

ALEXANDRA RAQUEL MORAIS DA COSTA CARVALHAIS

**CARATERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM ISOLADOS DE
ENTEROBACTERIACEAE PROVENIENTES DE SUINICULTURAS DE PRODUÇÃO
INTENSIVA E EXTENSIVA DE PORTUGAL**

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, 2015

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae*
provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

ALEXANDRA RAQUEL MORAIS DA COSTA CARVALHAIS

**CARATERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM ISOLADOS DE
ENTEROBACTERIACEAE PROVENIENTES DE SUINICULTURAS DE PRODUÇÃO
INTENSIVA E EXTENSIVA DE PORTUGAL**

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, 2015

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

ALEXANDRA RAQUEL MORAIS DA COSTA CARVALHAIS

**CARATERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM ISOLADOS DE
ENTEROBACTERIACEAE PROVENIENTES DE SUINICULTURAS DE PRODUÇÃO
INTENSIVA E EXTENSIVA DE PORTUGAL**

Dissertação apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação da Professora Doutora Elisabete Machado.

Atesto a originalidade do trabalho,

PORTO, 2015

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

ALEXANDRA RAQUEL MORAIS DA COSTA CARVALHAIS

**CARATERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM ISOLADOS DE
ENTEROBACTERIACEAE PROVENIENTES DE SUINICULTURAS DE PRODUÇÃO
INTENSIVA E EXTENSIVA DE PORTUGAL**

O presente trabalho de investigação resultou da parceria da Universidade Fernando Pessoa com o UCIBIO/REQUIMTE-Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

PORTO, 2015

RESUMO

A família *Enterobacteriaceae* constitui a causa de inúmeras infeções em animais e no Homem, cujo tratamento com antibióticos de uma forma exacerbada tem conduzido à emergência e disseminação de genes de resistência, o que tem sido reconhecido como um grave problema de saúde pública. Consequentemente, torna-se imprescindível uma vigilância epidemiológica deste problema, sendo muito útil incluir nos programas de monitorização bactérias indicadoras, como *Escherichia coli*, provenientes de vários nichos. A emergência de bactérias multirresistentes no Homem devido ao elevado consumo de antibióticos em animais de produção tem sido sugerida em vários estudos. A microflora bacteriana intestinal dos animais constitui um ambiente favorável para a sobrevivência e transferência de bactérias resistentes a antibióticos. Tendo em conta a escassa informação em Portugal sobre a resistência a antibióticos neste nicho, pretende-se com este trabalho de investigação analisar a ocorrência e distribuição de genes de resistência a antibióticos e a presença de clones epidémicos e virulentos entre os isolados de *E. coli* provenientes de amostras de suiniculturas de produção intensiva e de produção extensiva.

Foram incluídos para análise 210 isolados de *E. coli* previamente identificados e analisados quanto à suscetibilidade a antibióticos e aos grupos filogenéticos em trabalhos de investigação anteriores. Estes isolados foram obtidos de amostras de cinco suiniculturas de produção intensiva e uma suinicultura de produção extensiva de Portugal Continental (2006-2007). A identificação de genes que codificam resistência para as sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*), tetraciclina (*tetA*, *tetB* e *tetG*), aminoglicosídeos (*armA* e *rmtB*), quinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, *oqxA* e *oqxB*) ou a ambos estes últimos [*aac(6')-Ib-cr*], foi efetuada por PCR e sequenciação.

Dos 191 isolados correspondentes às cinco suiniculturas de produção intensiva analisadas, 37,7% (72/191) apresentaram o gene *tetA* e 28,3% (54/191) o gene *tetB*. O gene *tetG* não foi detetado em nenhum isolado. Quanto à ocorrência de genes *sul*, foi de 16,8% (32/191) para *sul1*, de 34,0% (65/191) para *sul2* e de 42,4% (81/191) para *sul3*. No que diz respeito à resistência a quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR), o gene

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

qnrS1 foi detetado em 5,8% (11/191) dos isolados, sendo que a ocorrência foi menor para os restantes genes detectados codificando para as proteínas Qnr (*qnrB*: 3,1%; *qnrC*: 0,5% e *qnrD*: 0,5%) e para *oqxA* e *oqxB* (0,5%, 1/191 para ambos), sendo nula para os genes *qnrA*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA*. Em relação aos 19 isolados provenientes da suinicultura de produção extensiva, apenas se detetaram genes que codificam para PMQR em 6 isolados, correspondendo ao gene *qnrD* (31,6%). No que se refere a genes de resistência à tetraciclina, detetaram-se os genes *tetA* (5,3%, 1/19) e *tetB* (21,1%, 4/19). Os restantes genes de resistência pesquisados não foram detetados. A presença de clones epidémicos e virulentos, internacionalmente disseminados, foi também pesquisada entre os isolados previamente identificados como pertencentes ao grupo filogenético B₂ (2,9%, 6/21) ou D (9,4%, 20/210). O clone B₂-ST131 foi detetado em dois isolados provenientes de uma suinicultura de produção intensiva, correspondendo a isolados contendo os genes *tetA* e *qnrS1*. O clone D-ST393 foi identificado em três isolados, os quais demonstraram possuir os genes *sul3*, *tetA* e *tetB*. Os restantes clones pesquisados (ST69, ST95 e ST405) não foram detetados.

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que as suiniculturas portuguesas constituem um reservatório e um veículo de disseminação de *E. coli* albergando múltiplos genes de resistência a antibióticos, nomeadamente à tetraciclina (*tet*), sulfonamidas (*sul*) e, menos frequentemente, às quinolonas (*qnr* e *oqx*). Estas bactérias, através do meio ambiente, da cadeia alimentar (por exemplo, nos géneros alimentícios) e/ou do contato direto entre o Homem e animais ou ambiente de produção animal, podem ser transmitidas ao Homem e colonizar o seu intestino, contribuindo desta forma para a disseminação da resistência aos antibióticos entre bactérias comensais e patogénicas (DEPI, 2015). Neste estudo, a taxa de resistência a antibióticos observada foi mais prevalente na maternidade e na sala de engorda em ambiente de produção suinícola. Para além da necessidade em detetar precocemente a emergência e disseminação de genes de resistência em diferentes nichos e espécies bacterianas, o estabelecimento de políticas de uso prudente de antibióticos em animais de produção e humanos será útil para a definição de estratégias que ajudem a prevenir os riscos para a saúde pública.

ABSTRACT

The *Enterobacteriaceae* family is the cause of numerous infections in animals and humans. Thus, the treatment performed using antibiotics in an enhanced form, has led to the emergence and spread of resistance genes, which has been recognized by the scientific community, as a serious problem of public health. Consequently, epidemiological surveillance of this problem it is essential and very useful to include the monitoring programs indicator bacteria, such as *Escherichia coli*, from various niches. The emergence of multi-resistant bacteria in humans due to the high consumption of antibiotics in farm animals has been suggested in several studies. The intestinal microflora in animals is a favorable environment for survival the antibiotic-resistant bacteria. Given the limited information in Portugal about antibiotic resistance in this niche, it is intended with this research work, to analyze the occurrence and distribution of antibiotic resistant genes and the presence of epidemic and virulent clones among the strains *E. coli* samples from pig farms of intensive and extensive production.

They were included in the analysis 210 *E. coli* strains, previously identified and analyzed in earlier research the susceptibility to antibiotics and phylogenetic groups. Between April 2006 and May 2007, these isolates were obtained from 54 samples of five pig farms of intensive production and 9 samples of extensive production in Portugal. The identification of genes which encode resistance to sulphonamides (*sul1*, *sul2*, *sul3*), tetracyclines (*tetA*, *tetB* e *tetG*), aminoglycosides (*armA* e *rmtB*), quinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, *oqxA* and *oqxB*) or both (*aac(6')-Ib-cr*), was performed by PCR and sequencing.

Of the 191 isolates corresponding to the five intensive production of pig farms analyzed, 37,7% (72/191) had the *tetA* gene and 28,3% (54/191) the *tetB* gene. The *tetG* gene was not detected. For the occurrence of *sul* genes, it was 16,8% (32/191) for *sul1*, 34,0% (65/191) for *sul2* and 42,4% (81/191) for *sul3*. The resistance to quinolones mediated plasmids (PMQR), the *qnrS1* gene was detected in 5,8% (11/191) isolates, and the occurrence was lower for the remaining genes encoding the Qnr proteins (*qnrB*: 3,1%; *qnrC*: 0,5% and *qnrD*: 0,5%) and for *oqxAB* genes (0,5%, 1/191 for both). The genes *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* were not detected. Regarding the 19 isolates from the

extensive production, only 6 isolates encoding PMQR were detected (*qnrD*: 31,6%). The resistance genes detected to tetracycline were *tetA* (5,3%, 1/19) and *tetB* (21,1%, 4/19). The remaining resistance genes studied were not detected. The presence of epidemic and international clones was also studied among the isolates previously identified as belonging to the phylogenetic group B₂ (n=2) or D (n=11). The B₂-ST131 clone was detected in two isolates from intensive production, corresponding to isolates containing the *tetA* and *qnrS1* genes. The D-ST393 clone was identified in three *E. coli* strains, which proved to have *sul3*, *tetB* and *tetA* genes. The remaining clones screened (ST69, ST95 and ST405) were not detected.

The data obtained in this study allow us to conclude that the Portuguese pig farms constitute a reservoir and spread of *E. coli* vehicle harboring multiple antibiotic resistance genes, including the tetracycline (*tet*), sulfonamides (*sul*) and, less often, to quinolones (*qnr* and *oqx*). These bacteria through the environment, the food chain (for example, in foodstuffs) and/or direct contact between humans and animals or animal production environment, can be transmitted to humans and colonize the intestine, thus contributing to the spread of antibiotic resistance between commensal and pathogenic bacteria (DEPI, 2015). In this study, antibiotic resistance observed rate was more prevalent in the maternity and fattening room in pig production environment. Apart from the need for early detect the emergence and spread of resistance genes in different niches and bacterial species, the establishment policies of prudent use of antibiotics in production animals and humans will be helpful in developing strategies to help prevent risks to public health.

AGRADECIMENTOS

Considero a gratidão uma das virtudes mais preponderantes do ser humano. Como tal, não poderia terminar este percurso maravilhoso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas sem demonstrar um enorme apreço aos meus pais, Alice Maria Bordalo Maia Morais Carvalhais e Luís Eduardo Costa Carvalhais, pela oportunidade e apoio incondicional que me deram ao longo do meu percurso académico.

À Professora Doutora Elisabete Machado pela infindável amizade, sabedoria e espontaneidade. Foi dos maiores privilégios da minha vida conhecer uma pessoa tão honesta que me proporcionou otimismo e autoconfiança em cada etapa realizada neste trabalho de investigação. Esta atitude perseverante e positiva alimentou a minha motivação para arriscar e, por vezes, recomeçar confiadamente cada desafio proposto. A capacidade de gestão de tempo foi crucial e, no final, não poderia estar mais feliz pois este projeto, para além de ter expandido e potenciado as minhas competências pessoais e profissionais, traduziu-se em algo marcante para o futuro da minha atividade profissional.

Ao Professor Doutor João Carlos Sousa pelos seus conhecimentos científicos e a pelos ensinamentos transmitidos de forma motivadora, didática e explícita.

Aos meus avós, Maria Leontina Carvalhais e Acácio Carvalhais, pela ajuda em todos os momentos e pelos conselhos e conhecimentos transmitidos em todo o meu percurso académico.

Aos meus irmãos, Eva Raquel, Mariana, Luís Miguel e Rui Pedro, por toda a alegria, união e disponibilidade dada em todos os momentos da minha vida.

Às minhas famílias Azevedo, Bravo e Andersson, por todo carinho, apoio absoluto e por sempre acreditarem e me mimosearem ao longo destes anos.

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Um agradecimento especial, a todos os meus amigos pelo positivismo e por todas as vivências que enchem as nossas vidas de felicidade.

À Cláudia Ribeiro, pela amizade e, durante este último ano, pela ajuda e preocupação em todos os momentos deste trabalho.

Ao meu namorado, Fredrik, por toda a paciência, companheirismo e motivação que me transmitiu em todos os momentos que passei durante a minha graduação universitária em Ciências Farmacêuticas.

DEDICATÓRIA

À minha avó Mimi,

Uma mulher de extrema força, coragem e amor.

Agradeço muito daquilo que sou a ti, vivo inundada de nostalgia de tantas e tantas coisas que aprendi, descobri, conheci e vivi contigo. Recordo-me das nossas tardes com muito carinho e vivo com saudade todos os momentos que guardo no meu coração. Só desejava que fossem eternos!

Guardo as últimas palavras, e hoje percebo porquê!



“(...) with that privilege comes responsibility: to use the right drug, at the right dose, at the right time and for the right duration - in order to make sure that they stay effective for the future.”

Nigel Gibbens, 2012

ÍNDICE DE CONTEÚDO

ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE TABELAS	XVI
ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XVIII
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. <i>Enterobacteriaceae</i> : principais caraterísticas epidemiológicas	5
2. <i>Escherichia coli</i>	5
2.1. Importância clínica.....	6
2.2. Epidemiologia da resistência a antibióticos	6
2.3. Papel do ambiente de produção animal na seleção e disseminação de <i>E. coli</i> resistente a antibióticos e implicações para a saúde pública.....	9
2.4. Mecanismos de resistência a antibióticos em <i>E. coli</i> de ambientes de produção animal.....	11
i. Sulfonamidas.....	12
ii. Tetraciclinas.....	13
iii. Quinolonas	13
a. Resistência às quinolonas por proteção das enzimas alvo por proteínas Qnr	14
b. Resistência às quinolonas por inativação enzimática por <i>aac(6')-Ib-cr</i>	14
c. Resistência às quinolonas por bombas de efluxo	15
iv. Aminoglicosídeos	15

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

a.	Resistência aos aminoglicosídeos por alteração da permeabilidade dos invólucros bacterianos	16
b.	Resistência aos aminoglicosídeos por proteção ribossomal	16
c.	Resistência aos aminoglicosídeos por inativação enzimática	16
3.	Contributo dos estudos epidemiológicos sobre a resistência a antibióticos em ambiente de produção animal para a melhoria da saúde pública	17
II.	OBJETIVOS	19
III.	MATERIAL E MÉTODOS	20
1.	Contexto epidemiológico dos isolados bacterianos	20
i.	Suscetibilidade a agentes antimicrobianos	22
ii.	Distribuição por grupos filogenéticos	23
2.	Identificação e caraterização de genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclinas	24
i.	Extração do DNA bacteriano	24
ii.	Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)	25
iii.	Eletroforese em gel de agarose	26
iv.	Purificação e sequenciação de produtos de PCR	26
3.	Deteção de clones epidémicos e virulentos de <i>E. coli</i>	32
IV.	RESULTADOS	34
1.	Caraterização de genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclinas	34
2.	Deteção de clones de <i>E. coli</i> epidémicos	37
V.	DISCUSSÃO	38
VI.	CONCLUSÃO	48
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração adaptada do European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) com a distribuição geográfica do consumo de antimicrobianos na comunidade europeia em 2013.

Figura 2 - Relação entre o consumo de antibióticos em humanos e animais e as resistências aos mesmos em bactérias de cada nicho, assim como a potencial transferência de genes de resistência dos animais para os humanos e vice-versa.

Figura 3 - Prevalência de resistência aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas em isolados de *E. coli* de origem clínica em Portugal, de 2006 a 2013.

Figura 4 - Fluxograma adaptado de Ewers *et al.* que ilustra as possíveis vias de transmissão da resistência aos antibióticos entre os diferentes nichos ecológicos (Fluxograma adaptado de Ewers *et al.*, 2012).

Figura 5 - Inativação dos aminoglicosídeos-aminociclitolis por acetilases (AAC), adenilases (AAD) e fosfotransferases (APH).

Figura 6 - Representação ilustrativa da extração do DNA genómico pelo método de fervura, sob condições estéreis.

Figura 7 - Ilustração da ocorrência e distribuição de genes de resistência aos antibióticos entre os isolados de *E. coli*, sendo que a disposição das divisões é representada de forma aleatória.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Percentagens de vendas dos antimicrobianos em estudo para animais de produção (incluindo cavalos) em Portugal de 2010 a 2012.

Tabela 2 - Substâncias ativas autorizadas como pré-misturas para alimento medicamentoso para suínos em Portugal.

Tabela 3 - Genes que conferem resistência às tetraciclinas.

Tabela 4 - Genes que conferem resistência às quinolonas.

Tabela 5 - Origem das amostras recolhidas nas suiniculturas analisadas (estes dados foram adaptados do projeto de investigação “Indicadores de poluição de suiniculturas: antibióticos e bactérias resistentes” (FCT-POCTI/AMB/61814/2004)).

Tabela 6 - Comportamento de suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de *E. coli* incluídos no estudo e respetiva distribuição por tipo de suinicultura.

Tabela 7 - *Primers* e condições de PCR utilizados para a pesquisa de genes que conferem resistência a antibióticos.

Tabela 8 - Concentrações dos reagentes usados nas reações de PCR para a deteção de genes *sul*.

Tabela 9 - Concentrações dos reagentes usados nas reações de amplificação por PCR para deteção de genes *tet*, *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *oqxA/B*.

Tabela 10 - *Primers* e condições reacionais utilizadas nas reações de PCR para a determinação de grupos filogenéticos de *E. coli*.

Tabela 11 - Concentrações dos reagentes usados nas reações de amplificação por PCR *multiplex* para a deteção dos grupos filogenéticos de *E. coli*.

Tabela 12 - Ocorrência dos diferentes genes de resistência a antibióticos pesquisados e respetiva distribuição por tipo de suinicultura e de amostra.

Tabela 13 - Resultados obtidos na pesquisa de clones epidémicos e genes de resistência a antibióticos entre os isolados de *E. coli* pertencentes aos grupos filogenéticos B₂ ou D.

Tabela 14 - Relação entre a comunicação dos produtores de suínos relativamente ao uso de antibióticos e a deteção de genes de resistência nas suiniculturas analisadas.

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DGS	Direção-Geral da Saúde
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphates (Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados)
DHPS	dihidropteroato sintetase
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigénica
ESAC	European Surveillance of Antimicrobial Consumption
ESBLs	Extended Spectrum β -Lactamases (β -Lactamases de Largo Espectro)
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxígenas
FOX	Cefoxitina
GM	Gentamicina
INAG	Instituto Nacional da Água
KM	Canamicina
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MDR	Multi-Drug Resistance (Multirresistência Antimicrobiana)
MFS	Major Facilitator Superfamily (Superfamília dos Facilitadores Maioritários)
MLST	Multi-Locus Sequence Typing (Tipagem de Sequência Multilocus)
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

	Resistentes à Meticilina)
NAL	Ácido nalidíxico
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMS	Organização Mundial de Saúde
PABA	Para-amonibenzoic acid (Ácido para-aminobenzóico)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PMQR	Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (Resistência a Quinolonas Mediada por Plasmídeos)
PPCIRA	Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistências aos Antimicrobianos
R	Resistente
RND	Resistance-Nodulation-Division (Resistência-Nodulação-Divisão)
I	Resistência Intermédia
rpm	Rotação Por Minuto
SE	Produção Extensiva
SI	Produção Intensiva
SEPEC	<i>E. coli</i> septicémicas
SUL	Sulfonamidas
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TET	Tetraciclina
TSB	Tryptic Soy Broth (Caldo Trípico de Soja)
UE	União Europeia
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogénicas
USDA	United States Department of Agriculture

I. INTRODUÇÃO

Atualmente a emergência e o aumento da prevalência de bactérias resistentes a antibióticos constitui um dos temas mais preocupantes a nível de saúde pública mundial comprometendo o tratamento de doenças infecciosas, tanto em humanos como animais. Existem estudos que indicam que o uso de antibióticos pertencentes à mesma família em medicina humana e veterinária, também contribui para este problema devido ao efeito de pressão seletiva desenvolvido sobre estirpes bacterianas no nicho animal, nomeadamente em suiniculturas (Machado *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2014; Marshall e Levy, 2011).

A nível internacional têm sido criadas várias iniciativas com a intenção de limitar o aparecimento e a disseminação de resistências, nomeadamente os projetos European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC) e European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS), que em conjunto permitem avaliar as tendências atuais de utilização de antimicrobianos e estudar a emergência de novos problemas especialmente na Europa. Em Portugal, o Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistências aos Antimicrobianos (PPCIRA) é um dos nove programas de saúde prioritários, funcionando no âmbito do departamento de qualidade na saúde da Direção-Geral da Saúde (DGS) (EFSA e ECDC, 2015; DGS, 2014).

Os dados recolhidos em diversos países da União Europeia (UE) (Figura 1) revelam um elevado consumo de antibióticos em ambulatório o qual, sendo na maioria das vezes indevido e intensivo, se reflete no alarmante declínio da suscetibilidade antimicrobiana em importantes microrganismos patogénicos isolados de humanos, tais como *Escherichia coli* (WHO, 2014). Desta forma, constitui uma situação preocupante, dado limitar o número de antibióticos que podem ser usados no tratamento de infeções no Homem (ECDC, 2013)

Em Portugal, tendo em conta as classes terapêuticas abordadas neste estudo, se o consumo em humanos de tetraciclina durante o ano 2012 diminuiu na comunidade, no hospital aumentou. Como no caso das tetraciclina, o consumo de quinolonas em 2012

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

diminuiu na comunidade e aumentou no hospital. No que diz respeito às sulfonamidas e trimetoprim, desde 2011 que o seu consumo tem diminuído na comunidade, mas aumentou no hospital no ano 2012. Relativamente aos aminoglicosídeos, o consumo é muito baixo e revela uma tendência decrescente. Os dados tratados contabilizam a dispensa de medicamentos com prescrição médica e, por isso, o consumo em automedicação não é contabilizado (ECDC, 2013).

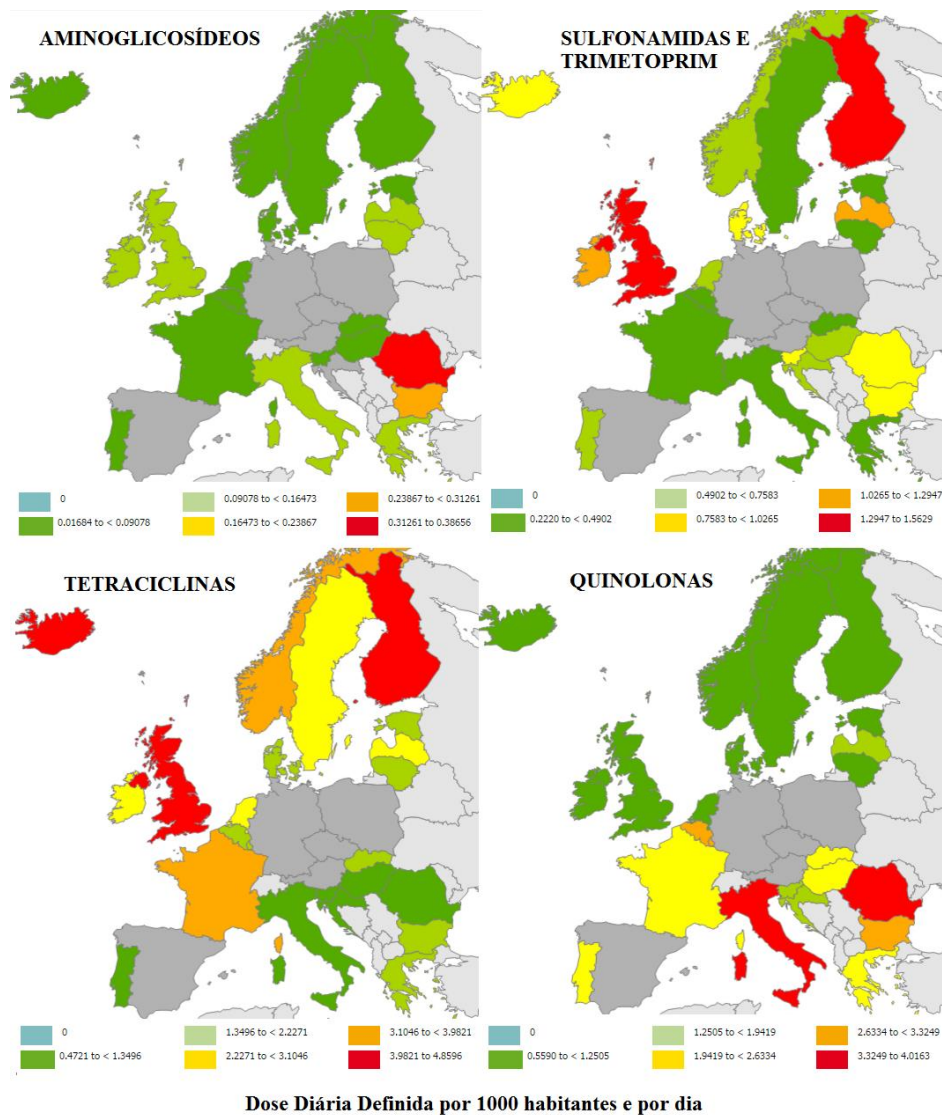


Figura 1 - Ilustração adaptada do European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) com a distribuição geográfica do consumo de antimicrobianos na comunidade europeia em 2013 (ECDC, 2013).

O consumo de vários antimicrobianos extensivamente utilizados em Portugal na produção animal é maior (156,5 toneladas) do que em seres humanos (83,0 toneladas).

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Desta forma, através da relação entre o consumo e a resistência antimicrobiana no Homem e nos animais de produção, representadas pelas setas verticais na Figura 2, é possível considerar potenciais ligações adicionais que podem ser estabelecidas entre as resistências e os consumos das duas populações - resistência em humanos, resistência em animais, consumo em humanos e consumo em animais - como ilustrado pelas setas horizontais da Figura 2. De fato, qualquer associação positiva entre os dados de resistência em humanos e em animais pode refletir a transferência de bactérias resistentes entre estas duas populações e/ou algumas semelhanças no consumo de antibióticos. Estas ligações são informações relevantes para a avaliação de uma potencial relação entre o consumo de antibióticos em animais de produção e a resistência antimicrobiana em humanos (demonstrado pela seta diagonal da Figura 2) (ECDC, EFSA e EMA, 2015).

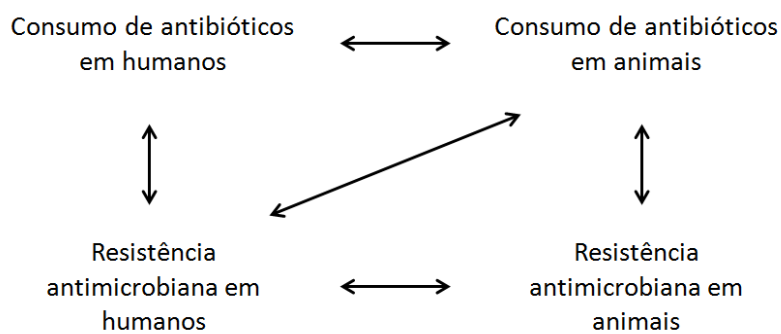


Figura 2 - Relação entre o consumo de antibióticos em humanos e animais e as resistências aos mesmos em bactérias de cada nicho, assim como a potencial transferência de genes de resistência dos animais para os humanos e vice-versa (ECDC, EFSA e EMA, 2015).

Existem estudos que sugerem que as bactérias resistentes ou elementos genéticos móveis associados à resistência - como por exemplo, plasmídeos (moléculas de DNA de cadeia dupla que podem conferir novas funções à célula bacteriana por transferência horizontal) - possam ser transferidos entre os animais e humanos através da cadeia alimentar, pelo contato direto ou ainda pelo meio ambiente (Bennett, 2008; Kruse e Sorum, 1994).

O meio ambiente pode constituir uma via de transmissão entre estes compartimentos devido à ineficácia de eliminação de resíduos de antibióticos pelas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) contaminando subsequentemente, as águas subterrâneas e os solos. Por outro lado, o consumo de antibióticos é também um problema de segurança alimentar devido aos resíduos (antimicrobianos e de bactérias resistentes a antibióticos) presentes na água para consumo e nos géneros alimentícios (Novo *et al.*, 2013). Neste sentido, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e outras organizações oficiais têm incentivado a implementação de programas de monitorização de resistência aos antibióticos em bactérias de origem animal, com o objetivo de controlar a sua disseminação (Campos *et al.*, 2013; Machado e Bordalo, 2014).

Um estudo recente de Campos *et al.* sugere que alimentos de origem animal prontos-a-comer, vendidos em reboques de rua (cachorros-quentes e hambúrgueres), constituem potenciais reservatórios de *E. coli* que albergam genes de resistência a antibióticos, representando por isso um risco para a saúde pública (Campos *et al.*, 2015).

A resistência aos antibióticos pode afetar qualquer indivíduo de uma comunidade, mesmo aqueles que nunca tenham feito medicação com qualquer agente terapêutico, tendo como principais repercussões: a falha de terapêutica, tratamentos mais longos, o aumento das taxas de morbilidade e mortalidade, a necessidade de recorrer a outras moléculas mais potentes e os custos adicionais nos sistemas de cuidados de saúde (Looft *et al.*, 2014).

Tendo em conta as ameaças emergentes de saúde pública, os dados fornecidos pela European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) mostram um padrão diversificado em termos de percentagens de resistência antimicrobiana entre os países europeus, dependendo das bactérias, dos grupos antimicrobianos e da região geográfica. De uma forma geral, baixas percentagens de resistência são relatadas por países do norte, enquanto que países do sul e leste da Europa revelam percentagens mais elevadas (EFSA e ECDC, 2015).

Ao longo dos últimos quatro anos, tem havido uma tendência crescente para a multirresistência aos antibióticos, tanto em bactérias de Gram positivo como de Gram negativo. Por exemplo, em 2012 registou-se uma ocorrência de resistência superior a 25% em sete dos vinte e nove países da União Europeia (UE) para *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA) (bactéria de Gram positivo). No entanto, as mais preocupantes tendências na Europa em 2013 estão relacionadas com a ocorrência de resistência em bactérias de Gram negativo, nomeadamente *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β -lactamases de largo espectro (ESBLs) (EFSA e ECDC, 2015).

1. *Enterobacteriaceae*: principais caraterísticas epidemiológicas

A família *Enterobacteriaceae* é uma família heterogénea de bacilos de Gram negativo que têm uma distribuição ubiquitária na natureza (solo, plantas, água, animais, humanos, etc.) (Sousa *et al.*, 2013). Alguns membros desta família integram a flora indígena intestinal do Homem e de outros animais, como por exemplo, *E. coli*. Por outro lado, também podem ocasionar infeções nos mamíferos (por exemplo, infeção urinária, infeção entérica, entre outras), as quais estão associadas a elevada morbidade e mortalidade (Clermont *et al.*, 2009). Desta forma, tendo em conta a crescente resistência das estirpes bacterianas aos principais grupos de antibióticos utilizados em instituições de prestação de cuidados de saúde na comunidade e na medicina veterinária, nomeadamente em animais de produção (β -lactâmicos e tetraciclinas, respetivamente), constitui um sério problema de saúde pública a nível mundial (ECDC, EFSA e EMA, 2015).

2. *Escherichia coli*

E. coli é um habitante indígena da flora intestinal dos humanos, assim como dos animais. A sua presença nos alimentos, água e meio ambiente, indica contaminação fecal e possível presença de patogénicos entéricos. Desta forma, tem sido utilizada como indicador da pressão seletiva causada pelo uso de antibióticos na produção de animais para consumo humano (Adelowo *et al.*, 2014).

2.1. Importância clínica

As estirpes *E. coli* colonizam de forma assintomática o intestino, no entanto, são também responsáveis por diversas perturbações entéricas tanto nos humanos como nos animais, nomeadamente infeções abdominais (*E. coli* enterotoxígenas - ETEC), do trato urinário (*E. coli* uropatogénicas - UPEC) e, no caso de atingir a corrente sanguínea, pode provocar septicemia (*E. coli* septicémicas - SEPEC). No Homem pode ser adquirida através do consumo de alimentos e água contaminados, ou pela transmissão direta de pessoa a pessoa, ou de animais infetados para o Homem (Jakobsen *et al.*, 2010).

Atualmente, a falta de condições higieno-sanitárias, técnico funcionais ou ambientais do ambiente de produção suinícola, comprometem a saúde e a resposta imunitária dos animais, encorajando o desenvolvimento e disseminação de doenças infecciosas, tais como a colibacilose neonatal. Esta patologia é causada pela ingestão de ETEC de origem materna e ambiental, devido à ausência das defesas naturais (por exemplo, a flora normal do intestino e barreira gástrica) e, a alta suscetibilidade dos animais às enterotoxinas produzidas por estas estirpes de *E. coli*, atingindo os leitões logo após o nascimento. O plano de vacinação das nulíparas no final da gestação deve ser realizado de forma rotineira de forma a conferir a imunidade lactogénica aos leitões neonatos contra as infeções provocadas por ETEC, sendo a diarreia pós-desmame, outro exemplo de uma patologia clínica provocada por este agente etiológico em animais (Nhung *et al.*, 2015).

2.2. Epidemiologia da resistência a antibióticos

Num panorama europeu, verifica-se que para as fluoroquinolonas, dezoito países apresentam percentagens de resistência de 10 a 25%, enquanto que os restantes doze países revelam percentagens de resistência acima de 25%. Em relação aos aminoglicosídeos, apenas um país demonstra esta prevalência, sendo que os restantes países revelam percentagens inferiores (18 países: <10%; 11 países: 10-25%). Em Portugal, no período entre 2012 a 2013 é observado um ligeiro aumento da resistência

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

para as fluoroquinolonas (+ 1,3%), e uma pequena diminuição para os aminoglicosídeos (- 0,5%) (Figura 3) (EFSA e ECDC, 2015).

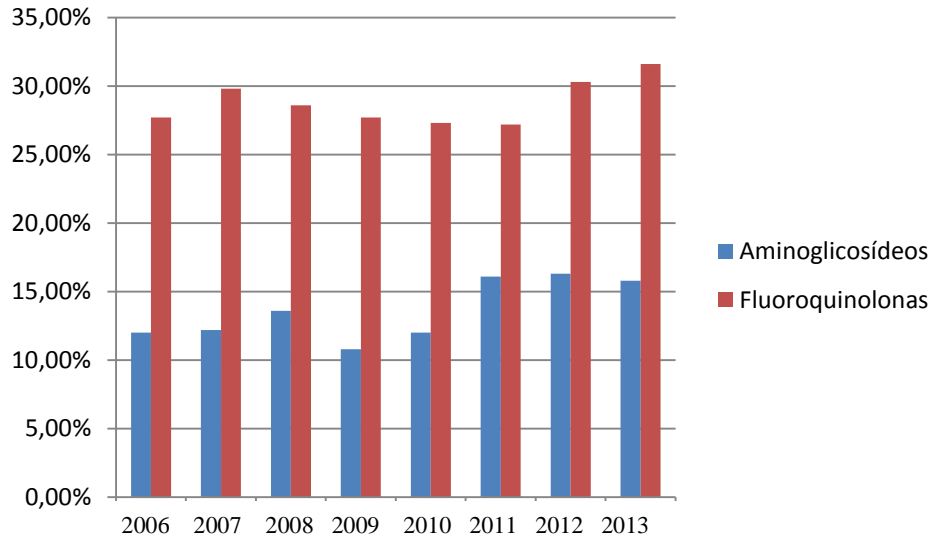


Figura 3 - Prevalência de resistência aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas em isolados de *E. coli* de origem clínica em Portugal, de 2006 a 2013 (EFSA e ECDC, 2015).

A informação reportada ao EARS-Net em 2013 sobre a prevalência de resistências aos antibióticos em estirpes bacterianas de *E. coli* isoladas nos humanos permite concluir que, apesar de a mesma continuar baixa nos países do norte da Europa, atinge contudo valores alarmantes nos países do sul e do centro da Europa (EFSA e ECDC, 2015). Desta forma, países como a Bulgária, Chipre, Eslováquia e Itália registam as taxas de *E. coli* resistentes aos aminoglicosídeos mais elevadas a nível europeu (32,1%, 24,7%, 24,3% e 18,5%, respetivamente). Adicionalmente, estes países também revelam percentagens de resistência elevadas para as fluoroquinolonas na ordem dos 37,4%, 51,9%, 40,3% e 42,2%, respetivamente. Por outro lado, a emergência da resistência para estas duas famílias de antibióticos é também um problema aparentemente emergente em Portugal, onde se têm observado taxas de resistência de 15,8% para os aminoglicosídeos e de 31,6 % para as fluoroquinolonas (EFSA e ECDC, 2015). Contudo, apesar de não serem reportados no EARS-Net dados sobre a resistência a tetraciclina e sulfonamidas em *E. coli*, representam uma tendência crescente de resistência ao longo do tempo na

comunidade europeia, nomeadamente em Portugal (Antunes *et al.*, 2005; Kozac *et al.*, 2009b; Ibrahim *et al.*, 2012).

Nos Estados Unidos a resistência às sulfonamidas tem sido observada em isolados de *E. coli* de humanos e de animais desde 1950 e 1964, respetivamente. Em sistemas de produção animal, as sulfonamidas constituem um dos grupos de antibióticos mais vulgarmente usados individualmente ou em combinação com o trimetoprim, quimicamente designado como 2,4-diaminopirimidina (Tadesse *et al.*, 2012). Por outro lado, isolados de animais nos Estados Unidos revelam uma percentagem elevada de *E. coli* resistentes às tetraciclina (71,1%), sendo que em Portugal têm sido também amplamente utilizadas desde a sua introdução em 1937 na terapia humana, bem como na medicina veterinária após a sua aprovação (1948), o que teve também consequências a nível da suscetibilidade dos isolados de *E. coli* às mesmas (Tadesse *et al.*, 2012). Por outras palavras, devido também ao baixo custo, as tetraciclina ainda são usadas com frequência na prática clínica, e consequentemente, a taxa de resistência não tem diminuído nos últimos anos (Karami *et al.*, 2006; EFSA e ECDC, 2015).

Considerando os níveis de resistência antimicrobiana entre diferente tipos de animais a nível europeu, verificam-se taxas elevadas de resistência às sulfonamidas e às tetraciclina em isolados de *E. coli* provenientes de carne de frango (45% e 37,2%, respetivamente) e de suínos (29,7% e 32,6%, respetivamente). Em isolados obtidos de carne de bovinos a prevalência observada é menor (14,6% e 19,5%, respetivamente). No geral, a resistência aos aminoglicosídeos, nomeadamente à gentamicina, é baixa, sendo nula em *E. coli* de carne de bovinos assumindo valores de 1,4% entre isolados obtidos de carne de suínos e de 4,9 % entre isolados de aves. Já a resistência à ciprofloxacina e ao ácido nalidíxico (quinolonas) é marcadamente elevada em *E. coli* de carne de frango (41,8% e 39,5%, respetivamente) em comparação com as baixas taxas registadas em *E. coli* de carne de suínos e bovinos. Nos suínos as taxas de resistência bacteriana à estreptomicina (aminoglicosídeo), sulfonamidas e tetraciclina foi elevada em 2013, variando de 18,4 a 77,6%, de 13,7 a 75,9% e de 23,5 a 89,4%, respetivamente. Em relação à ciprofloxacina e ao ácido nalidíxico foi baixa em quase todos os países, variando entre 0 a 5,9%, com a exceção de Espanha (19,4%) (EFSA e ECDC, 2013).

2.3. Papel do ambiente de produção animal na seleção e disseminação de *E. coli* resistente a antibióticos e implicações para a saúde pública

Os antibióticos em ambiente de produção animal têm sido utilizados para vários fins, nomeadamente: como terapêutico, profilático, metafilático, promotor de crescimento e ainda, como “*off-label*” ou “*extra-label*” (este último tipo de utilização compreende a administração da substância a um animal de modo ou finalidade diferente ao indicado pelo fornecedor, como por exemplo, espécie diferente, doença, dosagem, posologia e/ou via de administração) (DEPI, 2015; Nogueira *et al.*, 2008).

Atualmente, a pressão económica na indústria de carne suína exige que a produção seja feita de forma a maximizar a sua eficiência no espaço mínimo de tempo. Nos sistemas de produção animal intensivos, hoje em dia os mais escolhidos, há um número elevado de animais por área que têm acesso a uma ração balanceada, onde existem práticas sanitárias mais restritas e, por vezes, a possibilidade de controlo da ventilação. Por outro lado, a obtenção de índices produtivos positivos também estimulou o uso indiscriminado de antibióticos na prevenção de infeções. Pelo contrário, a produção extensiva baseia-se no aproveitamento de recursos naturais mas, como desvantagem caracteriza-se pela exigência de grandes áreas, o qual resulta em baixa produtividade (Ponte, 2013).

A utilização de antibióticos em ambiente de produção animal caracteriza as suiniculturas como um potencial reservatório no fluxo de genes de resistência entre os diferentes ecossistemas. No entanto, a dispersão de estirpes resistentes aos antibióticos através da cadeia alimentar (por exemplo, a exposição a níveis baixos de resíduos de antibióticos pelo consumo de carne crua ou até a exposição às próprias bactérias resistentes, caso a carne não seja bem passada), pelo contato direto com animais portadores de bactérias resistentes comensais e não comensais e, pelo meio ambiente (solos e águas contaminadas através de estrume animal e de efluentes provenientes das explorações), constituem possíveis vias de transmissão entre os diferentes nichos ecológicos (Figura 4) (Ewers *et al.*, 2012).

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

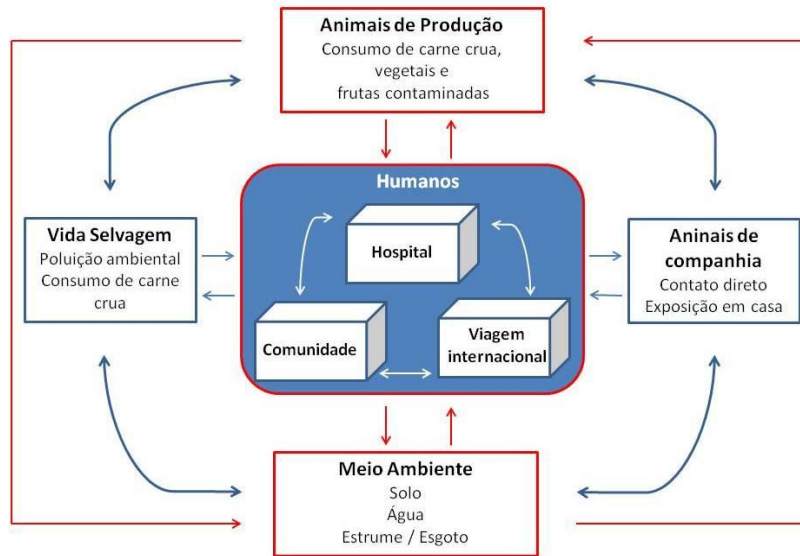


Figura 4 - Fluxograma adaptado de Ewers *et al.* que ilustra as possíveis vias de transmissão da resistência aos antibióticos entre os diferentes nichos ecológicos (Ewers *et al.*, 2012). (Nota: As setas a vermelho destacam a possível ligação entre os animais de produção e o Homem.)

Contudo, o uso de antibióticos continua a ser necessário em medicina veterinária para o tratamento de infeções em animais. As moléculas mais usadas como agentes terapêuticos em veterinária para animais de produção (incluindo cavalos) pertencem à classe das tetraciclina. Em 2010 a Europa apresentou um elevado consumo para esta classe de antibiótico, nomeadamente Portugal onde se verificaram vendas na ordem dos 41,0% (Tabela 1) (ESVAC, 2012).

Tabela 1 - Percentagens de vendas dos antimicrobianos em estudo para animais de produção (incluindo cavalos) em Portugal de 2010 a 2012 (ESVAC, 2012).

	2010 (%)	2011 (%)	2012 (%)
Tetraciclina	41,0	36,5	35,5
Fluorquinolonas	3,2	5,2	5,9
Aminoglicosídeos	1,7	1,7	2,2
Sulfonamidas	6	3,8	1,8
Outros	48,1	52,8	54,6

No tratamento metafílico (aplicado a animais clinicamente doentes e a outros animais do mesmo grupo que estejam saudáveis), devido à gestão produtiva e por questões de eficiência económica da exploração, estão atualmente autorizadas em Portugal 113 pré-misturas para alimento medicamentoso das quais 107 estão aprovadas para suínos (Tabela 2). Desta forma, nas suiniculturas a maioria dos tratamentos coletivos são administrados pelo alimento ou pela água de bebida, com a exceção da maternidade onde a prática mais comum é o tratamento individual (DRAPN, 2009). No entanto, este tipo de tratamento carece de uma terapêutica individualizada, podendo nalguns casos os animais doentes não serem capazes de aceder às doses terapêuticas recomendadas (Lapierre *et al.*, 2008).

Tabela 2 - Substâncias ativas autorizadas como pré-misturas para alimento medicamentoso para suínos em Portugal (DGAV, 2015).

Medicamentos veterinários autorizados	Família	Utilização em medicina humana
Clortetraciclina	Tetraciclinas	✓
Doxiciclina	Tetraciclinas	✓
Espectinomicina	Aminociclitol	✗
Neomicina	Aminoglicosídeos	✓
Oxitetraciclina	Tetraciclinas	✓
Sulfadiazina	Sulfonamidas	✓
Sulfadimetoxina	Sulfonamidas	✗

Legenda: ✓ - Utilizado; ✗ - Não utilizado.

2.4. Mecanismos de resistência a antibióticos em *E. coli* obtidas de ambientes de produção animal

A resistência bacteriana a antibióticos pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é aquela que ocorre de modo natural, na ausência de pressão seletiva dos antibióticos, sendo por isso, uma propriedade fisiológica inerente ao organismo infetante. Por outras palavras, observa-se em todos os membros de uma mesma família ou espécie bacteriana, independentemente do seu local de isolamento (Baron, 1996). Por outro lado, a resistência adquirida ocorre através de mutações espontâneas, que surgem naturalmente durante o crescimento bacteriano, ou pela

aquisição de DNA exógeno (contendo genes de resistência) por transferência de organismos resistentes para organismos sensíveis (Baron, 1996). Portanto, ao contrário do processo de mutação, que ocorre apenas de forma individual e pontual, a transferência horizontal de material genético é um processo que acontece de modo epidémico. Pode ocorrer por transformação, transdução ou conjugação. Neste caso, plasmídeos ou transposões conjugativos (elementos genéticos móveis) que transportam um ou mais genes de resistência aos antibióticos, podem ser transferidos para outras células bacterianas. Para além do processo de conjugação (contato direto entre bactérias), a troca genética nos procariotas pode ocorrer por transdução, mediada por bacteriófagos, ou por transformação, processo em que ocorre a captação e incorporação dentro da célula de segmentos de DNA provenientes de outras células presentes no meio circundante (Sousa, 2006).

Analisando a evolução temporal (passado e presente) no consumo a antibióticos usados na medicina humana e veterinária, descritos anteriormente (ver secção I), é curioso avaliar a resistência a antibióticos em isolados de *E. coli*. Por outro lado, tendo em conta que a variabilidade genética de *E. coli* é essencial para a sua evolução e sobrevivência, é necessário conhecer os seus mecanismos de aquisição de genes de resistência a antibióticos (Szmolka e Nagy, 2013).

i. Sulfonamidas

As sulfonamidas são antibióticos que têm um efeito bacteriostático. Atuam inibindo a síntese do ácido fólico, sendo por isso conhecidas como antimetabolitos, dado que inibem a cadeia metabólica fundamental para a viabilidade da célula bacteriana. São antibióticos inibidores dos processos metabólicos, sendo que a alteração do alvo bacteriano e consequente resistência às sulfonamidas é frequentemente resultado de uma transferência horizontal de genes *sul* (*sul1*, *sul2* e *sul3*) por plasmídeos ou transposões que codificam a produção da enzima dihidropteroato sintetase (DHPS). Por outro lado, as mutações cromossómicas nos genes *dhps* codificadores da enzima dihidropteroato sintetase (DHPS) presentes em bactérias entéricas de Gram negativo, tornam-nas insensíveis à ação das sulfonamidas (Sousa, 2006).

ii. Tetraciclinas

As tetraciclinas são também antibióticos bacteriostáticos, embora o seu mecanismo de ação seja diferente do das sulfonamidas, pois atuam inibindo a síntese proteica. Inibem primariamente a síntese proteica bacteriana, através da sua ligação reversível à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, impedindo o acesso do aminoacil-tRNA(s) aos ribossomas (Sousa, 2006). No entanto, existem já isolados bacterianos resistentes às tetraciclinas, sendo que em *Enterobacteriaceae* os determinantes genéticos mais frequentes são os transposões (facilmente disseminável entre estirpes bacterianas da mesma ou de diferentes espécies). Nas células resistentes a esta família de antibióticos o sistema de efluxo é caracterizado por diferentes determinantes genéticos de resistência (genes *tet*), que codificam as proteínas TET (exportam ativamente as tetraciclinas para fora da célula bacteriana), diminuindo a concentração intracelular das tetraciclinas. Por outro lado, a proteção ribossomal codificada pelos diferentes genes, descritos na Tabela 3, altera o local de ação por ligação de proteínas citoplasmáticas ao ribossoma, tornando-o inacessível à tetraciclina (Mosquito, 2011).

Tabela 3 - Genes que conferem resistência às tetraciclinas.

Genes	Mecanismo de resistência associado
<i>tetA, tetB, tetC, tetD, tetE, tetG, tetH, tetI, tetJ, tetZ, tetK, tetL, tetV, tetY, tet(30), tet(31), otr(B), tcr3, tetA(P), tet(33), tet(34), tet(35)</i>	Bombas de efluxo
<i>tetM, tetO, tetS, tetW, tetQ, tetT, otr(A), tetB(P), tet(32), tet(36)</i>	Proteção ribossomal

iii. Quinolonas

As quinolonas são antibióticos bactericidas que interferem na síntese dos ácidos nucleicos, atuando por inibição da atividade catalítica de duas enzimas essenciais à replicação e transcrição de DNA bacteriano: a DNA girase e a topoisomerase IV. Esta interação conduz à inibição irreversível da atividade destas enzimas, seguida por fragmentação do DNA e, eventualmente, a morte celular. A resistência a este grupo terapêutico surge através de mutações cromossomais transmissíveis verticalmente ou

por genes localizados em plasmídeos (*Plasmid Mediated Quinolone Resistance*, PMQR), transmitidos horizontalmente (Tabela 4) (Karczmarczyk *et al.*, 2011).

Tabela 4 - Genes que conferem resistência às quinolonas.

Genes	Mecanismo de resistência associado
<i>qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS</i>	Proteção das enzimas alvo por proteínas Qnr
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Inativação do antibiótico (por acetilação)
<i>qepA, oqxAB</i>	Bombas de efluxo

Os mecanismos de resistência adquirida a quinolonas (PMQR) conferem geralmente um baixo nível de resistência a estes antibióticos, embora facilitem a expressão de outros mecanismos de resistência a quinolonas na presença de concentrações terapêuticas ou subterapêuticas destes antibióticos (Karczmarczyk *et al.*, 2011).

a. Resistência às quinolonas por proteção das enzimas alvo por proteínas Qnr

As proteínas Qnr protegem a DNA girase e a Topoisomerase IV da ação inibidora das quinolonas, por interferência com o complexo Topoisomerase/DNA/quinolonas, cuja formação é essencial para que estes antibióticos exerçam a sua atividade antibacteriana. O gene responsável foi denominado *qnr* que mais tarde, devido à descoberta de alelos adicionais nesse gene, foi alterado para *qnrA*. Posteriormente, outros genes foram descobertos, designados por *qnrS*, *qnrB*, *qnrC* e *qnrD*. No estudo realizado por Jacoby *et al.*, verificou-se que as condições ambientais podem afetar a expressão de genes *qnr*, sugerindo pistas sobre a função nativa destes genes (Jacoby, 2014).

b. Resistência às quinolonas por inativação enzimática por *aac(6')-Ib-cr*

As quinolonas podem ser parcialmente degradadas por enzimas, o que provoca uma redução da sua atividade. No entanto, a variante *cr* (“*ciprofloxacin resistance*”) da acetiltransferase de aminoglicosídeos, *aac(6')-Ib-cr*, apresenta uma propriedade adicional de acetilar os grupos amina (-NH₂) acessíveis, alterando a estrutura do anel piperazinil das 7-piperazinilquinolonas. O gene *aac(6')-Ib-cr* compromete assim a ação

de duas famílias distintas de antibióticos: as quinolonas e os aminoglicosídeos (Robicsek, 2006; Sousa, 2006).

c. Resistência às quinolonas por bombas de efluxo

QepA constitui uma bomba de efluxo de natureza proteica, codificada pelo gene de localização plasmídica *qepA*. Promove a expulsão de fluoroquinolonas hidrofílicas para fora da célula bacteriana, diminuindo por sua vez a concentração do antibiótico no interior da célula (Mosquito, 2011).

Por outro lado, os genes codificantes *oqxA* e *oqxB* foram encontrados num plasmídeo conjugativo e conferem resistência às fluorquinolonas e ao olaquinox (promotor de crescimento usado em agricultura e veterinária). Esta bomba de efluxo pertence à família de transportadores ativos *Resistance-Nodulation-Division* (RND). Contudo, estudos europeus revelam a pouca incidência ou quase nula destes genes devido à proibição do uso de olaquinox na Europa (Hansen *et al*, 2005).

iv. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos-aminociclitóis são antibióticos bactericidas e, como as tetraciclina, pertencem à classe dos inibidores da síntese proteica. Podem danificar a membrana exterior de bactérias de Gram-negativo e bloquear a síntese de proteínas por ligação à subunidade 30S dos ribossomas, os quais estão envolvidos na tradução de RNA em proteínas. Desta forma, as proteínas *non sense* induzidas pela ação destes antimicrobianos incorporam-se na membrana celular alterando a sua permeabilidade, ocorrendo um efluxo de iões K^+ e outros componentes intracelulares para o exterior, o que justifica o seu mecanismo bactericida. A resistência pode ser devida à alteração da permeabilidade dos invólucros bacterianos (parede celular e membrana citoplasmática) (ver secção a.), à proteção ribossomal (ver secção b.), ou à inativação enzimática do antibiótico (ver secção c.) (Sousa, 2006; Mosquito, 2011).

a. Resistência aos aminoglicosídeos por alteração da permeabilidade dos invólucros bacterianos

Os aminoglicosídeos, compostos altamente hidrófilos, atravessam a membrana externa via hidrófila (através de canais de porina). No entanto, uma alteração ou uma quantidade reduzida das proteínas na membrana externa, pode conferir resistência a esta família de antibiótico. Por outro lado, os aminoglicosídeos também têm de atravessar a membrana citoplasmática para se incorporarem no citoplasma bacteriano. Deste modo, dada a natureza policatiónica dos aminoglicosídeos, esta classe de antibióticos associa-se a transportadores aniónicos pelo menos durante a fase inicial da incorporação. No entanto, por exemplo, bactérias anaeróbias facultativas (*E. coli*) exibem resistência pelo fato de não possuírem sistemas de transporte adequados e/ou um baixo potencial de membrana (Sousa, 2006; Mosquito, 2011).

b. Resistência aos aminoglicosídeos por proteção ribossomal

A produção de metilases para o rRNA 16S impede a ação dos antibióticos na subunidade 30S (Sousa, 2006). Atualmente foram reportados a nível mundial, sete genes codificadores dessas metilases. *armA*, *rmtB*, *rmtC* e *rmtE* são os mais identificados em *Enterobacteriaceae*, enquanto que os genes *rmtA*, *rmtD* and *npmA* são apenas encontrados em *P. aeruginosa*. Na China, em 2007, em isolados de suínos de *Enterobacteriaceae* foram detetados pela primeira vez, plasmídeos codificadores destas metilases no gene *rmtB* (Yang *et al.*, 2011).

c. Resistência aos aminoglicosídeos por inativação enzimática

As enzimas O-fosfotransferases (APH) e O-nucleotidiltransferases (ANT) catalizam, respetivamente, a fosforilação e nucleotidilação dos grupos hidroxilo (-OH), ao passo que as enzimas N-acetiltransferases (AAC) promovem a acetilação dos grupos amina (-NH₂) (Sousa, 2006). Estas enzimas ao atuarem sobre os aminoglicosídeos convertem-nos em metabolitos inativos, pelo que as estirpes bacterianas capazes de produzir estas enzimas apresentam valores muito elevados de Concentração Mínima Inibitória (CMI) (por exemplo, a gentamicina e amicacina) (Mosquito, 2011; Robicsek, 2006).

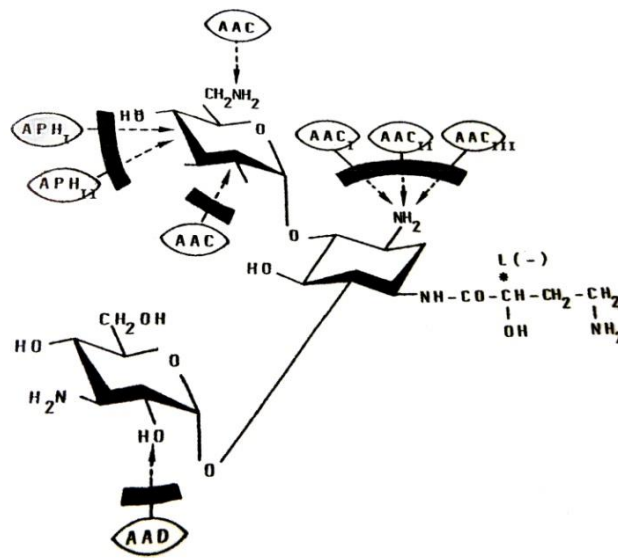


Figura 5 - Inativação dos aminoglicosídeos-aminociclitolis por acetilases (AAC), adenilases (AAD) e fosfotransferases (APH).

3. Contributo dos estudos epidemiológicos sobre a resistência a antibióticos em ambiente de produção animal para a melhoria da saúde pública

As infeções que compreendem uma interação entre um hospedeiro, um ou mais organismos patogénicos e um alimento contaminado ingerido, podem adquirir uma dimensão internacional devido não só a globalização como às alterações climáticas, demográficas, económicas, tecnológicas e a nível dos hábitos sociais. A missão do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) tem por objetivo fortalecer e desenvolver a vigilância em toda a Europa, através da identificação, avaliação e comunicação das atuais ameaças emergentes para a saúde humana por doenças infecciosas. Ao longo do tempo contribuiu para detetar e compreender tendências e para introduzir e/ou melhorar medidas de intervenção e controlo (por exemplo, legislação, educação para saúde, entre outras) (EFSA e ECDC, 2015).

Para além das infeções habituais causadas por *E. coli* (infeções do trato urinário) é necessário estar alerta para as infeções emergentes quando surgem diferentes hábitos alimentares, mudanças na produção animal e mercado internacional alimentar, ou veículos inesperados, como por exemplo, o uso de animais selvagens como animais de companhia (“*mini-pigs*”). De um modo geral, os dados fornecidos por estudos a nível

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

mundial levantam questões importantes sobre o aparecimento e vasta disseminação de bactérias resistentes a antibióticos em fontes de infeção. Portanto, a deteção de espécies bacterianas e respetivas resistências a antibióticos, assim como a deteção de resíduos de antibióticos, são medidas importantes para estabelecer a qualidade e a segurança dos produtos de origem animal para consumo humano (EFSA e ECDC, 2015).

II. OBJETIVOS

A disseminação de genes que conferem resistência a antibióticos em *Enterobacteriaceae*, nomeadamente em *E. coli*, constitui um risco para a saúde pública. Devido à escassa informação científica sobre a contribuição do nicho animal como reservatório de genes de resistência a antibióticos em Portugal, neste trabalho de investigação serão estudados vários isolados de *E. coli* provenientes de diferentes suiniculturas de forma a compreender a situação portuguesa e contextualiza-la a nível da Europa. Desta forma, constituem objetivos deste trabalho de investigação:

- Detetar e caraterizar genes de resistência a vários antibióticos (aminoglicosídeos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclinas) em isolados de *E. coli* previamente caraterizados a nível fenotípico, provenientes de suiniculturas portuguesas de produção intensiva (SI) e extensiva (SE);
- Detetar clones epidémicos e virulentos, internacionalmente disseminados, entre os isolados de *E. coli* representativos para, desta forma, determinar uma possível disseminação de clones bacterianos de alto risco resistentes a antibióticos do animal para o Homem (por exemplo, através da cadeia alimentar e/ou ambiente).

O objetivo final será avaliar o papel das suiniculturas de produção intensiva e extensiva como reservatório de *E. coli* contendo genes de resistência a antibióticos clinicamente relevantes, incluindo clones epidémicos multirresistentes. Os dados obtidos poderão ser úteis para a melhoria de medidas preventivas de ação estratégica no combate à resistência aos antibióticos em Portugal.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Contexto epidemiológico dos isolados bacterianos

Para o presente trabalho de investigação foram selecionados duzentos e dez isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de animais e do ambiente (águas, ar, rações, entre outras) de suiniculturas portuguesas de produção intensiva e extensiva. Estes isolados foram previamente obtidos e preliminarmente caracterizados em projetos de investigação anteriores, tendo sido obtidos de um total de sessenta e seis amostras recolhidas entre abril de 2006 e maio de 2007 de cinco suiniculturas de produção intensiva (A, B, C, E e F) e uma de produção extensiva (D) localizadas na região norte (suiniculturas E e F), centro (suinicultura C) e sul (suiniculturas A, B e D) de Portugal Continental (Tabela 5).

Tabela 5 - Origem dos isolados bacterianos de *E. coli* provenientes das suiniculturas analisadas [estes dados foram adaptados do projeto de investigação “Indicadores de poluição de suiniculturas: antibióticos e bactérias resistentes” (FCT-POCTI/AMB/61814/2004)].

Tipo de amostra ^a	Origem	Número de isolados de <i>E. coli</i>						Total
		SI					SE	
		A	B	C	E	F	D	
Fezes	Leitões	-	-	13	-	4	-	17
	Fêmea em lactação	-	-	-	10	5	-	15
	Sala de gestação	-	-	-	4	4	-	8
	Sala de cobrição	-	-	-	5	-	-	5
	Sala de machos	-	-	-	6	-	-	6
	Sala de engorda	-	-	-	3	-	-	3
	Parideiras	-	-	-	-	-	3	3
Ração	Leitões	-	2	-	-	-	-	2
	Sala de gestação	-	-	-	-	8	-	20
	Sala de cobrição	-	-	-	11	-	-	11
	Sala de engorda	-	-	-	-	4	-	4
Comedouro	Maternidade	-	-	-	2	-	-	2
Água limpa fora de pocilgas	Leitões	-	4	-	-	-	-	4
	Parideiras	-	3	-	-	-	-	3

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Tabela 5 - Continuação.

Tipo de amostra ^a	Origem	Número de isolados de <i>E. coli</i>						Total	
		SI				SE			
		A	B	C	E	F	D		
Água suja fora de pocilgas	Leitões	-	4	-	-	-	-	4	
	Parideiras	-	6	-	-	-	-	6	
Fossa	Sala de cobrição	-	-	-	7	5	-	12	
Ar	Sala de gestação	-	-	-	4	-	-	4	
	Maternidade	-	-	-	1	1	-	2	
	Sala de engorda	-	-	-	-	2	-	2	
Zaragatoa	Retal	Sala de engorda	-	-	-	2	3	-	5
		Sala de cobrição	-	-	-	8	-	-	8
	Nasal	Sala de cobrição	-	-	-	2	-	-	2
	Pata	Sala de cobrição	-	-	-	2	-	-	2
	Fossa	Maternidade	-	-	-	4	-	-	4
	Pavimento e parede	Maternidade	-	-	-	7	-	-	7
	Leitões	Maternidade	-	-	-	5	6	-	11
	Sistema de ventilação	Sala de gestação	-	-	-	5	-	-	5
	Ninho leitões	Sala de gestação	-	-	-	1	-	-	1
	Bebedouro	Água não tratada	-	-	2	2	-	-	4
Pousio		-	-	-	-	-	1	1	
Suínos com menos de 6 meses		-	-	-	-	-	1	1	
Parideiras		-	-	-	-	-	2	2	
Sala de cobrição		-	-	-	1	-	-	1	
Sala de gestação		-	-	-	-	2	-	2	
Terra	Pousio	-	-	-	-	-	2	2	
	Suínos com mais de 6 meses	-	-	-	-	-	5	5	
Chorume	Suínos com menos de 6 meses	-	4	-	-	-	3	7	
Efluente	Maternidade	-	-	1	-	-	-	1	
	Sala de gestação	-	-	2	-	-	-	2	
Esterco seco		-	-	-	4	-	-	4	
Lagonagem		1	-	-	8	-	-	9	
Rio Xarrama		-	-	-	-	-	2	2	
Total		1	23	18	105	44	19	210	

^a Diferentes amostras colhidas representam um número total de duzentos e dez isolados obtidos de seis suiniculturas (A-F) de Portugal Continental, de produção intensiva (SI) ou extensiva (SE).

Os isolados de *E. coli* selecionados para o presente trabalho foram obtidos de amostras sujeitas a técnicas de processamento anteriormente descritas (Novais *et al.*, 2013), tendo sido semeadas em meio de cultura MacConkey Agar suplementado com ceftazidima (CAZ, 1 mg/l), cefotaxima (CTX, 1 mg/l), tetraciclina (TET, 6 mg/l) ou sulfonamidas (SUL, 256 mg/l). De cada placa foram selecionadas colónias representando diferentes tipos morfológicos e padrões de sensibilidade aos antibióticos, as quais foram congeladas a -20 °C em caldo Tryptic Soy Broth (TSB) suplementado com 15% glicerol.

Ainda no decurso de trabalhos anteriores foi também efetuada a identificação dos isolados pertencentes à espécie *E. coli* por provas bioquímicas e/ou métodos de biologia molecular, os quais foram subsequentemente analisados quanto à sua suscetibilidade aos antibióticos (no total treze antibióticos, alguns deles usados na terapêutica humana e animal) através do método de difusão por discos, tendo sido também efetuada a caracterização dos grupos filogenéticos por PCR *multiplex* (Clermont *et al.*, 2000).

i. Suscetibilidade a agentes antimicrobianos

Todos os isolados resistentes ou com resistência intermédia foram considerados como não suscetíveis (Tadesse *et al.*, 2012; Davies e Davies, 2010). Os dados apresentados na Tabela 6 mostram que 91,9% (193/210) dos isolados de *E. coli* apresentaram um fenótipo de multirresistência (MDR) aos antibióticos (resistência a mais do que duas famílias diferentes de antimicrobianos) para as suiniculturas de produção intensiva (175/191; 91,6%) e de produção extensiva (18/19; 94,7%). Como esperado, os fenótipos de resistência mais comuns foram a antibióticos mais antigos, como a estreptomicina (85,3%) (introduzida em 1944), a tetraciclina (77,0%) (introduzida em 1948), a espectinomicina (77,0%) (introduzida em 1961) e as sulfonamidas (73,8%) (o sulfametoxazol foi introduzido em 1961), tendo sido observados mais frequentemente em suiniculturas de produção intensiva (SI) (Tabela 6).

No entanto, na suinicultura de produção extensiva (SE) foi notória uma prevalência inferior da resistência aos antibióticos, com a exceção da espectinomicina que

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

representa os dezanove isolados (100%) e da neomicina (89,5%) (introduzida em 1949). A ocorrência de isolados resistentes aos restantes antimicrobianos foi inferior em ambos os tipos de produção (SI e SE).

Em relação ao ácido nalidíxico (introduzido em 1967), a prevalência de isolados resistentes foi de 33,5% e de 10,5% nas suiniculturas de produção intensiva e extensiva, respetivamente. Também à ciprofloxacina (uma molécula de segunda geração), introduzida em 1987, a percentagem de isolados resistentes foi baixa (SI: 12,0%; SE: 5,3%).

Tabela 6 - Comportamento de suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de *E. coli* incluídos no estudo e respetiva distribuição por tipo de suinicultura.

Antibiótico	SI ^a (n = 191)		Total (%)	SE ^b (n = 19)		Total (%)
	R ^c	I ^d		R ^c	I ^d	
Ácido nalidíxico	56	8	33,5	2	0	10,5
Amicacina	2	0	1,0	0	0	0
Apramicina	4	38	22,0	0	6	31,6
Canamicina	23	16	20,4	0	2	10,5
Ciprofloxacina	12	11	12,0	0	1	5,3
Estreptomicina	135	28	85,3	8	3	57,9
Espectinomicina	134	13	77,0	18	1	100
Gentamicina	10	0	5,2	0	0	0
Neomicina	39	54	48,7	4	13	89,5
Netilmicina	3	1	2,1	0	0	0
Sulfonamidas	141	0	73,8	4	0	21,1
Tetraciclina	145	2	77,0	6	0	31,6
Tobramicina	7	4	5,8	0	0	0

^aProdução Intensiva; ^bProdução Extensiva; ^cResistência; ^dResistência Intermédia

ii. Distribuição por grupos filogenéticos de *E. coli*

A informação quanto aos grupos filogenéticos dos isolados de *E. coli* incluídos neste estudo estava também já disponível de trabalhos anteriores. Assim, os isolados foram identificados mais frequentemente como pertencendo ao grupo filogenético A (72,9%, 153/210), mas também B₁ (14,8%, 31/210), D (9,4%, 20/210) ou B₂ (2,9%, 6/210). Os

grupos filogenéticos mais virulentos (B₂ e D) representaram assim 12,4% dos isolados analisados neste trabalho.

2. Identificação e caraterização de genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina

i. Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA genómico de células bacterianas de *E. coli* foi realizada pelo método de fervura. Primeiramente os isolados em estudo foram cultivados em meio de CLED agar a 37 °C durante dezoito horas. Posteriormente, retirou-se quatro colónias destas culturas e suspendeu-se em 300 µl de água ultra pura estéril num *ependorf* previamente esterilizado. Esta suspensão foi fervida durante quinze minutos em banho de água (GFL[®], 1002) e, de seguida, foi efetuada uma centrifugação (Sigma[®], 2-6) a 14000 rpm durante cinco minutos. Por fim, transferiu-se 250 µl de sobrenadante obtido para outro tubo *ependorf* e congelou-se (-20 °C) para uso posterior nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR). O procedimento descrito encontra-se esquematizado na Figura 6.

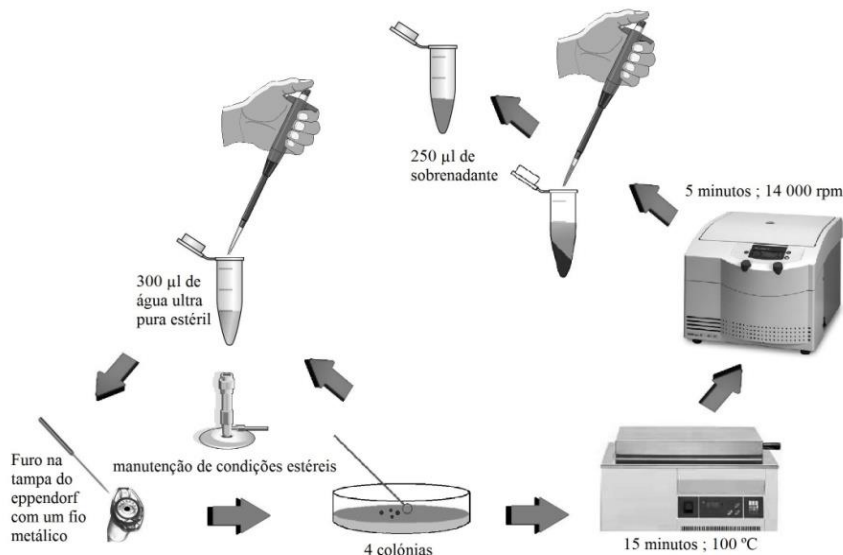


Figura 6 - Representação ilustrativa da extração do DNA genómico pelo método de fervura, sob condições estéreis.

ii. Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)

A pesquisa da presença de genes codificadores de resistência aos aminoglicosídeos (*armA* e *rmtB*), quinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, *oqxA* e *oqxB*) ou a ambos [*aac(6')-Ib-cr*], às tetraciclinas (*tetA*, *tetB* e *tetG*) e sulfonamidas (*sul1*, *sul2* e *sul3*) foi efetuada por PCR, usando os termocicladores Bio-Rad MyCycler™ e Bio-Rad iCycler™.

Em cada reação de PCR foram utilizados 2 µl do DNA previamente extraído e concentrações de reagentes descritas nas Tabelas 8 e 9. A água ultra pura foi adicionada até perfazer um volume final de 20 µl para a deteção dos genes *sul1*, *sul2*, *sul3*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA* e *aac(6')-Ib-cr*, ou de 25 µl para a pesquisa dos genes *tetA*, *tetB*, *tetG*, *oqxA* e *oqxB*. Na tabela 7 Em todas as reações de PCR foi incluído um controlo positivo e um controlo negativo.

Na análise aos aminoglicosídeos utilizou-se o critério sugerido por Doi *et al.* ao qual se observou que os duzentos e dez isolados em estudo, não apresentaram um perfil simultâneo de resistência aos antibióticos gentamicina e amicacina. Por outras palavras, quando nenhuma ou pouca zona de inibição é observada para estes dois antimicrobianos está subjacente um perfil de multirresistência pela produção de metilases do 16S rRNA, impedindo assim a ação do antibiótico (Doi e Arakawa, 2007).

É importante referir que para a pesquisa de genes de resistência de alto nível aos aminoglicosídeos, por produção de metilases do 16S rRNA (*armA* e *rmtB*), utilizou-se o critério sugerido por Doi *et al.*, ou seja pesquisar a presença destes genes apenas em isolados resistentes simultaneamente à gentamicina e amicacina (Doi e Arakawa, 2007).

iii. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR amplificados foram detetados após uma eletroforese horizontal usando gel de agarose a 1,5% (SeaKem® LE Agarose) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X) contendo 0,03% de agente intercalante (Midori Green Advance DNA stain, NIPPON Genetics EUROPE GmbH), emitindo uma fluorescência verde quando ligado

ao DNA amplificado. Como marcador de peso molecular foi usado o GRS Ladder 100 bp (GRiSP Research Solution), segundo as indicações descritas pelo fabricante, permitindo estimar o tamanho dos fragmentos amplificados.

A eletroforese foi realizada a 100 volts durante trinta minutos e, posteriormente, os resultados foram observados sob luz ultravioleta utilizando um transiluminador acoplado a um sistema de aquisição de imagem (*Molecular Imager[®] ChemiDoc[™] XRS System*, Bio-Rad). Paralelamente, os resultados obtidos foram registados por intermédio do software *Quantity One version 4.6.1 Build 055* (BioRad).

iv. Purificação e sequenciação de produtos de PCR

Para concluir a caraterização genética foi necessário sequenciar os produtos previamente amplificados pela técnica de PCR. Sendo a sequenciação um processo complexo e sensível, é imprescindível garantir que a solução a analisar contém apenas o DNA pretendido. Quando apropriado, os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit de purificação GRS PCR & Gel Purification (GriSP Research Solutions), segundo as indicações do fabricante. Posteriormente, foi efetuada uma sequenciação dos genes previamente amplificados e purificados. A sequenciação foi realizada pela empresa Macrogen (Amesterdão, Holanda). Os resultados de sequenciação recebidos foram comparados com dados genéticos mundiais através do software disponível *online* no National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2015).

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Tabela 7 - Primers e condições de PCR utilizados para a pesquisa de genes que conferem resistência a antibióticos.

Primer	Sequência (5'→3')	Gene alvo	Tamanho (bp)	Condições de PCR	Referência
sul 1-F	CGGCGTGGGCTACCTGAACG	<i>sul1</i>	433	1 ciclo de 10 minutos a 94 °C;	(Kerrn <i>et al.</i> , 2002)
sul 1-B	GCCGATCGCGTGAAGTTCCG			35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 66 °C e 30 segundos a 72 °C;	
sul 2-F	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT	<i>sul2</i>	293	1 ciclo de 10 minutos a 94 °C;	
sul 2-B	GCGTTTGATACCGGCACCCGT			30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 66 °C e 45 segundos a 72 °C;	
sul 3-F	GAGCAAGATTTTTGGAATCG	<i>sul3</i>	789	1 ciclo de 10 minutos a 94 °C;	
sul 3-R	CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA			35 ciclos de 50 segundos a 94 °C, 50 segundos a 51 °C e 1 minuto a 72 °C;	
tetA-F	GCTACATCCTGCTTGCCCT	<i>tetA</i>	210	1 ciclo de 10 minutos a 94 °C;	(Guerra <i>et al.</i> , 2004)
tetA-R	CATAGATCGCCGTGAAGA			30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 50 segundos a 72 °C;	
tetB-F	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG	<i>tetB</i>	600	1 ciclo de 10 minutos a 94 °C;	
tetB-R	GTAATGGGCAATAACACCG			30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 50 segundos a 72 °C;	
tetG-F	GCTCGGTGGTATCTCTGC	<i>tetG</i>	500	1 ciclo de 10 minutos a 94 °C;	
tetG-R	AGCAACAGAATCGGGAAC			30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 50 segundos a 72 °C;	
qnrAm-F	AGAGGATTCTCACGCCAGG	<i>qnrA</i>	580	1 ciclo de 10 minutos a 94 °C;	(Cattoir <i>et al.</i> , 2007)
qnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC			35 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 62 °C e 40 segundos a 72 °C;	
qnrBm-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG ^a	<i>qnrB</i>	264	1 ciclo de 10 minutos a 94 °C;	
qnrBm-R	TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA ^b			35 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 57 °C e 40 segundos a 72 °C;	

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Tabela 7 - Continuação.

Primer	Sequência (5'→3')	Gene alvo	Tamanho (bp)	Condições de PCR	Referência
qnrC-F	GGGTTGTACATTTATTGAATC	<i>qnrC</i>	447	1 ciclo de 10 minutos a 94 °C;	(Wang <i>et al.</i> , 2009)
qnrC-R	TCCACTTTACGAGGTTCT			35 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 50 °C e 40 segundos a 72 °C;	
qnrD fw	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	<i>qnrD</i>	581	1 ciclo de 10 minutos a 94 °C;	(Cavaco <i>et al.</i> , 2009)
qnrD rev	AACAAGCTGAAGCGCCTG			35 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 63 °C e 40 segundos a 72 °C;	
qnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	<i>qnrS</i>	428	1 ciclo de 10 minutos a 94 °C;	(Cattoir <i>et al.</i> , 2007)
qnrSm-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG			35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C e 30 segundos a 72 °C;	
aac(6')-Ib-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	<i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i>	482	1 ciclo de 10 minutos a 94 °C;	(Bell <i>et al.</i> , 2010; Minarini <i>et al.</i> , 2008)
aac(6')-Ib- R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT			35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 61 °C e 30 segundos a 72 °C;	
qepAF	GTAGATCGTCAGCAGCAC	<i>qepA</i>	500	1 ciclo de 10 minutos a 94 °C;	(Veldman <i>et al.</i> , 2011)
qepAR	TCTCTGGATCCTGGACAT			35 ciclos de 50 segundos a 94 °C, 50 segundos a 56 °C e 50 segundos a 72 °C;	
oqxAF	CTCGGCGCGATGATGCT	<i>oqxA</i>	392	1 ciclo de 5 minutos a 94 °C;	(Kim <i>et al.</i> , 2009)
oqxAR	CCACTCTTCACGGGAGACGA			35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 62 °C e 45 segundos a 72 °C;	
oqxBs	TTCTCCCCCGGCGGGAAGTAC	<i>oqxB</i>	512	1 ciclo de 10 minutos a 94 °C;	
oqxBa2	CTCGGCCATTTTGGCGCGTA			35 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 64 °C e 40 segundos a 72 °C;	

^aM = A ou C; H = A ou C ou T. ^bY = C ou T.

Tabela 8 - Concentrações dos reagentes usados nas reações de PCR para a deteção de genes *sul*.

Reagente ^a	Concentração stock	Concentração final ^b
Tampão (5x Gel Load Reaction Buffer)	5 ×	1 ×
MgCl ₂	50 mM	3,0 mM
dNTPs	25 mM	0,05 mM
NZYTaq DNA polymerase	5 U/μl	0,04 pmol/μl
<i>Primers</i>	100 pmol/μl	1 pmol/μl

^aPara a deteção de genes *sul* foi usado o kit da NZYTech (NZYTaq with 5x Gel Load Reaction Buffer).

^bPara os *primers sull* a concentração final utilizada para o cloreto de magnésio (MgCl₂) e NZYTaq DNA polymerase foi de 1,5 mM e 0,6 U, respetivamente.

Tabela 9 - Concentrações dos reagentes usados nas reações de amplificação por PCR para deteção de genes *tet*, *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *oqxA/B*.

Reagente ^a	Concentração stock	Concentração final
Tampão (5X Green GoTaq® Flexi Buffer)	5 ×	1 ×
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM ^b
dNTPs	25 mM	0,05 mM
GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase	5 U/μl	0,04 pmol/μl ^c
<i>Primers</i>	100 pmol/μl	1 pmol/μl

^aPara a deteção de genes *tetA*, *tetB*, *tetG*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *oqxA* e *oqxB* foi usado o kit da Promega (GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase).

^bA concentração de MgCl₂ usada para o gene *qepA* foi de 2,0 mM.

3. Detecção de clones epidémicos e virulentos de *E. coli*

A pesquisa da presença de clones epidémicos de *E. coli* pertencentes aos grupos filogenéticos B₂ (ST131 e ST95) e D (ST69, ST393 e ST405) foi também efetuada pela técnica de PCR. As concentrações dos reagentes utilizados, bem como as condições de amplificação, encontram-se descritas nas Tabelas 10 e 11, respetivamente. Em cada reação de PCR a água ultra pura foi adicionada até perfazer um volume final de 20 µl e foi sempre incluído um controlo positivo e um controlo negativo.

Tabela 10 - Concentrações dos reagentes usados nas reações de PCR para deteção de clones epidémicos específicos.

Reagente ^a	Concentração stock	Concentração final
Tampão (5X Green GoTaq® Flexi Buffer)	5 ×	1 ×
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM ^b
dNTPs	25 mM	0,05 mM ^c
GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase	5 U/µl	0,04 pmol/µl
<i>fumC</i> <i>svg</i> <i>pabB</i> <i>fumC</i> <i>mdh</i>	100 pmol/µl	1 pmol/µl

^aPara a deteção de ST69, ST95, ST131, ST393 e ST405 foi usado o kit enzimático da Promega (GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase).

^bA concentração de MgCl₂ usada para a deteção de ST95 e ST393 foi de 0,75 mM e 2,0 mM, respetivamente.

^cA concentração de dNTPs usada para a deteção de ST69, ST131 e ST405 foi de 0,0625 mM.

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Tabela 11 - Primers e condições de PCR utilizados para a deteção de clones de *E. coli* epidémicos (ST69, ST95, ST131, ST393 e ST405).

Primer	Sequência 5' → 3'	Clone	Gene alvo	Tamanho (bp)	Condições de PCR	Referência
CGAf	GCTATCTGGCAGACT	ST69	<i>fumC</i>	175	1 ciclo de 10 minutos a 95 °C; 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C e 1 minuto a 72 °C;	(Johnson <i>et al.</i> , 2004)
CGAr	CGTGCATCGCCGTTGGAAAG				1 ciclo de 10 minutos a 72 °C	
svg-F	TCCGGCTGATTACAAACCAAC	ST95	<i>svg</i>	434	1 ciclo de 15 minutos a 95 °C; 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 30 segundos a 72 °C;	(Bidet <i>et al.</i> , 2007)
svg-R	CTGCACGAGGTTGTAGTCCTG				1 ciclo de 10 minutos a 72 °C	
O25pabBspe.F	TCCAGCAGGTGCTGGATCGT	ST131	<i>pabB</i>	347	1 ciclo de 10 minutos a 94 °C; 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C e 30 segundos a 72 °C;	(Clermont <i>et al.</i> , 2009)
O25pabBspe.R	GCGAAATTTTCGCCGTAAGTGT				1 ciclo de 10 minutos a 72 °C	
G594AF	CCGGAAATCTCCTGT	ST393	<i>fumC</i>	153	1 ciclo de 10 minutos a 95 °C; 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 1 minuto a 72 °C;	(Johnson <i>et al.</i> , 2004)
G594AR	GCTGCTGGCGCTGCGCAAGCAA				1 ciclo de 10 minutos a 72 °C	
adk35f	TGGCAAACCTGGTCACT	ST405	<i>mdh</i>	199	1 ciclo de 5 minutos a 95 °C; 30 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 20 segundos a 58 °C e 20 segundos a 72 °C;	(Matsumura <i>et al.</i> , 2012)
adk35r	CGTTGACCGTATCGTC				1 ciclo de 5 minutos a 72 °C	

IV. RESULTADOS

1. Caraterização de genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina

O gene mais frequentemente encontrado na suinicultura de produção extensiva foi o *qnrD* (31,6%), seguido de *tetB* (21,1%), *tetA* (5,3%) e *qepA* (5,3%). Em relação às cinco suiniculturas de produção intensiva, os genes mais comuns foram, em ordem decrescente de prevalência, *sul3* (42,4%), *tetA* (37,7%), *sul2* (34,0%) e *tetB* (28,3%); sendo que para os restantes genes de resistência as percentagens obtidas foram inferiores ou não detetados. Curiosamente, os genes *tetA* e *tetB* foram adicionalmente observados em alguns isolados suscetíveis (n=3 e n=5, respetivamente) (Tabela 12).

A sequenciação do gene *qnrS* permitiu identificar a variante *qnrS1*. Em relação aos genes *qnrA*, *qepA* e *aac(6')-Ib-cr* não foram detetados. Em relação aos genes de resistência aos aminoglicosídeos, os mesmos não foram pesquisados, pois nenhum dos isolados incluídos no estudo obedeceu aos critérios descritos na secção II. 2. ii., que indicariam a presença presuntiva de genes de produção metilases do 16S RNA.

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Tabela 12 - Ocorrência dos diferentes genes de resistência a antibióticos pesquisados e respetiva distribuição por tipo de suinicultura e de amostra.

Gene	% total	SI (%)					Tipo de amostra	SE (%)	
		A	B	C	E	F		D	Tipo de amostra
<i>sul1</i>	15,2	100	43,5	16,7	12,4	11,4	16,8	ND ^a	ND
		A: lagonagem; B: água limpa fora de pocilgas (leitões e parideiras), água suja fora de pocilgas (parideiras), chorume (suínos com menos de 6 meses); C: efluente (maternidade e sala de gestação), fezes (leitões); E: fezes (fêmea em lactação e sala de machos), ração (sala de cobrição), zaragatoa (nasal e retal - sala de cobrição, pavimento - maternidade); F: fezes (fêmea em lactação e sala de gestação), fossa (sala de cobrição), ração (sala de engorda)							
<i>sul2</i>	31,0	100	30,4	38,9	21,0	63,6	34,0	ND	ND
		A: lagonagem; B: água limpa e suja fora de pocilgas (leitões e parideiras), chorume (suínos com menos de 6 meses); C: bebedouro (água não tratada), efluente (maternidade e sala de gestação), fezes (leitões); E: bebedouro, fossa e ração (sala de cobrição), fezes (sala de engorda e de machos), zaragatoa (nasal e retal - sala de cobrição; parede, pavimento e leitões - maternidade; sistema de ventilação - sala de gestação); F: bebedouro - sala de gestação, fezes (fêmea em lactação, leitões e sala de gestação), fossa (sala de cobrição), ração (sala de engorda e de gestação), zaragatoa (leitões - maternidade; retal - sala de engorda)							
<i>sul3</i>	38,6	100	69,6	83,3	21,9	59,1	42,4	ND	ND
		A: lagonagem; B: água limpa e suja fora de pocilgas (leitões e parideiras), chorume (suínos com menos de 6 meses); C: bebedouro (água não tratada), efluente (maternidade), fezes (leitões); E: ar (sala de gestação), fezes (fêmea em lactação, sala de cobrição, de engorda, de gestação e de machos), fossa (sala de cobrição), lagonagem, ração (sala de cobrição), zaragatoa (nasal e retal - sala de cobrição; fossa e pavimento - maternidade; sistema de ventilação - sala de gestação); F: ar (maternidade e sala de engorda), bebedouro (sala de gestação), fezes (fêmea em lactação, leitões e sala de gestação), fossa (sala de cobrição), ração (sala de engorda e de gestação), zaragatoa (leitões - maternidade; retal - sala de engorda)							
<i>tetA</i>	34,8	ND	39,1	44,4	28,6	56,8	37,7	5,3	Terra (suínos com menos de 6 meses)
		B: água limpa e suja fora de pocilgas (leitões e parideiras), chorume (suínos com menos de 6 meses); C: fezes (leitões); E: ar (sala de gestação), bebedouro (água não tratada), esterco seco, fezes (fêmea em lactação, sala de cobrição e de machos), lagonagem, ração (sala de cobrição), zaragatoa (parede, pavimento e leitões - maternidade; retal - sala de cobrição e de engorda); F: ar (sala de engorda), fezes (fêmea em lactação, leitões e sala de gestação), fossa (sala de cobrição), ração (sala de engorda e de gestação), zaragatoa (fossa e leitões - maternidade)							
<i>tetB</i>	27,6	100	39,1	50	24,8	20,5	28,3	21,1	Chorume (suínos com menos de 6 meses), fezes (parideiras), terra (pousio e suínos com menos de 6 meses)
		A: lagonagem; B: água limpa fora de pocilgas (parideiras), água suja fora de pocilgas (leitões e parideiras), chorume (suínos com menos de 6 meses), ração (leitões); C: bebedouro (água não tratada), efluente (sala de gestação), fezes (leitões); E: ar (maternidade e sala de gestação), fezes (fêmea em lactação, sala de engorda, de gestação e de machos), fossa (sala de cobrição), lagonagem, ração (sala de cobrição), zaragatoa (nasal, pata e retal - sala de cobrição; fossa e parede - maternidade; retal - sala de engorda); F: ar (maternidade), bebedouro (sala de gestação), fezes (fêmea em lactação e leitões), ração (sala de gestação), zaragatoa (leitões - maternidade; retal - sala de engorda)							

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Tabela 12 - Continuação.

Gene	% total	SI (%)					Tipo de amostra	SE (%)	
		A	B	C	E	F		D	Tipo de amostra
<i>tetG</i>	ND			ND			ND	ND	
<i>qnrB</i>	2,9			3,1			B: água limpa fora de pocilgas (parideiras); E: bebedouro (água não tratada), esterco seco, fezes (fêmea em lactação), zaragatoa (pavimento - maternidade, sistema de ventilação - sala final de gestação)	ND	ND
		ND	4,3	ND	4,8	ND			
<i>qnrC</i>	0,5			0,5			Fezes (fêmea em lactação)	ND	ND
		ND	ND	ND	ND	2,3			
<i>qnrD</i>	3,3			0,5			Bebedouro (água não tratada)	31,6	Bebedouro (pousio e suínos com menos de 6 meses), fezes (parideiras), terra (suínos com menos de 6 meses), rio Xarrama
		ND	ND	ND	1,0	ND			
<i>qnrS1</i>	5,2			5,8			Bebedouro (água não tratada), esterco seco, fezes (fêmea em lactação e sala de cobrição), fossa (sala de cobrição), lagonagem, ração (sala de cobrição)	ND	ND
		ND	ND	ND	10,5	ND			
<i>oqxA</i>	0,5			0,5			Ração (sala de engorda)	ND	ND
		ND	ND	ND	ND	2,3			
<i>oqxB</i>	0,5			0,5			Ração (sala de engorda)	ND	ND
		ND	ND	ND	ND	2,3			

^aND, gene não detetado nos isolados de *E. coli*.

2. Deteção de clones de *E. coli* epidémicos

Dois dos seis isolados de *E. coli* do grupo filogenético B₂, foram identificados como pertencendo ao clone B₂-ST131, correspondendo a bactérias obtidas da pele de leitões e de fezes (fêmea em lactação), respetivamente. Entre os dois isolados de *E. coli* identificados como B₂-ST131 foram detetados os genes de resistência a *tetA* e *qnrS1*. O clone B₂-ST95 não foi detetado entre os isolados analisados.

De entre os vinte isolados pertencentes ao grupo filogenético D apenas se identificou a presença de STs epidémicos em três isolados, correspondendo ao clones D-ST393. Os isolados de *E. coli* que identificados como D-ST393 foram detetados na ração (sala de gestação) e nas fezes (sala de machos). Entre os três isolados de *E. coli* identificados como D-ST393 foram detetados os genes de resistência a *tetA*, *tetB* e *sul3*. Os clones epidémicos e internacionais D-ST69 e D-ST405 não foram detetados entre os isolados de *E. coli* analisados.

Todos os clones epidémicos detetados (B₂-ST131 e D-ST393) foram identificados em suiniculturas SI (em particular, nas suiniculturas E e F) (Tabela 13).

Tabela 13 - Resultados obtidos na pesquisa de clones epidémicos e genes de resistência a antibióticos entre os isolados de *E. coli* pertencentes aos grupos filogenéticos B₂ ou D.

	Grupo Filogenético	Isolado (nr.)	Suinicultura	Tipo de amostra	ST					Gene(s) de resistência detetado(s)
					69	95	131	393	405	
SI	D	S411	F	Ração (sala de gestação)	-	-	-	+	-	<i>tetA</i>
		S559	E	Fezes (sala de machos)	-	-	-	+	-	<i>sul3; tetB</i>
		S565			-	-	-	+	-	<i>tetB</i>
	B ₂	S603	E	Zaragatoa leitões	-	-	+	-	-	<i>tetA</i>
		S628		Fezes (fêmea em lactação)	-	-	+	-	-	<i>qnrS1</i>

V. DISCUSSÃO

As suiniculturas inquiridas do norte, centro e sul de Portugal Continental, constituem um ambiente favorável para a sobrevivência, transferência e disseminação de bactérias resistentes a várias famílias de antibióticos entre animais e o Homem. O crescimento de *E. coli* em placas suplementadas com diferentes classes de antibióticos (sulfonamidas, tetraciclina, quinolonas e aminoglicosídeos), demonstrado nos trabalhos de investigação que antecederem o presente estudo, revelam a seleção de bactérias MDR em suiniculturas portuguesas. Todavia, o número de isolados que demonstraram ser resistentes aos antibióticos foi superior nas suiniculturas de produção intensiva (A, B, C, E e F) comparativamente com os provenientes da exploração de produção extensiva (D).

O uso de agentes antimicrobianos em ambiente de produção animal é preocupante, especialmente se se tiver em conta que algumas estirpes de *E. coli* estão presentes em amostras provenientes de bebedouros e comedouros usados para consumo animal e ainda, no ar inspirado pelos trabalhadores das suiniculturas. São exemplos práticos deste trabalho de investigação a presença de genes de resistência a antibióticos em bebedouros na suinicultura E (40% para o gene *tetA* e 2% para os genes *tetB* e *sul3*) e na suinicultura F (66,7% para o gene *sul3* e 33,3% para os genes *tetA* e *tetB*). Paralelamente, este último parâmetro traduz a importância das suiniculturas na saúde pública das comunidades envolventes que podem estar expostas a tais bactérias pelo ar e/ou águas, tal como sugere Gibbs *et al.* (Gibbs *et al.*, 2006).

Por outro lado, o contato direto entre os produtores e os animais de produção, pode ser outra fonte de transmissão de genes de resistência ou de estirpes resistentes entre animais e o Homem. Este problema pode ainda ser exponenciado quando amostras biológicas provenientes de suiniculturas são rejeitadas em efluentes ou usadas na agricultura, como é o caso do chorume e esterco, respetivamente. Sendo que o esterco pode ser usado como fertilizante orgânico, contaminando desta forma os solos e águas subterrâneas (por exemplo, na suinicultura E, 50% dos isolados de esterco seco são portadores do gene *qnrS1* e 25% albergam os genes *qnrB* e *tetA*). Por outro lado, os

isolados provenientes de amostras de chorume produzidos na suinicultura B apresentam genes de resistência para vários antibióticos, nomeadamente: *sul1* (100%), *sul3* (100%), *sul2* (50%), *tetA* (50%) e *tetB* (25%). Note-se que o chorume, muito comumente identificado nas suiniculturas, consiste numa “mistura de fezes e urinas dos animais, bem como de águas de lavagem ou outras, que pode conter desperdícios da alimentação animal ou de camas e as escorrências provenientes das nitreiras e silos” (DRAPC, 2012).

Tal como já foi referido anteriormente, os isolados de *E. coli* selecionados para este estudo provenientes das suiniculturas portuguesas de produção intensiva apresentaram resistência frequente a aminoglicosídeos-aminociclitolis [em particular para a estreptomicina (85,3%) e espectinomicina (77,0%)], tetraciclina (77,0%) e sulfonamidas (73,8%). Contudo, entre os isolados provenientes da exploração de produção extensiva foi mais frequente apenas a resistência a aminoglicosídeos-aminociclitolis, nomeadamente à espectinomicina (100%) e à neomicina (89,5%). Este panorama confirma os dados apresentados por outros estudos europeus, com a exceção da classe terapêutica dos aminoglicosídeos, pois a ocorrência encontrada neste estudo é maior (EFSA, 2010; Adelowo *et al.*, 2014).

As sulfonamidas foram introduzidas em 1937 e têm sido usadas de forma contínua há mais de 70 anos. A resistência às sulfonamidas tem sido observada de forma crescente ao longo do tempo em isolados de *E. coli* de origem humana desde 1950 e de origem animal desde 1964 (Perreten, 2003). A alta prevalência de resistência tem sido reportada em bactérias entéricas isoladas de animais de produção saudáveis e de humanos, e é frequentemente associada à aquisição de genes de resistência *sul1* e *sul2* (Kozak, 2009b). Estes genes de resistência foram os mais frequentemente detetados em isolados de *E. coli* analisados neste estudo, com a exceção na exploração de produção extensiva. Adicionalmente, nas cinco suiniculturas de produção intensiva, para além da presença dos genes *sul1* (16,8%) e *sul2* (34,0%), foi observada também o gene *sul3* (42,4%). Tendo em conta os trabalhos que têm vindo a ser publicados sobre a presença de genes de resistência a esta classe de antibióticos, o resultado obtido neste estudo para o gene *sul3* é representativo de uma nova incidência em ambiente de produção animal em Portugal, o que demonstra a capacidade de adaptação ao meio ambiente devido à aquisição de

novos genes de resistência em *E. coli*. Comparando o resultado obtido neste estudo para o gene *sul3* com outros estudos europeus, uma incidência inferior (12%) foi observada em amostras oriundas de suínos, carcaças de suínos e seres humanos durante o período de 2007. Interessantemente, os dados obtidos no estudo realizado por Machado *et al.*, em amostras provenientes de humanos saudáveis (4% de ocorrência do gene *sul3*) alertam para a transferência do gene *sul* através dos animais de produção para a flora comensal humana (Machado *et al.*, 2013; Perreten e Boerlin, 2003; Wu *et al.*, 2010).

Relativamente aos isolados que apresentam resistência para as tetraciclinas, demonstraram possuir os genes *tetA* e *tetB* (47,7% e 37,9%, respetivamente). Este fenómeno não é surpreendente porque a tetraciclina, introduzida em 1948, tem sido largamente usada não só como agente terapêutico na medicina humana (desde 1952), mas também na prevenção de doença e/ou como promotor de crescimento na produção animal. Em relação à pesquisa do gene *tetG* não foi detetado, porém identificou-se a presença dos genes *tetA* (SI: 37,7%; SE: 5,3%) e *tetB* (SI: 28,3%; SE: 21,1%) que codificam também para resistência a tetraciclinas, sendo que os dados obtidos são corroborados com outros estudos (Boerlin *et al.*, 2005; Kozak *et al.*, 2009).

No que concerne à resistência a quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR), nos isolados de *E. coli* que correspondem à exploração de produção extensiva apenas se detetou a presença do gene *qnrD* (31,6 %). Tendo em conta as suiniculturas de produção intensiva, foi observada uma variação de prevalência entre 0,5 a 5,8% nos restantes genes de resistência para este agente terapêutico (*qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS1*, *oqxA* e *oqxB*). Os resultados apurados corroboram os dados veiculados por Chen *et al.*, com a exceção da presença dos genes *oqxA* e *oqxB* que nesse estudo realizado com amostras provenientes de suínos na China (1993-2010) foram mais frequentemente detetados (51,0%), e da ausência de genes *qnrC* e *qnrD* (Chen *et al.*, 2012).

Por fim, os aminoglicosídeos, dado o seu amplo espectro de atividade, têm sido utilizados em monoterapia, no tratamento de infeções graves. Desde a introdução da estreptomicina (1944) que esta classe de agentes antimicrobianos tem sido amplamente usada e, portanto, vários mecanismos de resistência têm sido desenvolvidos, nomeadamente a metilação do 16S rRNA na subunidade ribossomal 30S, inibindo o

acesso do antibiótico ao seu local de ação. Este mecanismo foi reportado pela primeira vez em 2003 e há cada vez mais estudos publicados a nível mundial (Doi e Arakawa, 2007). Este mecanismo conduz à resistência de alto nível aos aminoglicosídeos, ou seja, a bactéria passa a apresentar fenótipo de resistência a vários aminoglicosídeos e, quando analisada por métodos quantitativos de avaliação da suscetibilidade a aminoglicosídeos, passa a apresentar CMI's muito elevadas a vários aminoglicosídeos (Adhikari, 2010).

As diferenças na prevalência dos genes entre as classes de agentes antimicrobianos anteriormente mencionadas, para além de refletirem diferentes necessidades terapêuticas e profiláticas dos animais de produção, estão também relacionadas com as fases e o tipo de produção subjacentes (Doi e Arakawa, 2007). No entanto, esta ameaça à saúde pública torna-se ainda mais preocupante na medida em que estão presentes isolados resistentes a vários antibióticos.

Nas seis suiniculturas estudadas é visível a concordância entre a comunicação relatada pelo produtor sobre os antibióticos utilizados na suinicultura e a prevalência de genes de resistência detetados. Por outro lado, verifica-se percentagens mais elevadas de genes de resistência entre os isolados das suiniculturas de produção intensiva, com a exceção da suinicultura E, sendo que na suinicultura de produção extensiva se observa uma menor ocorrência de genes responsáveis pela resistência aos antibióticos quando comparada com as explorações de produção intensiva (Tabela 14).

Através de imagens ilustrativas para cada suinicultura (Figura 7), é possível analisar os locais onde existe uma maior presença de genes de resistência aos antibióticos estudados. Este estudo evidencia que as suiniculturas portuguesas constituem um nicho de *E. coli* portadores de genes de resistência a antibióticos com interesse clínico, os quais podem ser transferidos para o Homem através da cadeia alimentar e/ou meio ambiente. Por outras palavras, o uso abusivo e prolongado destas substâncias na prevenção e/ou tratamento na produção animal e, por outro lado, o ambiente confinado a que na maioria das suiniculturas os animais estão confinados, influenciam o aumento da emergência e disseminação destes genes entre os animais, condicionando mais tarde a utilização dos antibióticos. Um exemplo prático que reflete o risco do incremento das

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

resistências aos antibióticos no Homem é o que acontece na suinicultura D com o uso de doxiciclina (tetraciclina), pois é usado tanto na medicina humana como veterinária.

Tabela 14 - Relação entre a comunicação dos produtores de suínos relativamente ao uso de antibióticos e a deteção de genes de resistência nas suiniculturas analisadas.

Suinicultura	Comunicação	Gene(s) de resistência detetado(s) (%)
SI	A	Sem conhecimento <i>sul1</i> (100%); <i>sul2</i> (100%); <i>sul3</i> (100%); <i>tetB</i> (100%)
	B	Gentamicina <i>sul3</i> (69,6%); <i>sul1</i> (43,5%); <i>tetA</i> e <i>tetB</i> (39,1%); <i>sul2</i> (30,4%); <i>qnrB</i> (4,3%)
	C	Oxitetraciclina <i>sul3</i> (83,3%); <i>tetB</i> (50%); <i>tetA</i> (44,4%); <i>sul2</i> (38,9%); <i>sul1</i> (16,7%);
	E	Antibióticos e probióticos (sem especificação) <i>tetA</i> (28,6%); <i>tetB</i> (24,8%); <i>sul3</i> (21,9%); <i>sul2</i> (21,0%); <i>sul1</i> (12,4%); <i>qnrS</i> (10,5%); <i>qnrB</i> (4,8%); <i>qnrD</i>
	F	<i>sul2</i> (63,6%); <i>sul3</i> (59,1%); <i>tetA</i> (56,8%); <i>tetB</i> (20,5%); <i>sul1</i> (11,4%); <i>qnrC</i> , <i>oqxA</i> e <i>oqxB</i> (2,3 %)
SE	D	Enrofloxacina Ciprofloxacina Doxiciclina <i>qnrD</i> (31,6%); <i>tetB</i> (21,1%); <i>tetA</i> (5,3%)

Sob outra perspetiva, é imprescindível abordar o impacto ambiental e os riscos que possam estar associados aos procedimentos exercidos por parte dos produtores nas suiniculturas como por exemplo, as possíveis descargas de material orgânico para as águas residuais sem qualquer tipo prévio de tratamento. Esta conduta implica não só a disseminação para o Homem, mas também para os animais, de bactérias resistentes a antibióticos através de diversas vias (por exemplo, pela cadeia alimentar). Por outro lado, também acarreta mais um problema nas comunidades envolventes pela contaminação microbiológica das águas não tratadas (minas, fontes, poços e furos), destinadas ao consumo humano. Em certas zonas geográficas (lagos ou rios), esta água contaminada é consumida diariamente e utilizada nas mais diversas atividades recreativas, pelo que há uma grande probabilidade de haver colonização do intestino do Homem e animais (EDIA, 2011). Por conseguinte, pode promover a aquisição de genes de resistência por bactérias da flora comensal do intestino do hospedeiro. Desta forma, é

plausível que esta realidade possa ser um dos contributos para que o rio envolvente da suinicultura seja classificado como “Classe E - extremamente poluído”, de acordo com o critério do Instituto Nacional da Água (INAG) (EDIA, 2011). Neste trabalho, 50% dos isolados de *E. coli* resistentes às quinolonas obtidos de amostras do rio circundante da suinicultura D, apresentaram a presença do gene *qnrD*.

Contudo, certos fatores ligados não só ao ambiente (falta de higiene, temperatura e ventilação inadequadas), mas também às infeções pós-parto, sugerem um aumento quer do número de estirpes de *E. coli* enteropatogénicas, quer da probabilidade do aparecimento da diarreia neonatal dos leitões, por contaminação da maternidade. Contextualizando esta análise de acordo com os resultados obtidos, é notória uma elevada prevalência de genes de resistência nas suiniculturas de produção intensiva, para as quais foram recolhidas amostras da maternidade. Assim sendo, a suinicultura C apresenta uma ocorrência de 100% para os genes *sul1*, *sul2* e *sul3*, sendo que os isolados que correspondem aos leitões apresentam uma ocorrência de 100% para o gene *sul3* e de 66,7% para *tetA*. O mesmo se observa na suinicultura F, onde se observou uma elevada ocorrência de *sul2* (72,7%), *sul3* (72,7%) e *tetA* (54,5%). Apesar da prevalência de genes de resistência na suinicultura E ser inferior (*tetA*: 53,6%; *tetB*: 21,4%), pode-se concluir que isolados de *E. coli* portadores de genes de resistência às sulfonamidas e tetraciclina são os mais prevalentes na fase de amamentação nas explorações estudadas. Importa salientar que a suinicultura B também apresentou percentagens elevadas para os mesmos genes de resistência encontrados nas explorações descritas anteriormente, mas em amostras de água suja e limpa provenientes da maternidade. No entanto, na suinicultura de produção extensiva (D), nomeadamente entre as parideiras, observou-se a presença dos genes *tetB* (20%) ou *qnrD* (20%), o que pode sugerir uma diminuição da probabilidade de aparecimento de doença clínica nos animais nesta suinicultura (Wang, 2009). Por conseguinte, neste tipo de exploração de produção extensiva, os leitões albergam menos genes de resistência a antibióticos em relação às explorações de produção intensiva, onde são observadas percentagens mais altas. Na prática, sugere a aplicação profilática dos antibióticos devido à elevada densidade dos animais na exploração de produção intensiva.

Por outro lado, estudos prévios têm mostrado que percentagens de resistência a antibióticos são por norma maiores em animais jovens. Tendo em conta que o número efetivo anual de leitões tem vindo a crescer em Portugal (2006: 580000 cabeças; 2007: 604000 cabeças; 2014: 714000 cabeças) (Eurostat, 2014) e, é necessário delinear e implementar medidas eficazes de controlo da emergência e disseminação de *E. coli* multirresistentes aos antibióticos nos suínos, de forma a minimizar o risco para a saúde pública (Boerlin *et al.*, 2005).

Por outro lado, existe uma preocupação acrescida devido a algumas bactérias resistentes aos antibióticos conseguirem sobreviver em salas desinfetadas (Nogueira *et al.*, 2008). Este fenómeno parece estar a ocorrer na suinicultura C, onde os produtores informaram sem especificação o uso de três desinfetantes de marcas diferentes, tendo sido, todavia, detetadas *E. coli* resistentes a antibióticos em diversas divisões da suinicultura, tais como: na maternidade, nos bebedouros, nos leitões e na sala de gestação (Figura 9). Este fenómeno contribui para a evolução da epidemiologia da resistência aos antibióticos neste nicho ecológico, tal como demonstrado por Nogueira *et al.* (Nogueira *et al.*, 2008).

Uma das fases mais críticas em termos de valorização da carne é a de engorda, uma vez que antecede o abate e por sua vez, a colocação da carne suína no mercado. Neste estudo, as suiniculturas E e F apresentaram a ocorrência de genes de resistência nas salas de engorda para as tetraciclinas (*tetB*: 60%) e sulfonamidas (*sul3*: 85,7%; *sul2*: 71,4%), respetivamente.

A fase de gestação tem o seu protocolo de antibioterapia essencialmente focado na prevenção do aparecimento nos leitões de doenças que possam ser transmitidas pela mãe, como é o caso da colibacilose neonatal dos leitões (PE e CUE, 2003). No presente estudo, a frequência de deteção dos genes de resistência a antibióticos variou entre as diferentes suiniculturas (C, E e F), como ilustrado na Figura 7.

Por fim, o matadouro corresponde à fase final deste ciclo fechado de produção animal, o a qual abrange suínos com mais de seis meses. Apesar de não ter sido analisado neste estudo, a contaminação de carcaças com flora fecal pode ocorrer durante o abate.

Porém, é notório que nos isolados da suinicultura D (de produção extensiva) não foram detetados genes de resistência aos antibióticos testados em suínos, compreendidos nesta faixa etária, que posteriormente serão abatidos. O invés acontece na suinicultura de produção intensiva (E), onde nos isolados na sala de machos se observou a presença dos genes *sul3* (50%), *tetB* (33,3%), *sul1* (16,7%), *sul2* (16,7%) e *tetA* (16,7%). Independentemente do tipo de produção praticado, é imperativo limitar em cada suinicultura o uso de antibióticos e respeitar o intervalo de segurança indicado por lei, de forma a produzir géneros alimentícios de origem animal que não ultrapassem os limites máximos de resíduos (LMR) permitidos (Ministério da Saúde, 2011).

Apesar de ter sido detetado o gene *tetB* que confere resistência às tetraciclina, o gene *tetA* parece ter uma disseminação mais marcante, corroborando outros estudos (incluindo Portugal) analisando quer isolados clínicos de humanos como de animais de produção a nível mundial (Nogueira, 2008; Karami, 2006; Kozak, 2009a). Neste estudo, 20,4% (30/147) dos isolados resistentes à tetraciclina das suiniculturas de produção extensiva não apresentaram nenhum dos genes estudados (*tetA*, *tetB* e *tetG*). O gene *tetG* não foi detetado entre os isolados em análise, confirmando assim os dados apresentados por outros estudos em períodos de tempo aproximados ao presente trabalho de investigação (Adelowo *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2013).

A deteção de genes *oqxA* e *oqxB*, apesar de ter sido mais rara (um isolados de ração da sala de engorda), poderá indicar a emergência deste mecanismo de resistência neste nicho, situação que deve ser vigiada.

O clone ST131 tem sido responsável por infeções extraintestinais em ambiente hospitalar, constituindo um clone muito virulento que frequentemente alberga múltiplos genes de resistência a antibióticos. Encontra-se muito disseminado mundialmente e tem sido associado sobretudo à disseminação do gene CTX-M-15 (conferindo resistência a beta-lactâmicos de largo espectro). Neste estudo tendo em conta o local dos resultados obtidos para o clone B₂-ST131 (pele de leitões e de fezes (fêmea em lactação), os suínos ou as suiniculturas poderão ser um reservatório deste clone de alto risco (virulento e com genes de resistência a *tetA* e *qnrS1*) que poderá ser preocupante se passar para o Homem por via da cadeia alimentar (consumo de leitões).

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Tendo em conta a disseminação atual de certos clones epidémicos de *E. coli*, em especial aqueles que albergam genes de resistência a antibióticos, os resultados obtidos neste estudo, demonstraram a ocorrência de isolados de *E. coli* pertencentes a dois clones epidémicos e/ou pandémicos e virulentos apenas em suiniculturas de produção intensiva.

O grupo filogenético ST393, que está habitualmente associado a estirpes comensais não causadoras de infeções extraintestinais, neste estudo foi observado em isolados de *E. coli*, o que é uma situação preocupante visto serem portadores de genes de resistência *tetA* (suinicultura F: ração-sala de gestação), *sul3* e *tetB* (suinicultura E: fezes-sala de machos).

Contudo, a capacidade de transmissão horizontal de genes entre bactérias patogénicas e as bactérias comensais do trato gastrointestinal em humanos e animais pode acarretar sérios problemas para a saúde pública, uma vez que inviabiliza o uso destes medicamentos em tratamentos clínicos.

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

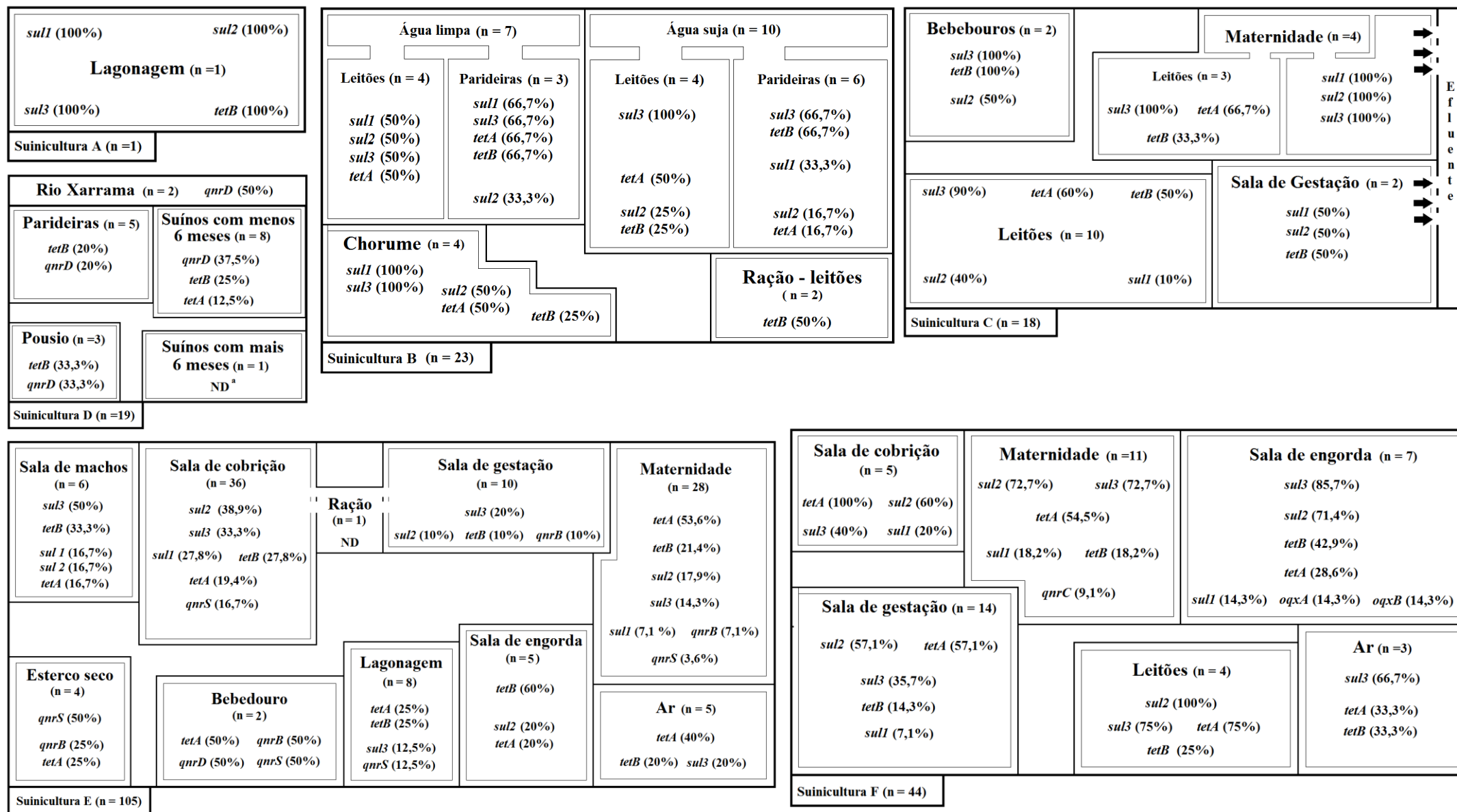


Figura 7 - Ilustração da ocorrência e distribuição de genes de resistência aos antibióticos entre os isolados de *E. coli*, sendo que a disposição das divisões é representada de forma aleatória.

VI. CONCLUSÃO

Com a notável exceção das quinolonas, os resultados deste estudo mostram uma alarmante ocorrência de genes de resistência a sulfonamidas e tetraciclina entre isolados de *E. coli* em suiniculturas portuguesas. Dadas as exigências estruturais e tecnológicas da intensificação da produção suinícola (aumento da densidade populacional), com a consequente dificuldade acrescida no controlo das infeções nas diversas fases de produção, a Comissão Europeia tem apelado ao uso prudente e consciente dos antibióticos, como forma de redução e combate às resistências antimicrobianas (ECDC, EFSA e EMA, 2015). É também imperativo as instalações da suinicultura possuírem locais de armazenamento dos resíduos animais, de forma a limitar a contaminação microbiana dos solos e, posteriormente, das águas subterrâneas, e em última análise, rios, lagos e oceanos (CUE, 2006). Assim, nos locais que apresentam maior prevalência de genes de resistência a antibióticos é imprescindível a implementação de boas práticas de higiene, vacinação, biossegurança e manejo, as quais melhoram a eficiência produtiva das explorações (Novo, 2013). Para além da utilização racional dos antibióticos, impera a necessidade de cumprimento de algumas medidas, tais como a manutenção de ventilação, temperaturas adequadas, ausência de lotação das salas, organização de suínos por faixas etárias, realização análises bacteriológicas das águas de bebida, vacinação das fêmeas contra a colibacilose durante a gravidez e implementação de programas de vigilância na maternidade, de forma assegurar a ingestão de colostro e leite pelos leitões (CUE, 2006). Por outro lado, a utilização de um sistema *all-in, all-out*, onde os animais de cada divisão ocupam ou desocupam uma sala da exploração no mesmo momento, é outra medida igualmente eficaz na boa higienização de qualquer divisão de uma suinicultura (CUE, 2006).

Os resultados obtidos neste estudo, por comparação com outros trabalhos de investigação em isolados de *E. coli* provenientes de géneros alimentícios e da população humana, poderão revelar possíveis conexões com algumas patologias infecciosas prevalentes na comunidade, como por exemplo, as infeções do trato urinário. Devido às interações socioeconómicas através do contato físico direto, da cadeia alimentar e do meio ambiente, a saúde humana e animal estão intimamente ligadas. Daí nasce a necessidade de cruzar as informações obtidas neste estudo com outros dados

provenientes de amostras humanas a nível europeu, nomeadamente em Portugal (Nogueira *et al.*, 2008).

O papel do farmacêutico é crucial durante a venda, bem como na sensibilização e reeducação para o uso de antibióticos na medicina humana e veterinária (por exemplo, o risco associado ao seu uso, a gestão dos seus resíduos, entre outros). Tendo em conta o aumento do consumo de carne suína (2005: 448000 toneladas; 2014: 462000 toneladas), é importante preconizar a criação e manutenção de novas campanhas de informação e educação à comunidade, no sentido de se conhecer o impacto das atividades pecuárias desenvolvidas. Segundo as recomendações indicadas pela United States Department of Agriculture (USDA), existem vários fatores que, apesar de poderem ser prevenidos, podem contribuir para a ocorrência de toxinfecções alimentares: ingestão de ingredientes crus contaminados (incluindo a água), a refrigeração ou armazenamento inadequados (recomendado abaixo dos 4°C), alimentos insuficientemente cozinhados (recomendado acima dos 62,8°C), contaminação cruzada de alimentos crus para os cozinhados, reduzida higiene pessoal por parte dos manipuladores, instalações com condições higieno-sanitárias extremamente precárias, ou ainda dos indivíduos não treinados (USDA, 2015). Por outro lado, promover a aquisição de competências e conhecimentos de forma contínua, tanto pelos profissionais de saúde animal como pelos produtores, sobre antibióticos usados em medicina veterinária, contribuirá para a melhoria da biossegurança em explorações de produção animal (AHDB, 2015; USDA, 2015).

Na perspetiva de “Uma Só Saúde”, tendo em conta a proteção do consumidor dos géneros alimentícios de origem animal, em Portugal, desde 2014 está em vigor o Plano de Ação Nacional para Redução do Uso de Antibióticos nos Animais (PANRUAA), o qual decorrerá por um período de cinco anos (2014-2019), com o intuito de reduzir a utilização de antibióticos nos animais e combater a antibiorresistência (Ponte, 2013). Futuramente, o cruzamento de dados oriundos de trabalhos de investigação com amostras biológicas do Homem, meio ambiente e animais para consumo humano serão uma mais-valia para compreender a evolução temporal e espacial da prevalência de genes de resistência a antibióticos por comparação com o presente estudo. Por outras palavras, será útil para a identificação de vias de disseminação de bactérias e genes de resistência a antibióticos.

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Serão imprescindíveis estudos mais alargados que incluam uma avaliação multidimensional e, uma maior coordenação e cooperação entre diferentes redes de vigilância a nível internacional na deteção precoce de possíveis mecanismos envolvidos na disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos, que terão de ser adaptados à epidemiologia local de cada área geográfica (DEPI, 2015). Por outro lado, é imprescindível monitorizar, em períodos regulares, o impacto das explorações animais no meio ambiente, com o objetivo de controlar o aparecimento e disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos (ESVAC, 2012). Na perspetiva da resolução do problema ambiental, a construção de Estações de Tratamento de Efluentes Suinícolas (ETES) poderá ser uma solução técnica sustentável para o tratamento de efluentes de todo o setor agropecuário. Resumidamente, as estratégias com maior impacto para a contenção das resistências aos antibióticos são as que se baseiam no seu uso racional e adequado, na prevenção e controlo da infeção e, no aperfeiçoamento de sistemas de vigilância já existentes, fornecendo desta forma, informação mais detalhada sobre o consumo de antibióticos por idade e sexo em humanos, e por espécie animal e tipo de produção praticada nas explorações em animais.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adhikari, L. (2010). High-level aminoglycoside resistance and reduced susceptibility to vancomycin in nosocomial *Enterococci*. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2, pp. 231-235.

Adelowo, O. O., Fagade, O. E. e Agerso, Y. (2014). Antibiotic resistance and resistance genes in *Escherichia coli* from poultry farms, southwest Nigeria. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8, pp. 1103-1112.

Agriculture and Horticulture Development Board (AHDB) (2015). Total EU Consumption. [Em linha]. Disponível em <<http://pork.ahdb.org.uk/prices-stats/consumption/total-eu-consumption/#>>. [Consultado em 30/06/2015].

Ahmed, A. M., Shimamoto, T. e Shimamoto, T. (2013). Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *International Journal of Medical Microbiology*, 303, pp. 475-483.

Antunes, P., et al. (2005). Dissemination of Sulfonamide Resistance Genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese Salmonella enterica Strains and Relation with Integrans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, pp. 836-839.

Baron, S. (1996). Medical Microbiology. *University of Texas Medical Branch at Galveston*, capítulo 5, 4.^a edição. [Em linha]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7908/>>. [Consultado em 27/09/015].

Bell, J. M., Turnidge, J. D. e Andersson, P. (2010). *aac(6')-Ib-cr* genotyping by simultaneous high-resolution melting analyses of an unlabeled probe and full-length amplicon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, pp. 1378-1380.

Bennett P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153, pp. S347-S357

Bidet, P., Metais, A., Mahjoub-Messai, F., *et al.* (2007). Detection and identification by PCR of a highly virulent phylogenetic subgroup among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* B2 strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, pp. 2373-2377.

Boerlin, P., Travis, R., Gyles, C. L., *et al.* (2005). Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, pp. 6753-6761.

Campos, J., Mourao, J., Pestana, N., *et al.* (2013). Microbiological quality of ready-to-eat salads: an underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. *International Journal of Food Microbiology*, 166, pp. 464-470.

Campos, J., Gil, J., Mourao, J., *et al.* (2015). Ready-to-eat street-vended food as a potential vehicle of bacterial pathogens and antimicrobial resistance: An exploratory study in Porto region, Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, 206, pp. 1-6.

Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., *et al.* (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, pp. 394-397.

Cavaco, L. M., Hasman, H., Xia, S., *et al.* (2009). *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, pp. 603-608.

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Clermont, O., Bonacorsi, S. e Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, pp. 4555-4558.

Clermont, O., Dhanji, H., Upton, M., *et al.* (2009). Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, pp. 274-277.

Conselho da União Europeia (CUE) (2006). Directiva 2006/88/CE do Conselho de 24 de Outubro de 2006 relativa aos requisitos zoossanitários aplicáveis aos animais de aquicultura e produtos derivados, assim como à prevenção e à luta contra certas doenças dos animais aquáticos. *Jornal Oficial da União Europeia*, Luxemburgo.

Conselho das Comunidades Europeias (CCE) (1990). Regulamento (CEE) n.º 2377/90 do Conselho de 26 de Junho de 1990. *Comissão Europeia*, União Europeia.

Davies, J. e Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74, pp. 417-433.

Department of Environment and Primary Industries (DEPI) (2015). Off-label use of registered veterinary chemical products. [Em linha]. Disponível em <<http://www.depi.vic.gov.au/agriculture-and-food/farm-management/chemical-use/veterinary-chemicals/off-label-use>>. [Consultado em 30/06/2015].

Direção-Geral da Saúde (DGS) (2014). Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos em números - 2014. [Em linha]. Disponível em <<file:///C:/Users/XANINHA/Downloads/i021011.pdf>>. [Consultado em 28/07/2015].

Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) (2015). Pré-misturas para alimento medicamentoso. *Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas*, Portugal.

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro (DRAPC) (2012). Diário da República, 1.^a série - N.º 166. [Em linha]. Disponível em <http://www.drapn.min-agricultura.pt/drapn/conteudos/fil_legisla/Portaria_259_2012.pdf>. [Consultado em 30/06/2015].

Doi, Y. e Arakawa, Y. (2007). 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*, 45, pp. 88-94.

Doumith, M., Day, M., Hope, R., et al. (2012). Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, pp. 3108-3110.

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2013). Geographical distribution of antimicrobial consumption. [Em linha]. Disponível em <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/esac-net-database/Pages/geo-distribution-consumption.aspx>. [Consultado em 30/06/2015].

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority) e EMA (European Medicines Agency) (2015). Scientific Report of ECDC, EFSA and EMA. [Em linha]. Disponível em <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/4006.pdf>. [Consultado em 28/05/2015].

EDIA, S. A. (Empresa de Desenvolvimento e Infra-Estruturas do Alqueva, S. A.) (2011). Estudo de Impacte Ambiental do Adutor de Vale do Gaio (Troço 4) e Central Hidroelétrica. [Em linha]. Disponível em <http://siaia.apambiente.pt/AIADOC/AIA2480/t01310_1_rnt201491618846.pdf>. [Consultado em 28/06/2015].

EFSA (European Food Safety Authority) e ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2015). Antimicrobial resistance interactive database (EARS-Net). [Em linha]. Disponível em

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

<http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx#sthash.3GrRwQHx.dpuf>. [**Consultado em** 30/06/2015].

EFSA (European Food Safety Authority) e ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2013). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. [**Em linha**]. **Disponível em** <<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-in-zoonotic-and-indicator-bacteria-summary-report-2011.pdf>>. [**Consultado em** 28/05/2015].

EFSA (European Food Safety and Authority) e ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2010). The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007. [**Em linha**]. **Disponível em** <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1309.pdf>>. [**Consultado em** 15/04/2015].

Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.-B., *et al.* (2004). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, 21, pp. 1085-1094.

ESVAC (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption) (2012). Sales of veterinary antimicrobial agents in 19 EU/EEA countries in 2012. *European Medicines Agency*, United Kingdom.

Eurostat (2014). Agricultural production - animals. [**Em linha**]. **Disponível em** <http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agricultural_production_-_animals>. [**Consultado em** 30/06/2015].

Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., *et al.* (2012). Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion

animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, pp. 646–655.

Gibbs, S. G., Green, C. F., Tarwater, P. M., *et al.* (2006). Isolation of antibiotic-resistant bacteria from the air plume downwind of a swine confined or concentrated animal feeding operation. *Environmental Health Perspectives*, 114, pp. 1032-1037.

Guerra, B., Junker, E., Miko, A., *et al.* (2004). Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microbial Drug Resistance*, 10, pp. 83-91.

Hansen, L. H., *et al.* (2005). The prevalence of the *oqxAB* multidrug efflux pump amongst olaquinox-resistant *Escherichia coli* in pigs. *Microbial Drug Resistance*, 11, Article 4.

Ibrahim, Bilal e Hamid. (2012). Increased multi-drug resistant *Escherichia coli* from hospitals in Khartoum state, Sudan. *African Health Sciences*. 12, pp. 368-375.

Jacoby, G., Strahilevitz, J. e Hooper, D. (2014). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiology Spectrum*. Article 2.

Jakobsen, L., Spangholm, D. J., Pedersen, K., *et al.* (2010). Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. *International Journal of Food Microbiology*, 142, pp. 264–272.

Johnson, J. R., Owens, K., Manges, A. R., *et al.* (2004). Rapid and specific detection of *Escherichia coli* clonal group A by gene-specific PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, pp. 2618-2622.

Karami, N., *et al.* (2006). Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* and Persistence in the Infantile Colonic Microbiota. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, pp. 156-161.

Karczmarczyk, M., Martins, M., Quinn, T., *et al.* (2011). Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, pp. 7113-7120.

Kim, H. B., Wang, M., Park, C. H., *et al.* (2009). *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, pp. 3582-3584.

Kozak, G. K., Boerlin, P., Janecko, N., *et al.* (2009a). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, pp. 559-566.

Kozak, G. K., *et al.* (2009b). Distribution of sulfonamide resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from swine and chickens at abattoirs in Ontario and Québec, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, pp. 5999-6001.

Kruse, H. e Sorum H. (1994). Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, pp 4015-4021.

Lapierre, L., Cornejo, J., Borie, C., *et al.* (2008). Genetic characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and class 2 integrons in commensal strains of *Escherichia coli* isolated from poultry and swine. *Microbial Drug Resistance*, 14, pp. 265-272.

Looft, T., Allen, H. K., Cantarel, B. L., *et al.* (2014). Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *The ISME journal*, 8, pp. 1566-1576.

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Machado, A. e Bordalo, A. A. (2014). Prevalence of antibiotic resistance in bacteria isolated from drinking well water available in Guinea-Bissau (West Africa). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106, pp. 188-194.

Marshall, B. M. e Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24, pp. 718-733.

Matsumura, Y., Yamamoto, M., Nagao, M., *et al.* (2012). Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, pp. 2612-2620.

Minarini, L. A., Poirel, L., Cattoir, V., *et al.* (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, pp. 474-478.

Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas (DRAPN) (2009). *Decreto-Lei n.º 314/2009*. Diário da República, 1.ª série - N.º 209 - 28 de Outubro de 2009.

Ministério da Saúde. (2011). *Lei n.º 34/2011 de 17 de Junho*. Diário da República, 1.ª série, n.º 116.

Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J.L, *et al.* (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28, pp. 648-656

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2015). BLAST Assembled Genomes. **[Em linha]. Disponível em** <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. **[Consultado em 10/04/2015].**

Nhung, N. T., Cuong, N. V., Campbell, J., *et al.* (2015). High levels of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolates from livestock farms and synanthropic rats and shrews in the Mekong Delta of Vietnam. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, pp. 812-820.

Nogueira, A., Dias, A., Silva, R., *et al.* (2008). Contribuição das suiniculturas na selecção e disseminação de *Enterococcus* spp. resistentes às tetraciclinas. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, 5, pp. 164-173.

Novais, C., Freitas, A. R., Silveira, E., *et al.* (2013). Spread of multidrug-resistant *Enterococcus* to animals and humans: an underestimated role for the pig farm environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68, pp. 2746-2754.

Novo, A., *et al.* (2013). Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Research*, 47, pp. 1875-1887.

Parlamento Europeu (PE) e Conselho da União Europeia (CUE) (2003). Regulamento (CE) N.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2003 relativo aos aditivos destinados à alimentação animal. *Jornal Oficial da União Europeia*, Bruxelas.

Perreten, V. e Boerlin, P. (2003). A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, pp. 1169-1172.

Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., *et al.* (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *American Society for Microbiology*, 67, pp. 546-553.

Ponte, H. (2013). Plano de ação nacional para a redução do uso de antibióticos nos animais. *Direção Geral de Alimentação e Veterinária*, Lisboa.

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Robicsek, A., *et al.* (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12, pp. 83 - 88

Sousa, C., Novais, A., Magalhaes, A., *et al.* (2013). Diverse high-risk B2 and D *Escherichia coli* clones depicted by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Scientific Reports*, 3, Artigo 3278.

Sousa, J. (2006). Aminoglicosídeos-Aminociclitolis. *In*: Sousa, J. (Ed). *Manual de antibióticos antibacterianos*. 2ª edição. Fundação Fernando Pessoa, Edições fernando pessoa, pp. 323-349.

Szmolka, A. e Nagy, B. (2013). Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Frontiers in Microbiology*, 4, Article 258.

Tadesse, D. A., Zhao, S., Tong, E., *et al.* (2012). Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. *Emerging Infectious Diseases*, 18, pp. 741-749.

USDA (United States Department of Agriculture) (2015). Safe Minimum Internal Temperature Chart. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/safe-food-handling/safe-minimum-internal-temperature-chart>>. **[Consultado em 30/06/2015]**.

Veldman, K., Cavaco, L. M., Mevius, D., *et al.* (2011). International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, pp. 1278-1286.

Wang, M., Guo, Q., Xu, X., *et al.* (2009). New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, pp. 1892-1897.

Caraterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Wu, S.; Dalsgaard, A.; Hammerum, A. M., *et al.* (2010). Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52, Article 47.

Yanga, J., *et al.* (2011). Diverse prevalence of 16S rRNA methylase genes *armA* and *rmtB* amongst clinical multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, pp. 348-351.