              | Isolado     | MS* | Suscetibilidade aos antibióticos não β-lactâmicos (halo em mm) |     |    |    |     |    |     |    |    |      |      |     |     |    |     | Pesquisa de ESBLs |
|---------|-------------------------------------|-------------|-----|----------------------------------------------------------------|-----|----|----|-----|----|-----|----|----|------|------|-----|-----|----|-----|-------------------|
|         |                                     |             |     | CIP                                                            | ENR | NA | AK | TOB | CN | NET | CT | C  | F100 | F300 | FOT | SXT | TE | TGC |                   |
| 1       | Frango produção "caseira"           | A1CTX1      | CTX | 40                                                             | 27  | 24 | 21 | 22  | 23 | 23  | 16 | 12 | 19   | 21   | 32  | 21  | 6  | 20  | X                 |
| 2       | Frango produção "caseira"           | A2MRP1      | MRP | 40                                                             | na  | na | na | na  | na | na  | na | na | na   | na   | na  | na  | na | na  |                   |
| 2       | Frango produção "caseira"           | A2MRP2      | MRP | 30                                                             | na  | na | na | na  | na | na  | na | na | na   | na   | na  | na  | na | na  |                   |
| 2       | Frango produção "caseira"           | A2MRP3      | MRP | 36                                                             | na  | na | na | na  | na | na  | na | na | na   | na   | na  | na  | na | na  |                   |
| 3       | Peru Hipermercado                   | A3CTX1-PÓS  | CTX | 10                                                             | 6   | 6  | 20 | 14  | 23 | 20  | 17 | 6  | 24   | +    | 27  | 6   | 6  | 20  | X                 |
| 3       | Peru Hipermercado                   | A3CIP1-PÓS  | CIP | 6                                                              | 6   | 6  | 25 | 15  | 6  | 23  | 16 | 6  | 22   | 25   | 32  | 6   | 6  | 21  |                   |
| 4       | Suíno Hipermercado                  | A6CTX2-PÓS  | CTX | 6                                                              | 6   | 6  | 24 | 23  | 26 | 25  | 19 | 10 | 21   | 23   | 30  | 21  | 6  | 20  | X                 |
| 5       | Peru Hipermercado                   | A7CIP1-PÓS  | CIP | 15                                                             | 7   | 6  | 23 | 23  | 25 | 25  | 16 | 15 | 26   | 30   | 35  | 21  | 6  | 22  | X                 |
| 6       | Suíno Hipermercado                  | A8CTX1-PÓS  | CTX | 14                                                             | 7   | 6  | 22 | 23  | 25 | 27  | 15 | 17 | 22   | 24   | 33  | 20  | 6  | 22  | X                 |
| 7       | Frango Hipermercado                 | A9CIP1-PÓS  | CIP | 10                                                             | 6   | 6  | 19 | 21  | 20 | 24  | 16 | 6  | 14   | 19   | 29  | 0   | 6  | 19  |                   |
| 8       | Peru Hipermercado                   | A11AMP2-PRÉ | AMP | 6                                                              | 6   | 6  | 23 | 21  | 25 | 26  | 16 | 30 | 21   | 22   | 30  | 31  | 6  | 20  |                   |
| 8       | Peru Hipermercado                   | A11CIP3-PRÉ | CIP | 11                                                             | 7   | 6  | 19 | 20  | 22 | 20  | 17 | 6  | 22   | 25   | 31  | 0   | 6  | 25  | X                 |
| 9       | Suíno Hipermercado                  | A12CIP1-PÓS | CIP | 10                                                             | 6   | 6  | 20 | 21  | 11 | 24  | 16 | 6  | 19   | 20   | 30  | 0   | 6  | 22  |                   |
| 10      | Peru Comércio Local                 | A13CIP1-PÓS | CIP | 10                                                             | 6   | 6  | 22 | 26  | 23 | 25  | 17 | 6  | 20   | 26   | 36  | 0   | 6  | 26  |                   |
| 11      | Frango Comércio Local               | A14CIP1-PÓS | CIP | 10                                                             | 6   | 6  | 20 | 16  | 6  | 20  | 16 | 10 | 14   | 20   | 30  | 0   | 6  | 22  |                   |
| 12      | Suíno Comércio Local (carne picada) | A15CIP1-PÓS | CIP | 15                                                             | 6   | 6  | 23 | 12  | 6  | 13  | 18 | 6  | 22   | 25   | 30  | 23  | 6  | 22  |                   |

**Tabela 8** - Caracterização do fenótipo de resistência aos antibióticos não β-lactâmicos de isolados provenientes do estudo. **Legenda:** MS\* - meio de seleção de MacConkey agar com antibiótico β-lactâmico: AMP, CTX, CIP ou MRP. Siglas utilizadas para os antibióticos: ver Tabela 3. Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos β-lactâmicos e não β-lactâmicos segundo diretrizes do CLSI e EUCAST (2019): **Isolado resistente**; **Isolado com sensibilidade intermédia**; **Isolado sensível**; +: **isolado sensível**; na - antibiótico não avaliado no teste de suscetibilidade aos antibióticos; **Sem valores de referência – Abordagem exploratória**

## Resultados

### 2.3 Multirresistência

No âmbito do presente estudo, um isolado foi considerado multirresistente se apresentou suscetibilidade diminuída a, pelo menos, três classes de antibióticos estruturalmente distintas testadas: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, monobactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, outros agentes e tetraciclina (Magiorakos et al., 2012).

Segundo o estudo realizado por Magiorakos em 2012 e com o objetivo de criar uma terminologia internacional padronizada para descrever perfis de resistência adquiridos por bactérias frequentemente responsáveis por infecções e propensas à multirresistência, é possível destacar três perfis diferentes: MDR (*multidrug-resistant*) em que se considera

para esta categoria isolados que sejam resistentes a pelo menos um agente em três ou mais classes de antibióticos; XDR (*extensively drug-resistant*), em que os isolados pertencentes a esta categoria só são suscetíveis a uma ou duas classes de antibióticos; e PDR (*pandrug-resistant*) onde os isolados têm de apresentar resistência a todos os agentes de todas as classes de antibióticos.

Assim, e analisando as tabelas 7 e 8, todos os dezasseis ou seja 100% dos isolados em estudo foram considerados multirresistentes. Aproximadamente 69% foram classificados como pertencentes à classe MDR e aproximadamente 31% à classe XDR.

É ainda de destacar que se verificou resistência às penicilinas, cefalosporinas, às tetraciclina e outros agentes em todos os isolados em estudo.

### 3. Caracterização genotípica dos isolados bacterianos

A leitura interpretativa dos testes de suscetibilidade permitiu encaminhar o estudo genotípico dos genes codificadores de  $\beta$ -lactamases em isolados de *Escherichia coli*, assim como o grupo filogenético, o grupo clonal O25b-ST131 assim como os fatores de virulência.

Foi também possível a caracterização dos genes codificadores de mecanismos de resistência aos antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos em isolados de *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp.

## Resultados

### **3.1 Caracterização dos genes codificadores de $\beta$ -lactamases em isolados de *Escherichia coli***

A caracterização por PCR dos genes das principais famílias das ESBLs, da classe da classe A segundo a classificação de Ambler, *bla*<sub>TEM</sub> (variantes TEM-1 e TEM-2), *bla*<sub>SHV</sub> (variantes SHV e SHV-1) e *bla*<sub>CTX-M</sub> grupo 1, 2, 8, 9 e 25. E pertencente à classe D o gene *bla*<sub>OXA</sub> (inclui as variantes OXA-1, OXA-4 e OXA-30). Foi efectuada em isolados de *Escherichia coli* com fenótipo de produção de ESBL detetado na avaliação fenotípica.

Foram detetados quatro genes *bla*<sub>TEM</sub>, três *bla*<sub>CTX-M</sub> do grupo 9 e um gene *bla*<sub>OXA</sub>. Dois dos isolados provenientes um de frango de produção primária e outro de peito de peru adquirido em hipermercado amplificaram apenas para *bla*<sub>TEM</sub>. Outros dois isolados provenientes um de peru e outro de suíno, ambos de hipermercado, amplificaram para os genes *bla*<sub>TEM</sub> e para *bla*<sub>CTX-M</sub> do grupo 9. E apenas um isolado de uma amostra de peito de peru de hipermercado amplificou para os genes *bla*<sub>OXA</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> do grupo 9 (Tabela 9).

### **3.2 Deteção do grupo filogenético nos isolados de *Escherichia coli***

A deteção dos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D em isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs foi realizada por PCR segundo descrito por Clermont e colaboradores (Clermont et al., 2000). A análise dos grupos filogenéticos foi efetuada com base nas diferentes combinações dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TSPE4.C2 nos isolados de *Escherichia coli* analisados (Tabela 9 e 10).

O grupo predominante foi o grupo B2, seguindo-se os grupos D e B1, e por fim o menos prevalente o grupo A.

### **3.3 Deteção do grupo clonal O25b-ST131 nos isolados de *Escherichia coli***

A deteção do grupo clonal O25b-ST131 pela técnica de PCR descrita por Clermont e colaboradores (Clermont et al., 2009) foi efetuada em isolados de *Escherichia coli*. Os isolados que amplificaram para o gene específico *pabB*, foram considerados pertencentes ao grupo clonal O25b-ST131 (Clermont et al, 2009).

Neste estudo nenhum dos isolados amplificou para o gene específico *pabB* e por isso foram considerados não pertencentes ao grupo clonal O25b-ST131.

## Resultados

### **3.4 Caracterização dos fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli***

Foram pesquisados genes codificadores de fatores de virulência por PCR seguindo as diretrizes do estudo de Johnson & Stell, 2000 em isolados de *Escherichia coli* no sentido de avaliar o potencial virulento destes isolados.

No grupo das adesinas o gene *FimH* foi amplificado para 50% dos isolados de *Escherichia coli*.

Dos sideróforos estudados foram detetados genes de *iutA* em aproximadamente 67% dos isolados.

O gene *traT*, foi detetado em 75% dos isolados.

### **3.5 Caracterização dos genes codificadores de mecanismos de resistência aos antibióticos não $\beta$ -lactâmicos em isolados de *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp**

Os isolados provenientes do estudo apresentam resistência às diferentes classes de antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos, nomeadamente às fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina e outros agentes.

No sentido de avaliar a possível presença de genes codificadores de resistência aos antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos, nos isolados em estudo em especial os que apresentaram suscetibilidade reduzida às fluoroquinolonas, e tendo em conta o fenótipo de resistência, foram pesquisados por PCR os genes: *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *gyrA* e *parC*. (Tabela 10)

Relativamente aos genes mediados por plasmídeos, apenas os genes *qnrS* e o *aac(6')-Ib-cr* é que amplificaram para 18% e 45% dos isolados, respetivamente. (Tabela 10)

Os genes cromossómicos *gyrA* e *parC* amplificaram para 100% dos isolados. (Tabela 10)

### **3.6 Caracterização dos isolados de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa* com redução da suscetibilidade aos carbapenemos**

Durante o presente estudo foram detetados 3 isolados do género *Pseudomonas* que apresentaram resistência ao antibiótico meropenem. Assim foi realizada uma reação de PCR como abordagem exploratória para os genes *bla<sub>IMP</sub>* (variante IMP-1), *bla<sub>VIM</sub>* (variante

## Resultados

VIM-2) e *bla*<sub>NDM</sub> (variante NDM-1) (classe B das carbapenemases), *bla*<sub>KPC</sub> (variante KPC-2) (classe A) e o gene *bla*<sub>OXA-48</sub> (classe D).

Em apenas um dos isolados identificado como *Pseudomonas putida* foi encontrado o gene *bla*<sub>OXA-48</sub> (Tabela 11)

De modo a sintetizar os resultados obtidos neste estudo sobre a caracterização genotípica seguem as seguintes tabelas.

## Resultados

| Origem                    | Isolado                               | Identificação           | Gene da $\beta$ -lactamase | Fenótipo de resistência aos antibióticos não $\beta$ -lactâmicos | Genes de resistência aos antibióticos não $\beta$ -lactâmicos | Grupo Filogenético | Grupo Clonal O25b-ST131a | Fatores de Virulência                   |
|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------------------------|
| Frango produção "caseira" | A <sub>1</sub> CTX <sub>1</sub>       | <i>Escherichia coli</i> | TEM                        | C, TE                                                            |                                                               | D                  | -                        | <i>iutA</i> , <i>traT</i>               |
| Peru Hipermercado         | A <sub>3</sub> CTX <sub>1</sub> -PÓS  | <i>Escherichia coli</i> | TEM, CTX-M (grupo 9)       | CIP, ENR, NA, TOB, C, SXT, TE                                    |                                                               | B1                 | -                        |                                         |
| Suíno Hipermercado        | A <sub>6</sub> CTX <sub>2</sub> -PÓS  | <i>Escherichia coli</i> | *                          | CIP, ENR, NA, TOB, CN, C, SXT, TE                                | <i>gyrA</i> , <i>parC</i>                                     | A                  | -                        | <i>fimH</i>                             |
| Peru Hipermercado         | A <sub>7</sub> CIP <sub>1</sub> -PÓS  | <i>Escherichia coli</i> | OXA, CTX-M (grupo 9)       | CIP, ENR, NA, C, TE                                              | <i>acc(6')-Ib-cr</i> , <i>gyrA</i> , <i>parC</i>              | B1                 | -                        | <i>fimH</i> , <i>iutA</i> , <i>traT</i> |
| Suíno Hipermercado        | A <sub>8</sub> CTX <sub>1</sub> -PÓS  | <i>Escherichia coli</i> | TEM, CTX-M (grupo 9)       | CIP, ENR, NA, TE                                                 | <i>gyrA</i> , <i>parC</i>                                     | B1                 | -                        | <i>fimH</i> , <i>iutA</i> , <i>traT</i> |
| Peru Hipermercado         | A <sub>11</sub> CIP <sub>3</sub> -PRÉ | <i>Escherichia coli</i> | TEM                        | CIP, ENR, NA, C, SXT, TE                                         | <i>acc(6')-Ib-cr</i> , <i>gyrA</i> , <i>parC</i>              | A                  | -                        | <i>traT</i>                             |

**Tabela 9** - Caracterização molecular e relações clonais de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBLs provenientes deste estudo. **Legenda:** \* - não amplificou para nenhum dos genes testados.

| Origem                              | Isolado                               | Identificação           | Genes de resistência às quinolonas                               | Fenótipo de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos e não $\beta$ -lactâmicos.              | Grupo Filogenético | Grupo Clonal O25b-ST131a | Fatores de Virulência                   |
|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------------------------|
| Peru Hipermercado                   | A <sub>3</sub> CIP <sub>1</sub> -PÓS  | <i>Escherichia coli</i> | <i>acc(6')-Ib-cr</i> , <i>gyrA</i> , <i>parC</i> , <i>qnrS</i> , | AMP, AMC, CTX, ATM, MRP, CIP, EFT, IMP, CPT, PTL30, PRL100, TZP36, CXM, ENR, NA, TOB, CN, C, SXT, TE | B2                 | -                        | <i>fimH</i> , <i>iutA</i> , <i>traT</i> |
| Frango Hipermercado                 | A <sub>9</sub> CIP <sub>1</sub> -PÓS  | <i>Escherichia coli</i> | <i>gyrA</i> , <i>parC</i>                                        | AMP, FEP, CAZ10, EFT, IMP, CPT, DOR, PRL30, PRL100, ENR, NA, C, SXT, TE                              | B2                 | -                        | <i>iutA</i> , <i>traT</i>               |
| Peru Hipermercado                   | A <sub>11</sub> AMP <sub>2</sub> -PRÉ | <i>Pseudomonas</i> spp  | <i>acc(6')-Ib-cr</i> , <i>gyrA</i> , <i>parC</i>                 | AMP, CIP, CPT, PRL30, PRL100, ENR, NA, TE                                                            | na                 | na                       | na                                      |
| Suíno Hipermercado                  | A <sub>12</sub> CIP <sub>1</sub> -PÓS | <i>Escherichia coli</i> | <i>acc(6')-Ib-cr</i> , <i>gyrA</i> , <i>parC</i>                 | AMP, CTX, CIP, IMP, CPT, PRL30, PRL100, ENR, NA, CN, C, SXT, TE                                      | D                  | -                        | <i>fimH</i> , <i>traT</i>               |
| Peru Comércio Local                 | A <sub>13</sub> CIP <sub>1</sub> -PÓS | <i>Escherichia coli</i> | <i>gyrA</i> , <i>parC</i>                                        | AMP, CIP, CAZ10, IMP, CPT, PRL30, PRL100, ENR, NA, C, SXT, TE                                        | B2                 | -                        | <i>iutA</i> , <i>traT</i>               |
| Frango Comércio Local               | A <sub>14</sub> CIP <sub>1</sub> -PÓS | <i>Escherichia coli</i> | <i>gyrA</i> , <i>parC</i> , <i>qnrS</i>                          | AMP, AMC, CTX, ATM, CIP, CAZ10, IMP, CPT, DOR, PRL30, PRL100, CN, C, SXT, TE                         | D                  | -                        | <i>fimH</i> , <i>iutA</i>               |
| Suíno Comércio Local (carne picada) | A <sub>15</sub> CIP <sub>1</sub> -PÓS | <i>Escherichia coli</i> | <i>gyrA</i> , <i>parC</i>                                        | AMP, CIP, IMP, CPT, PRL30, PRL100, ENR, NA, TOB, CN, C, TE                                           | B2                 | -                        | <i>iutA</i> , <i>traT</i>               |

**Tabela 10** - Caracterização molecular de isolados de *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp que apresentaram genes codificadores de mecanismos de resistência aos antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos. Legenda: na – não avaliado

## Resultados

| Origem                    | Isolado                         | Identificação                 | Genes de resistência aos carbapenemos | Fenótipo de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos |
|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Frango produção "caseira" | A <sub>2</sub> MRP <sub>1</sub> | <i>Pseudomonas putida</i>     | bla <sub>OXA-48</sub>                 | AMP, AMC, CTX, FOX, ATM, MRP                                 |
| Frango produção "caseira" | A <sub>2</sub> MRP <sub>2</sub> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | *                                     | AMP, AMC, CTX, FOX, ATM, MRP, FEP                            |
| Frango produção "caseira" | A <sub>2</sub> MRP <sub>3</sub> | <i>Pseudomonas putida</i>     | *                                     | AMP, AMC, CTX, FOX, ATM, MRP, FEP                            |

**Tabela 11** - Abordagem exploratória. Caracterização molecular de isolados de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa* que apresentaram genes codificadores de mecanismos de resistência aos carbapenemos. **Legenda:** \* - não amplificou para nenhum dos genes testados.



---

## **V - DISCUSSÃO**

## Discussão

A resistência aos antibióticos é um fenômeno complexo que envolve diversos mecanismos de resistência e afeta várias espécies e gêneros bacterianos nos mais diversos ambientes, desde hospitais, comunidade em geral e animais, tornando-se assim num crescente problema de saúde pública.

O aumento da população mundial e a mudança das populações para os centros urbanos é um determinante pela cada vez maior procura de proteína animal (Dyck & John, 2001; FAO, 2006). A mudança nos hábitos alimentares das populações exigiram uma maior e mais rápida produção animal (Grace, 2015; Coyne et al., 2019; Graham, Boland, & Silbergeld, 2007). A produção intensiva de animais para alimentação humana requer maior uso de antibióticos para tratamento e prevenção de infecções, assim como também são utilizados em doses sub-terapêuticas para promoção do crescimento (Doi, Iovleva, & Bonomo, 2017).

Existe uma sobreposição substancial entre os medicamentos necessários para uso humano e os atualmente utilizados na produção animal, ou seja, são utilizados na produção animal vários antibióticos medicamente importantes para a saúde humana (FDA, 2018).

No contexto deste trabalho foram adquiridas doze amostras de carne de frango, peru e suíno de diferentes origens: produção “caseira”, hipermercados e comércio local. As doze amostras deram origem a dezasseis isolados, doze identificados como *Escherichia coli*, dois como *Pseudomonas putida*, um como *Pseudomonas aeruginosa*, e um outro isolado como *Pseudomonas* spp. O foco principal deste trabalho foram as *Enterobacteriaceae*, neste caso *Escherichia coli*, assim o estudo feito nos isolados de *Pseudomonas* foi apenas uma abordagem exploratória por terem manifestado resistência ao meropenem, e como tal não foi completado. Os isolados estudados apresentaram resistência a diferentes classes de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos nomeadamente penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e aos não  $\beta$ -lactâmicos fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina e outros agentes entre os quais se destaca o cloranfenicol.

Os isolados A<sub>6</sub>CTX<sub>2-pós</sub>, A<sub>8</sub>CTX<sub>1-pós</sub>, A<sub>12</sub>CIP<sub>1-pós</sub> e A<sub>15</sub>CIP<sub>1-pós</sub> foram isolados a partir de amostras de carne de suíno de origens diferentes. Os três primeiros recolhidos de amostras adquiridas em hipermercado e de origem portuguesa, e o último de comércio local cuja origem não foi fornecida.

A<sub>1</sub>CTX<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>MRP<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>MRP<sub>2</sub>, A<sub>2</sub>MRP<sub>3</sub>, A<sub>9</sub>CIP<sub>1-pós</sub>, e A<sub>14</sub>CIP<sub>1-pós</sub>, foram isolados a partir de amostras de frango de diferentes origens. A<sub>1</sub>CTX<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>MRP<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>MRP<sub>2</sub>, A<sub>2</sub>MRP<sub>3</sub> tiveram origem em amostras de produção “caseira” portuguesa, A<sub>9</sub>CIP<sub>1-pós</sub> proveniente de uma

## Discussão

amostra de adquirida em hipermercado também de origem portuguesa, e o isolado A<sub>14</sub>CIP<sub>1-pós</sub> cuja amostra foi adquirida em comércio local. A origem deste último não foi fornecida.

Das amostras de peru resultaram os seguintes isolados A<sub>3</sub>CTX<sub>1-pós</sub>, A<sub>3</sub>CIP<sub>1-pós</sub>, A<sub>7</sub>CIP<sub>1-pós</sub>, A<sub>11</sub>AMP<sub>2-pré</sub>, A<sub>11</sub>CIP<sub>3-pré</sub>, e A<sub>13</sub>CIP<sub>1-pós</sub>. Todas à exceção da última foram isoladas de amostras de origem portuguesa adquiridas em hipermercado. A última A<sub>13</sub>CIP<sub>1-pós</sub> foi isolada de uma amostra de comércio local cuja origem não foi fornecida.

Todos os isolados em estudo apresentaram resistência às penicilinas, nomeadamente à ampicilina e à piperacilina nas concentrações de 30 e 110 µg, às tetraciclina e ao cloranfenicol, o que está de acordo com outros estudos que também envolveram isolados provenientes de suíno e de aves, sendo as penicilinas, as tetraciclina e o cloranfenicol os antibióticos para os quais um maior número de isolados apresenta resistência (Österberg et al., 2016; Bortolaia, Bisgaard, & Bojesen, 2010; Lugsomya et al., 2018). O facto de as penicilinas e as tetraciclina serem os antibióticos mais vendidos para uso veterinário pode explicar o facto de todos os isolados deste estudo terem manifestado resistência (EMA, 2018). O cloranfenicol é proibido para uso em animais destinados à produção de alimentos na União Europeia. A resistência ao cloranfenicol é, portanto, provavelmente devida à co-selecção pelo uso de outros antibióticos que não o cloranfenicol (Österberg et al., 2016; Amador, Fernandes, Prudêncio, & Duarte, 2019).

Em relação às cefalosporinas, todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico desta classe.

As cefalosporinas de 3ª geração cefotaxima e ceftiofur apresentaram halos de inibição bastante similares. Na generalidade os isolados que se mostraram resistentes à cefotaxima também são resistentes ao ceftiofur. Sendo a cefotaxima um antibiótico clinicamente importante e o ceftiofur o seu correspondente na medicina veterinária. Uma possível explicação pode ser o facto de as bactérias que possuem um mecanismo de resistência a um antibiótico terem maior probabilidade de desenvolver resistência a um antibiótico que pertença à mesma classe. Portanto, mesmo que um antibiótico específico seja usado em animais e não em pessoas, a resistência ao antibiótico de uso animal também pode conferir resistência a um antibiótico de uso humano. (Compassion in World Farming, 2011; Collignon & McEwen, 2019). O estudo de Collignon & McEwen, 2019 diz que em países onde o uso de ceftiofur foi mais restrito, houve uma diminuição de resistência a cefalosporinas de 3ª geração.

A resistência às cefalosporinas de terceira geração é principalmente mediada por beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs). Os genes ESBL são altamente móveis e

## Discussão

transmitidos em plasmídeos, e outros elementos genéticos. Devido ao elevado e excessivo uso de cefalosporinas de 3ª geração, a resistência é agora comum. Os genes de resistência são frequentemente co-localizados com genes que codificam resistência a outras classes de antibióticos, incluindo tetraciclinas, aminoglicosídeos e sulfonamidas (Collignon & McEwen, 2019).

Para a classe das fluoroquinolonas, 75% dos isolados mostraram resistência, nomeadamente à ciprofloxacina, à enrofloxacin e ao ácido nalidixico. A resistência às fluoroquinolonas está associada à presença de mutações nos genes cromossômicos *gyrA* (DNA girase) e *ParC* (topoisomerase IV). Uma única alteração de um aminoácido pode conferir resistência às fluoroquinolonas. A resistência mediada por plasmídeos também foi detetada neste estudo pela presença do gene *qnrS* e pela variante *aac(6')-Ib-cr*, uma aminoglicosilacetiltransferase capaz de acetilar a ciprofloxacina e que também confere resistência aos aminoglicosídeos. Outros mecanismos que podem explicar a resistência às fluoroquinolonas podem ser as bombas de efluxo em especial as do tipo RND, que como descrito na literatura conferem um aumento da resistência às quinolonas; e um outro mecanismo pode ser a alteração das porinas (Gamal A. et al., 2018; Hooper & Jacoby, 2016; Van Hoek et al., 2011).

Neste estudo *E. coli* produtoras de ESBLs mostraram o seguinte perfil de resistência: aztreonam, cefotaxima, ceftiofur, ceftarolina e em alguns isolados cefepime e cefuroxima. Este perfil de resistência está de acordo com a literatura (Lago, Fuentefria, & Fuentefria, 2010; Lugsomya et al., 2018).

As *E. coli* com fenótipo de produção de ESBLs apresentaram na sua maioria as beta-lactamases TEM e CTX-M grupo 9 (isolados A<sub>3</sub>CTX<sub>1-pós</sub> e o A<sub>8</sub>CTX<sub>1-pós</sub>), apenas um isolado apresentou a beta-lactamase OXA e CTX-M grupo 9 (A<sub>7</sub>CIP<sub>1-pós</sub>) correspondendo a outros estudos feitos com amostras semelhantes (Cormier et al., 2019; Gundran et al., 2019). Em termos de grupo filogenéticos prevaleceu o grupo B1, de seguida o A e apenas um isolado pertenceu ao grupo D. O perfil de virulência foi *fimH*, *iutA* e *traT* podendo conferir às bactérias uma maior probabilidade de causar infeções urinárias (Johnson & Stell, 2000; Spurbeck et al., 2012). Relativamente aos genes que conferem resistência às quinolonas o perfil foi semelhante para todos os isolados produtores de ESBL, mutações no genes cromossômicos *gyrA* e *parC*, e a variante *acc(6')-Ib-cr*, o que vai ao encontro da literatura (Gamal A. et al., 2018; Röderova et al., 2017).

O isolado A<sub>6</sub>CTX<sub>2-pós</sub> foi fenotipicamente positivo para ESBL, no entanto não amplificou para nenhum gene testado, o que pode ser explicado pela ocorrência esporádica de outros tipos de ESBL (Dang, Bortolaia, Tran, Le, & Dalsgaard, 2018). Pertence ao grupo

## Discussão

filogenético A e apresentando o fator de virulência *fimH* que codifica fímbria do tipo 1 (*fimH*). Este fator de virulência importante na colonização do epitélio do trato urinário, é encontrado frequentemente em isolados responsáveis por infecções do trato urinário e em isolados comensais. Apresentou mutações nos genes de resistência cromossômicos *gyrA* e *parC*.

Os isolados A<sub>1</sub>CTX<sub>1</sub> são provenientes de amostras de carne de frango de produção “caseira”, assim era de esperar que a prevalência de ESBLs e a carga microbiana fosse menor neste tipo de carne “caseira” pois a utilização de antibióticos é menor quando comparada com a produção intensiva, e a utilização de antibióticos em rações como promotores de crescimento são proibidas na União Europeia desde Janeiro de 2006. No entanto os resultados deste estudo mostraram que as amostras provenientes deste tipo de carne foram as que apresentaram maior carga microbiana resistente aos antibióticos do que amostras provenientes de produções intensivas adquiridas em hipermercados, não necessitando de incubação. O isolado A<sub>1</sub>CTX<sub>1</sub> (*Escherichia coli*) amplificou para o gene *bla*TEM, o que está de acordo com outros estudos (Cohen Stuart et al., 2012; Ye et al., 2018; Gundran et al., 2019), pertence ao grupo filogenético D e apresenta fatores de virulência *iutA*, *traT*. Estes fatores de virulência têm sido descritos associados a *Escherichia coli* uropatogénica como fator de risco para o desenvolvimento de infecção urinária. Isolados de *Escherichia coli* uropatogénica podem persistir durante longo tempo como comensais no trato intestinal, podendo colonizar o trato urinário com possível desenvolvimento de infecção do trato urinário (Spurbeck et al., 2012). Algumas explicações para este tipo de amostras apresentar maior carga microbiana do que o esperado pode ser o facto de os frangos ainda pequenos quando adquiridos pelos produtores primários já estarem colonizados com bactérias resistentes, ou em alternativa a contaminação cruzada durante a criação e o abate (Cohen Stuart et al., 2012). Neste tipo de produção “caseira” pode haver inúmeras origens para o aparecimento de bactérias resistentes. Seguem sugestões de possíveis origens que não foram encontradas na literatura:

- A alimentação em que é comum que restos de alimentos sejam servidos às aves, nomeadamente aparas de carnes cruas que podem servir como fonte de proteína, mas que podem apresentar contaminação com bactérias resistentes aos antibióticos;
- Durante o abate pode ocorrer contaminação, por exemplo se as penas e as patas contiveram resíduos de fezes do próprio animal ou de outros, estas podem entrar em contacto com a carne contaminando-a;
- No desmanche do animal pode ocorrer perfuração das vísceras contaminando a carne;

## Discussão

- Ao contrário do que seria de esperar, nestas amostras de carne de produção “caseira” foram encontradas em maior quantidade bactérias resistentes do que em amostras de hipermercado. Assim uma possível justificação pode ser o facto de nas grandes produções e hipermercados haver um maior controlo de qualidade, desde o crescimento do animal, o abate, o desmanche e até chegar ao consumidor, o que não acontece nas produções tradicionais.

Isolados que não apresentaram fenótipo positivo para produção de ESBL mas que apresentaram suscetibilidade reduzida às fluroquinolonas, mostraram-se na maioria do grupo filogenético B2 e de seguida do grupo D. Com o mesmo perfil de virulência que os isolados produtores de ESBL, *fimH*, *iutA* e *traT* podendo conferir às bactérias uma maior probabilidade de causar infeções urinárias (Johnson & Stell, 2000; Spurbeck et al., 2012). O perfil de genes que conferem resistência às fluroquinolonas mostrou ser o mesmo que os isolados produtores de ESBL: mutações no genes cromossomais *gyrA* e *parC*, e a variante *acc(6')-Ib-cr*, o que vai também ao encontro da literatura (Gamal A. et al., 2018; Röderova et al., 2017).

---

## **VI - CONCLUSÃO**

## Conclusão

Embora o uso excessivo de antibióticos na medicina humana seja a principal causa da atual crise de resistência a antibióticos, uso excessivo e o mau uso de antibióticos na produção animal também é um fator importante para a proliferação da resistência.

Existe uma sobreposição substancial entre os medicamentos necessários para uso humano e os atualmente utilizados na produção animal, ou seja, são utilizados na produção animal vários antibióticos clinicamente importantes para a saúde humana.

As bactérias que possuem um mecanismo de resistência a um antibiótico têm maior probabilidade de desenvolver resistência a um antibiótico que pertença à mesma classe. Este estudo demonstra que bactérias que apresentam resistência aos antibióticos de uso veterinário cefotiofur e enrofloxacin também são resistentes aos antibióticos clinicamente importantes cefotaxima e ciprofloxacina, respectivamente.

Este estudo teve como objetivo principal a pesquisa de bactérias de Gram negativo, com foco nas *Enterobacteriaceae*, resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não  $\beta$ -lactâmicos, em amostras de carne de aves e suíno de diferentes origens e recolhidas em hipermercados, comércio local e produção “caseira”.

Foram identificadas bactérias resistentes às diferentes classes de antibióticos, nomeadamente penicilinas, cefalosporinas de 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> geração, fluoroquinolonas e tetraciclina. A caracterização molecular mostrou isolados de *E. coli* produtores de ESBLs do tipo TEM, OXA e CTX-M, e genes de resistências às fluoroquinolonas *gyrA*, *parC* e *acc(6')*-Ib-cr.

No presente trabalho é de salientar que nos isolados de galinhas de produção “caseira” a prevalência de bactérias resistentes aos antibióticos e produtoras de ESBLs é maior do que nos isolados de hipermercado e de comércio local o que não seria de esperar.

O combate a esta crise global de resistência aos antibióticos deverá ser abordado na perspectiva “*One Health*” termo usado para descrever um princípio que reconhece que a saúde humana e animal estão interligadas, que as doenças são transmitidas dos seres humanos para os animais e vice-versa e, portanto, ambos devem ser abordados. A abordagem “*One Health*” também engloba o meio ambiente, sendo este outro elo entre humanos e animais e também uma potencial fonte de novos microrganismos resistentes.

Para trabalhos futuros poderão ser analisadas as rações dadas aos animais de forma a perceber se têm antibióticos e quais as classes. Neste estudo como os resultados que mostraram maior interesse foram dos isolados de produção “caseira” e como este tipo de



### **Conclusão**

produção em Portugal e seu impacto ainda não foram muito descritos, a análise das rações dadas às aves de pequenos produtores em Portugal seria um bom ponto de partida.

---

## **VII - BIBLIOGRAFIA**

## Bibliografia

- Agnese Lupo, A. Bonomo, Andrea Endimiani, & Krisztina, M. P. R. (2015). *Chapter 12 - Non-Phenotypic Tests to Detect and Characterize Antibiotic Resistance Mechanisms in Enterobacteriaceae*.
- Allen, H. K. (2014). Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals. *Current Opinion in Microbiology*, 19(1), 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.001>
- Amador, P., Fernandes, R., Prudêncio, C., & Duarte, I. (2019). Prevalence of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant enterobacteriaceae on portuguese livestock manure. *Antibiotics*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics8010023>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Bortolaia, V., Bisgaard, M., & Bojesen, A. M. (2010). Distribution and possible transmission of ampicillin- and nalidixic acid-resistant Escherichia coli within the broiler industry. *Veterinary Microbiology*, 142(3–4), 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.10.024>
- Bush, K. (2012). Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 31(1), 43–56. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2096>
- Bush, Karen, & Bradford, P. A. (2016). *b -Lactams and b -Lactamase Inhibitors: An Overview*. (Table 1).
- Bush, Karen, & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Cattoir, V., Weill, F. X., Poirel, L., Fabre, L., Soussy, C. J., & Nordmann, P. (2007). Prevalence of qnr genes in Salmonella in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(4), 751–754. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl547>
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Xia, S., & Aarestrup, F. M. (2009). qnrD, a novel gene

## Bibliografia

- conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 603–608. <https://doi.org/10.1128/AAC.00997-08>
- Cavaco LM, Frimodt-Møller N, Hasman H, Guardabassi L, Nielsen L, A. F. (2007). Prevalence of Quinolone Resistance Mechanisms and Associations to Minimum Inhibitory Concentrations in Quinolone-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Humans and Swine in Denmark. *J Clin Microbiol*.
- CDC. (2015). *How Antibiotic Resistance Happens Examples of How Antibiotic Resistance Spreads*. 239559.
- Clermont, O., Bonacorsi, P., & Bingen, E. (2000). *Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group*. 66(10), 4555–4558.
- Clermont, O., Dhanji, H., Upton, M., Gibreel, T., Fox, A., Boyd, D., ... Denamur, E. (2009). Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(2), 274–277. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp194>
- CLSI. (2019). CLSI M100-ED29:2019 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th Edition. Retrieved from <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI> M100 ED29:2019&scope=user
- Cohen Stuart, J., van den Munckhof, T., Voets, G., Scharringa, J., Fluit, A., & Hall, M. L. Van. (2012). Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 212–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.034>
- Collignon, P., & McEwen, S. (2019). One Health—Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(1), 22. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010022>
- Compassion in World Farming. (2011). *Antibiotics in Animal Farming*. (November).
- Coque, T. M., Novais, Â., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., ... Nordmann, P. (2008). Dissemination of Clonally Related *Escherichia coli* Strains Expressing. *Emerging Infectious Diseases*, 14(2), 195–200.

## Bibliografia

- Cormier, A., Zhang, P. L. C., Chalmers, G., Weese, J. S., Deckert, A., Mulvey, M., ... Boerlin, P. (2019). Diversity of CTX-M-positive *Escherichia coli* recovered from animals in Canada. *Veterinary Microbiology*, 231(February), 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.031>
- Coyne, L., Arief, R., Benigno, C., Giang, V. N., Huong, L. Q., Jeamsripong, S., ... Rushton, J. (2019). Characterizing antimicrobial use in the livestock sector in three south east asian countries (Indonesia, thailand, and vietnam). *Antibiotics*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics8010033>
- da Silva, K. C., Moreno, A. M., & Knöbl, T. (2013). Antimicrobial resistance in veterinary medicine: Mechanisms and bacterial agents with the greatest impact on human health. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 50(3), 171–183. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v50i3p171-183>
- Dallenne, C., da Costa, A., Decré, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 490–495. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp498>
- Dang, S. T. T., Bortolaia, V., Tran, N. T., Le, H. Q., & Dalsgaard, A. (2018). Cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from farm workers and pigs in northern Vietnam. *Tropical Medicine and International Health*, 23(4), 415–424. <https://doi.org/10.1111/tmi.13054>
- Doi, Y., Iovleva, A., & Bonomo, R. A. (2017). The ecology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the developed world. *Journal of Travel Medicine*, 24(1), S44–S51. <https://doi.org/10.1093/jtm/taw102>
- Doumith, M., Ellington, M. J., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2009). Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(4), 659–667. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp029>
- Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 160–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09>

## Bibliografia

- Dyck, A., & John, R. (2001). *Effects of Urbanization on Global Food Demand*.
- Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 8, 49–61. <https://doi.org/10.2147/IDR.S55778>
- El Salabi, A., Walsh, T. R., & Chouchani, C. (2013). Extended spectrum  $\beta$ -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(2), 113–122. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691870>
- EMA. (2018). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2016- Trends from 2010 to 2016- Eight ESVAC report*. 176. <https://doi.org/10.1016/j.phpro.2011.05.019>
- EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2019). *Clinical breakpoints*. 0–99. Retrieved from <http://www.eucast.org>.
- FAO. (2006). Livestock's long shadow - environmental issues and options. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 3(1), 1–377. <https://doi.org/10.1007/s10666-008-9149-3>
- FDA. (2017). FDA Announces Implementation of GFI #213, Outlines Continuing Efforts to Address Antimicrobial Resistance. Retrieved from <https://www.fda.gov/animal-veterinary/cvm-updates/fda-announces-implementation-gfi-213-outlines-continuing-efforts-address-antimicrobial-resistance>
- FDA. (2018). *Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals*. 200.
- Fernandes, R., Amador, P., & Prudêncio, C. (2013). *b-Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance*.
- Fernández, M., Conde, S., De La Torre, J., Molina-Santiago, C., Ramos, J. L., & Duque, E. (2012). Mechanisms of resistance to chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), 1001–1009. <https://doi.org/10.1128/AAC.05398-11>
- Founou, L. L., Founou, R. C., & Essack, S. Y. (2016). Antibiotic resistance in the

## Bibliografia

- food chain: A developing country-perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>
- Gamal A. Salem<sup>1, 3</sup>, Suzan K. Murad<sup>2</sup>, Fathi B. Alamyel<sup>3</sup>, Manal A. Ebowah<sup>4</sup>, Marwa A. Mahmoud<sup>4</sup>, A. R. A. (2018). *Studying the Prevalence of Quinolones and Aminoglycosides Resistance Profiles and Transmission of Aac (6')-Ib Gene From Chicken To Contact Human*. 3(2), 10–17.
- Giedraitiene, A., Vitkauskienė, A., Naginiene, R., & Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina*, 47(3), 137–146.
- Grace, D. (2015). Review of Evidence on Antimicrobial Resistance and Animal Agriculture in Developing Countries. *Ilri*, (June), 1–44. [https://doi.org/10.12774/eod\\_cr.june2015.graced](https://doi.org/10.12774/eod_cr.june2015.graced)
- Guérin, F., Lallement, C., Isnard, C., Dhalluin, A., Cattoir, V., & Giard, J. (2016). *Pumps in Enterobacter cloacae Complex*. 60(4), 2373–2382. <https://doi.org/10.1128/AAC.02840-15.Address>
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathogens*, 7(7), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>
- Gundran, R. S., Cardenio, P. A., Villanueva, M. A., Sison, F. B., Benigno, C. C., Kreausukon, K., ... Punyapornwithaya, V. (2019). Prevalence and distribution of blaCTX-M, blaSHV, blaTEM genes in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1975-9>
- Harada, S., Ishii, Y., & Yamaguchi, K. (2008). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: Implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, 28(6), 401–412. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2008.28.6.401>
- Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2016). *Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance*. 25(3), 289–313. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.04.008>

## Bibliografia

- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, P. A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis*, 867–878.
- Johnson, J. R., & Stell, A. L. (2000). Extended Virulence Genotypes of Escherichia coli Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 261–272. <https://doi.org/10.1086/315217>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423–435. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>
- Lago, A., Fuentefria, S. R., & Fuentefria, D. B. (2010). Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(4), 430–434.
- Lambert, T. (2012). Antibiotics that affect the ribosome. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 31(1), 57–64. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2095>
- Lugsomya, K., Yindee, J., Niyomtham, W., Tribuddharat, C., Tummaruk, P., Hampson, D. J., & Prapasarakul, N. (2018). Antimicrobial resistance in commensal Escherichia coli isolated from pigs and pork derived from farms either routinely using or not using in-feed antimicrobials. *Microbial Drug Resistance*, 24(7), 1054–1066. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0154>
- Lumen Learning. (2019). No Title Mechanisms of Antibacterial Drugs. Retrieved from <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/mechanisms-of-antibacterial-drugs/>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*,



## Bibliografia

- 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 718–733. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>
- Morel, C. (2019). *Transmission of antimicrobial resistance from livestock agriculture to humans and from humans to animals*. (133). <https://doi.org/10.1787/fcf77850-en>
- Naas, T., Saoussen Oueslati, R. A. B., & Maria Laura Dabos, Agustin Zavala, Laurent Dortet, P. R. & B. I. I. (2019). Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. Retrieved from <http://www.bldb.eu>
- O'Neill, J. (2015). Antimicrobials in Agriculture and the Environment: Reducing Unnecessary Use and Waste. *The Review on Antimicrobial Resistance*, 0(December), 0. <https://doi.org/Medium>
- OECD. (2014). Antimicrobial Resistance: the Use of Antimicrobials in the Livestock Sector. *Production*, (2013), 1–42.
- Organização das Nações Unidas. (2019). World Population Prospects 2019. Retrieved from <https://population.un.org/wpp/Graphs/Probabilistic/POP/TOT/900>
- Österberg, J., Wingstrand, A., Jensen, A. N., Kerouanton, A., Cibin, V., Barco, L., ... Bengtsson, B. (2016). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs in organic and conventional farming in four european countries. *PLoS ONE*, 11(6), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157049>
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
- Röderova, M., Halova, D., Papousek, I., Dolejska, M., Masarikova, M., Hanulik, V., ... Literak, I. (2017). Characteristics of quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment in the Czech Republic. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN), 1–12.

## Bibliografia

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02147>

- Rolain, J. M., & Cornaglia, G. (2014). Carbapenemases in Enterobacteriaceae: The magnitude of a worldwide concern. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(9), 819–820. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12737>
- Rousham, E. K., Unicomb, L., & Islam, M. A. (2018). Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: Integrating behavioural, epidemiological and one health approaches. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1876). <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0332>
- Rushton, J., Ferreira, J. P., & Katharina D. C. Stärk. (2014). The use of antimicrobials in the livestock sector. *The Journal of International Medical Research*. <https://doi.org/10.1787/5jxvl3dwk3f0-en>
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D., & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(1), 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>
- Sorlozano, A., Gutierrez, J., Jimenez, A., Luna, J. D. D., & Martínez, J. L. (2007). Contribution of a new mutation in parE to quinolone resistance in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), 2740–2742. <https://doi.org/10.1128/JCM.01093-07>
- Spurbeck, R. R., Dinh, P. C., Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., ... Mobley, H. L. T. (2012). *Escherichia coli* isolates that carry vat, fyua, chua, and yfcv efficiently colonize the urinary tract. *Infection and Immunity*, 80(12), 4115–4122. <https://doi.org/10.1128/IAI.00752-12>
- Tängdén, T., Adler, M., Cars, O., Sandegren, L., & Löwdin, E. (2013). Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an in vitro pharmacokinetic model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(6), 1319–1326. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt044>
- The World Bank. (2019). Population, total. Retrieved from

## Bibliografia

<https://data.worldbank.org/indicator/SP.POP.TOTL?end=2018&start=1960&view=chart>

- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019).  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Toussaint, K. A., & Gallagher, J. C. (2015).  $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combinations: From Then to Now. *Annals of Pharmacotherapy*, 49(1), 86–98. <https://doi.org/10.1177/1060028014556652>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., ... Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., & Aarts, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Frontiers in Microbiology*, 2(SEP), 1–27. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>
- Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., ... Wang, M. (2009). New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 1892–1897. <https://doi.org/10.1128/AAC.01400-08>
- Woodford, N., Fagan, E. J., & Ellington, M. J. (2006). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases [4]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(1), 154–155. <https://doi.org/10.1093/jac/dki412>
- Ye, Q., Wu, Q., Zhang, S., Zhang, J., Yang, G., Wang, J., ... Chen, M. (2018). Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae from retail food in China. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01709>
- Zeng, X., & Lin, J. (2013). Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4(MAY), 1–9.

## **Bibliografia**

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00128>