

Andreia de Fátima Silva Vaz

Caracterização molecular de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs) provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Universidade Fernando Pessoa

Porto

2015

Caracterização molecular de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Andreia de Fátima Silva Vaz

Caracterização molecular de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs) provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Universidade Fernando Pessoa

Porto

2015

Caracterização molecular de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Andreia de Fátima Silva Vaz

Caracterização molecular de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs) provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

(Andreia de Fátima Silva Vaz)

Orientador:

Professora Doutora Elisabete Machado

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Caracterização molecular de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

O presente trabalho resultou de uma colaboração da Universidade Fernando Pessoa com o REQUIMTE (Laboratório Associado) / Grupo de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Sumário

A família *Enterobacteriaceae* é uma família vasta, constituída por bacilos de Gram negativo ubiqüitários. Apesar de pertencerem à flora comensal do homem e outros animais, estas bactérias têm também capacidade de se tornarem patogénicas.

A utilização de antibióticos nos animais de consumo contribuiu para o aumento da resistência a estas moléculas na família *Enterobacteriaceae*, nomeadamente a resistência a beta-lactâmicos por produção de beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs), existindo estudos recentes que sugerem que os animais constituem um reservatório de bactérias produtoras de ESBLs.

A produção de ESBLs nestas bactérias diminui e condiciona a eficácia clínica não apenas dos antibióticos beta-lactâmicos, mas também de outras classes de antibióticos, devido ao facto dos genes de resistência se encontrarem no mesmo elemento genético móvel que depois se pode disseminar entre espécies bacterianas e nichos ecológicos.

Em Portugal, a presença de ESBLs em *Enterobacteriaceae* provenientes de suínos não é extensivamente estudada. Por outro lado, alguns estudos revelaram que há uma potencial transmissão de genes que codificam para ESBLs e outros mecanismos de resistência para os humanos através da cadeia alimentar. De facto, o mesmo tipo de ESBLs já foram detectadas em *Enterobacteriaceae* de outros nichos ecológicos, quer em Portugal, quer noutros países, parecendo existir estruturas genéticas (por exemplo, plasmídeos) e/ou clones bacterianos responsáveis pela disseminação mundial de ESBLs.

Assim, com este trabalho, pretendeu-se investigar a diversidade de genes que codificam para ESBLs em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suínos e ambiente de suiniculturas extensiva e intensiva em Portugal. Estes isolados foram recolhidos durante o período de 2006-2007 e procedeu-se inicialmente ao teste do DDST, seguido de extracção de DNA dos isolados DDST positivos, reacção de PCR, sequenciação de genes e avaliação da susceptibilidade a antibióticos não beta-lactâmicos.

Tal como se verifica na Europa, observou-se uma prevalência de ESBLs do tipo CTX-M-32 nas suiniculturas intensivas. CTX-M-32 é um dos tipos de ESBL mais epidémicos em locais de produção animal.

Os isolados obtidos da suinicultura intensiva analisada apresentaram ainda um perfil de multiresistência, nomeadamente abrangendo antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos, sulfonamidas e tetraciclina.

De forma a controlar esta disseminação mundial e atenuar o comprometimento da eficácia terapêutica dos antibióticos quer em humanos, quer em animais, é necessário sensibilizar e alertar para um uso adequado de antibióticos e estabelecer limites na sua utilização por parte de veterinários.

Abstract

Enterobacteriaceae is a wide family comprising Gram-negative bacilli. Most *Enterobacteriaceae* are widespread in the environment and are also present in the intestinal flora of humans and animals, although they could become pathogenic.

For several years, antibiotics have been used both for treating infections in animals and for growth promotion. This led to a worldwide emergence and dissemination of bacteria harbouring resistance genes, including genes encoding extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). Many studies have suggested that farming animals constitute reservoirs for these agents and ESBL transmission could occur through the food chain.

ESBL-producing *Enterobacteriaceae* put at risk clinical therapy efficacy by having different antibiotic resistance profiles and not being exclusively resistant to beta-lactam antibiotics. This fact is a consequence of these resistance genes that harbor the same genetic mobile elements, allowing it to disseminate through other bacteria species and environment.

In Portugal, there is scarce epidemic data about ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from swine and piggery environment, although some researchers have considered there is a potential transmission through the food chain due to the remarkable ability that *Enterobacteriaceae* family has to spread and exchange multi-resistance genes. These facts suggest that this worldwide dissemination is mediated by genetic elements like plasmids.

The aim of this work was to increase the knowledge about the epidemiology of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* among different Portuguese piggeries. The samples were collected in 2006-2007, followed by a DDST test, DNA extraction for DDST positive isolates, PCR reaction, sequencing and evaluation of non-beta-lactam susceptibility profiles.

As seen on Europe, there is a prevalence of the epidemic CTX-M-32 ESBL-type among farming animals. The isolates showed a co-resistance antibiotics profile, mostly to sulfonamides, tetracyclines and aminoglycosides.

Therefore, it is urgent to control this global dissemination of antibiotic resistance as it compromises antibiotic therapy success both in humans and animals. It is important to alert and apply antibiotic restrictions to the Veterinary authorities.

Agradecimentos

À Professora Doutora Elisabete Machado, orientadora deste trabalho. Agradeço-lhe muito a aceitação, dedicação, amizade, competência, exigência, apoio científico e compreensão, tendo sido essenciais para a concretização deste trabalho.

Ao Técnico Ricardo Silva e Sr. Vilarinho agradeço a constante disponibilidade, vontade em prestar auxílio no laboratório e o carinho e preocupação que sempre demonstraram.

Aos meus restantes Professores que contribuíram para a minha formação académica e pessoal ao longo do curso.

Aos meus colegas e amigos que acompanharam o meu percurso académico, pela amizade, apoio e incentivos constantes. Um obrigado especial à Ana Margarida Rocha.

Aos meus queridos Pais, pelo amor, carinho, apoio, incentivos que me deram durante toda a minha vida e por terem tornado possível este percurso. Apesar da distância física, estiveram sempre presentes na minha mente e coração. Os meus pais são a razão de tudo o que sou e o meu amor por eles é incondicional.

Gostaria de dedicar este trabalho ao meu avô que vou recordar sempre com muitas saudades.

Muito obrigada a todos.

Índice

Índice de Figuras	11
Índice de Tabelas.....	12
Abreviaturas.....	13
I. Introdução.....	14
1.1.Família <i>Enterobacteriaceae</i>	14
1.2. Antibióticos – Emergência das resistências.....	15
1.3. Mecanismos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em <i>Enterobacteriaceae</i> ...	17
1.3.1.Beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs).....	20
1.3.1.1. Classificação das ESBLs.....	21
1.3.2. Outras beta-lactamases descritas em <i>Enterobacteriaceae</i>	22
1.4. Epidemiologia global das ESBLs	23
1.4.1. Disseminação geográfica	24
1.4.2. Mecanismos de disseminação	27
1.5. Epidemiologia de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs em animais de consumo humano	30
II. Objectivos	37
III. Material e Métodos	38
1. Isolados bacterianos.....	38
2. Detecção de isolados produtores de ESBLs	39
3. Detecção e caracterização de genes que codificam ESBLs.....	39
3.1. <i>Extracção do DNA bacteriano</i>	39
3.2. <i>Amplificação dos ácidos nucleicos por PCR – Polymerase Chain Reaction</i>	39
3.3. <i>Electroforese</i>	40
3.4. <i>Purificação dos produtos amplificados</i>	40
3.5. <i>Sequenciação</i>	40
4. Avaliação da susceptibilidade a antibióticos	41
IV. Resultados e Discussão	43
Ocorrência de ESBLs em suiniculturas de produção intensiva e extensiva.....	43
Diversidade das ESBLs detectadas	43

Caracterização molecular de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Resistência a antibióticos não beta-lactâmicos entre os isolados de <i>Enterobacteriaceae</i> produtores de ESBLs.....	46
V. Conclusão	48
VI. Bibliografia	50

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismos de acção dos antibióticos e mecanismos de resistência aos antibióticos	16
Figura 2. Representação da inactivação de uma cefalosporina de largo espectro por hidrólise do anel beta-lactâmico, desencadeada pela acção de ESBLs (beta-lactamases de largo espectro)	20
Figura 3. Prevalência mundial de humanos da comunidade portadores de bactérias produtoras de ESBLs.....	26
Figura 4. Processo de conjugação bacteriana.....	28
Figura 5. Diferentes vias de transmissão de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs e/ou genes de resistência entre os diferentes nichos.....	33

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação das beta-lactamases	18
Tabela 2. Condições de PCR usadas neste trabalho	42
Tabela 3. Caracterização dos isolados produtores de ESBLs identificados neste trabalho.....	45

Abreviaturas

AmpC – Ampicilinase C

bla – Gene que codifica para beta-lactamases

CLSI – Clinical and laboratory standards institute

CTX-M – Cefotaximase

DDST – Double disc sinergy test

ESBLs – Extended-spectrum beta-lactamases

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MATE - *Multidrug and toxic compound extrusion*

MFS - *Major facitator superfamily*

NDM – New Delhi metallo-beta-lactamase

OGM – Organismo geneticamente modificado

OXA- Oxacillinase type beta-lactamase

PBP – Penicillin binding protein

PCR – Polymerase chain reaction

RND - *Ressistance nodulation-division*

r.p.m – Rotações por minuto

SHV – Sulfhydryl variable (tipo de beta-lactamase)

SMR - *Small multidrug resistance*

TEM – Tipo de beta-lactamase

UV – Ultra-violeta

VEB – Vietnamese extended-spectrum beta-lactamase

VIM – Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase

V - Volt

I. Introdução

1.1. Família *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* é a mais vasta e heterogénea família de bacilos de Gram-negativo, tendo uma distribuição ubiqüitária. Algumas espécies desta família apresentam ainda relevância clínica, sendo agentes de diferentes infecções. Os membros desta família medem em média 1-5µm de comprimento, são anaeróbios facultativos e fermentadores de glucose. No entanto, podem fermentar outros açúcares e são oxidase negativo (*Plesiomonas shigelloides* constitui uma excepção, sendo oxidase positivo) (Murray *et al.*, 2009).

Algumas espécies desta família podem ser comensais em humanos e animais e, em certas situações, tornar-se patogénicos e causar infecções, como é o caso de *Escherichia coli*. Outros são patogénicos por excelência, como *Salmonella* sp., *Shigella* sp. e *Yersinia* sp. Os membros desta família com maior importância clínica para o homem pertencem aos géneros *Shigella* sp., *Escherichia* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Serratia* sp., *Enterobacter* sp., *Yersinia* sp., *Morganella* sp. e *Citrobacter* sp. (Murray *et al.*, 2009).

Enterobacteriaceae possuem características que lhes conferem uma resistência natural a certos os antibióticos e têm adicionalmente capacidade para adquirir genes de resistência provenientes de bactérias da mesma espécie e/ou de espécies ou géneros diferentes. Isto dificulta e condiciona a escolha dos antibióticos a usar e pode gerar complicações, nomeadamente o insucesso da terapêutica (Livermore, 2003).

Tendo em conta as características anteriormente descritas, *Enterobacteriaceae* tornaram-se patogénicos revelantes e são sobretudo responsáveis pela maior parte das infecções nosocomiais (septicémias, infecções urinárias, infecções do tracto respiratório, do tracto gastrointestinal, entre outras). A existência de factores de virulência (cápsula, toxinas, capacidade de sequestro de factores de crescimento, factores de aderência, entre outros), contribui também para a sua sobrevivência em condições ambientais adversas e persistência em instalações hospitalares, laboratórios,

locais de produção animal, locais de abate de animais e processamento de carne, entre outros (Murray *et al.*, 2009).

A elevada prevalência de *Enterobacteriaceae* resistentes a antibióticos a que se tem assistido deve-se sobretudo ao aumento da pressão selectiva exercida pelos antibióticos mais usados na prática clínica, tais como os beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems) e fluoroquinolonas (Cantón *et al.*, 2008; Van de Sande-Bruinsma *et al.*, 2008).

No entanto, outros factores têm contribuído para o aumento deste problema. Devido ao uso indiscriminado de antibióticos, quer em medicina humana, quer em medicina veterinária, agricultura e aquacultura, criaram-se condições favoráveis à emergência e disseminação de *Enterobacteriaceae* multirresistentes. Esta situação tem despoletado o aparecimento de espécies resistentes aos agentes antimicrobianos actualmente disponíveis, comprometendo a eficácia do tratamento de infecções nosocomiais ou de infecções adquiridas na comunidade. Desta forma, é de extrema importância uma gestão racional e maior controlo no uso de antibióticos de forma a minimizar a disseminação mundial de estirpes resistentes.

1.2. Antibióticos – Emergência das resistências

A descoberta de antibióticos foi um dos acontecimentos que mais revolucionou a história da medicina.

Em 1928, Alexander Fleming descobriu a penicilina G, o primeiro antibiótico beta-lactâmico vastamente usado durante a segunda Guerra Mundial. Rapidamente emergiram bactérias produtoras de enzimas (beta-lactamases) com capacidade de hidrolisar o anel beta-lactâmico destes antibióticos, inactivando-o, conduzindo assim à perda da actividade bacteriolítica a que se destinavam (Figura 1). De forma a melhorar a eficácia terapêutica, solucionar o problema da emergência das beta-lactamases e aumentar a estabilidade em meio ácido, foram sintetizados e introduzidos na prática clínica novos antibióticos beta-lactâmicos com um espectro de acção mais alargado. No entanto, à medida que estes foram introduzidos na prática clínica, surgiram novas beta-lactamases (Sousa, 2006).

Caracterização molecular de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

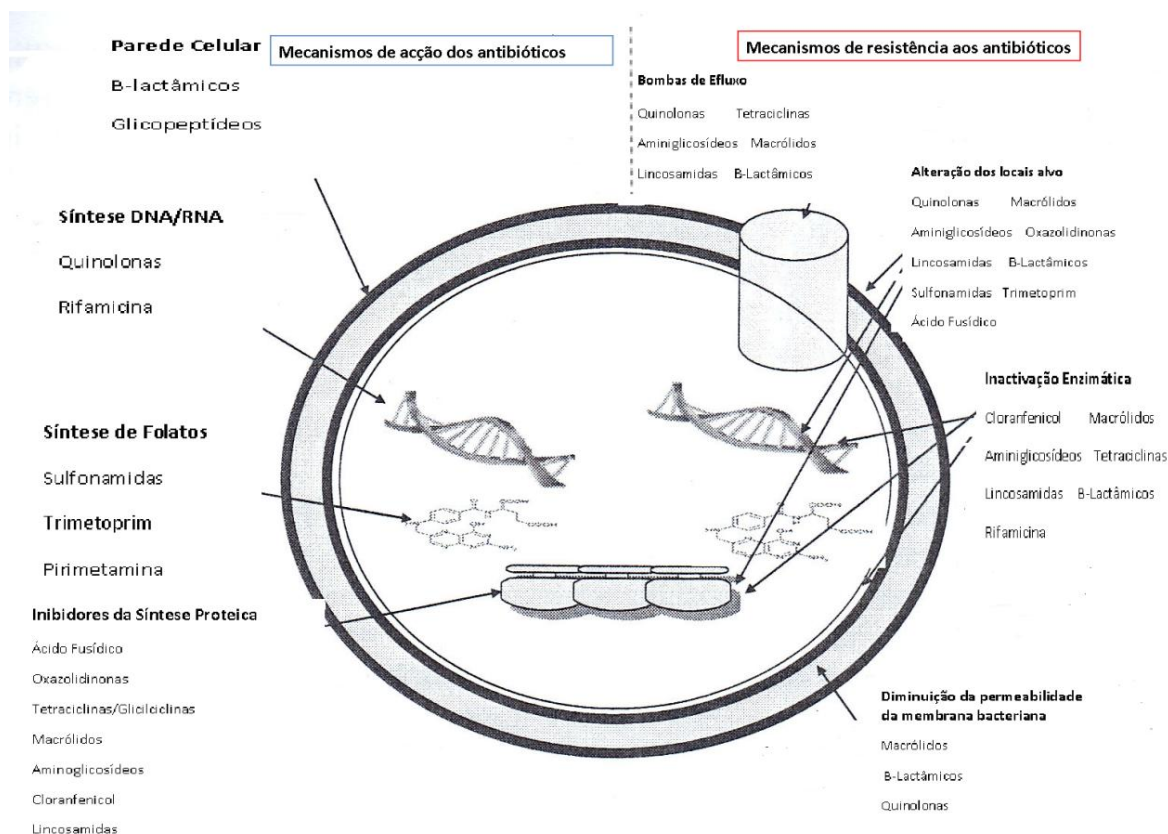


Figura 1. Mecanismos de acção dos antibióticos e mecanismos de resistência aos antibióticos (adaptado de Tham, 2012).

Surgiram também novos antibióticos, de outras classes terapêuticas e com um espectro de acção alargado. No entanto, também neste caso, à medida que foram surgindo novas moléculas, também foram sendo descritas bactérias resistentes, devido sobretudo ao seu uso abusivo e indiscriminado, quer em humanos, quer em animais de consumo como promotores de crescimento (Sousa, 2006).

1.3. Mecanismos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em *Enterobacteriaceae*

Os antibióticos beta-lactâmicos são uma das classes de antibióticos mais utilizados na prática clínica devido ao seu largo espectro de acção e menores efeitos adversos.

No entanto, a resistência bacteriana a este grupo de antibióticos tem sido mundialmente descrita nas últimas décadas devido à sua gravidade. Isto é uma consequência, como já foi referido anteriormente, da sua versatilidade terapêutica (Sousa, 2006).

Diferentes mecanismos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos têm sido descritos. Um deles inclui a modificação do alvo, as *Penicillin Binding Proteins (PBPs)*, que são transpeptidases e carboxipeptidases essenciais à biossíntese do peptidoglicano (Figura 1). Há mutações nas PBPs que originam resistência aos antibióticos beta-lactâmicos (Poole, 2004; Sousa, 2006).

Existem espécies na família *Enterobacteriaceae* que possuem um outro mecanismo de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos: bombas de efluxo responsáveis pela expulsão do antibiótico do citoplasma para o meio extracelular (Sousa, 2006).

Algumas *Enterobacteriaceae* desenvolveram outras estratégias que lhes possibilitaram uma redução de susceptibilidade aos antibióticos beta-lactâmicos, particularmente alterações na permeabilidade da membrana externa por modificação na configuração dos canais de porina (Sousa, 2006).

Contudo, a produção de enzimas capazes de hidrolisar antibióticos beta-lactâmicos (beta-lactamases) constitui o principal mecanismo de resistência a estes antimicrobianos em *Enterobacteriaceae* (Sousa, 2006).

Desde que as beta-lactamases começaram a ser estudadas, houve uma necessidade de as diferenciar e agrupar de forma a facilitar a sua compreensão e escolha de alternativas terapêuticas dentro do grupo de antibióticos beta-lactâmicos. Assim, diferentes famílias de beta-lactamases têm sido descritas e diferenciadas em grupos consoante a sua sequência de aminoácidos, substratos preferenciais e perfil inibitório (Bradford, 2001).

Sawai *et al.* (1968) propôs que se começassem a distinguir as penicilinas (enzimas com actividade hidrolítica sobre a penicilina) das cefalosporinas (enzimas que

hidrolisam as cefalosporinas). Com o aparecimento de novas beta-lactamases e sua subsequente caracterização, criaram-se novos esquemas de classificação que permitiram não só uma classificação mais precisa, mas também relacionar o seu perfil hidrolítico e diferente estrutura molecular. Richmond *et al.* (1973), Sykes *et al.* (1976), Ambler (1980), Mitsuhashi *et al.* (1981) e Bush (1989) desenvolveram estes novos esquemas de classificação que ao longo do tempo se foram reorganizando consoante foram sendo descobertas novas beta-lactamases.

A classificação molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros são as classificações mais usadas (Rawat, 2010). Os grupos criados dentro de cada um destes modelos de classificação das beta-lactamases, assim como a relação entre eles e alguns exemplos de enzimas, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação das beta-lactamases (adaptado de Haeggman, 2010).

Classe Molecular de Ambler	Grupo Funcional de Bush-Jacoby	Exemplos de Beta-Lactamase(s)
A	2b	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15
	2br	TEM-30, SHV-10
	2ber	TEM-50
B	3a	IMP-1, VIM-1
C	1	AmpC cromossômica de <i>E. coli</i>
D	2d	OXA-1
	2de	OXA-11
	2df	OXA-23

A classificação molecular de Ambler agrupa as beta-lactamases em quatro grupos de acordo com a sua sequência de aminoácidos: A, B, C e D. As beta-lactamases pertencentes aos grupos A, C e D têm em comum a presença de serina no local activo, enquanto as beta-lactamases do grupo B contêm zinco no seu local activo e são por isso designadas de metalo-beta-lactamases (Bonnet, 2004).

O esquema de classificação funcional de Bush-Jacoby classifica as beta-lactamases baseando-se nas semelhanças funcionais (perfil de inibição e substrato) das enzimas pertencentes a cada grupo da classificação de Ambler. Desta forma, as beta-lactamases são divididas em quatro grupos principais e vários subgrupos (Bush *et al.*, 2010).

O grupo 1 inclui os bacilos de Gram negativo produtores de cefalosporinases que inactivam todos os beta-lactâmicos, com a excepção dos carbapenemos. Estas cefalosporinases não são inactivadas pelo ácido clavulânico e, em termos moleculares, pertencem ao grupo C de Ambler (contêm serina no local activo) (Bush *et al.*, 2010).

O grupo 2 agrupa as diferentes beta-lactamases pertencentes aos grupos A e D de Ambler, maioritariamente inibidas pelo ácido clavulânico embora existam algumas excepções, como por exemplo, as enzimas CMT (classe A e grupo 2) e TEM-30. Tendo em conta que estas beta-lactamases têm diferentes substratos (por exemplo, cefalosporinas, carbapenemos, entre outros), foram agrupadas em subgrupos (Bush *et al.*, 2010). As beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs) (ver secção 1.3.1) são incluídas neste grupo, dado serem enzimas pertencentes à classe A de Ambler inibidas por inibidores de beta-lactamases e com capacidade hidrolítica sobre diferentes antibióticos beta-lactâmicos (Paterson, 2005).

O grupo 3 contempla as metalo-enzimas (contêm zinco no local activo) que hidrolisam carbapenemos, comumente designadas de metalo-carbapenemases para as distinguir das carbapenemases incluídas noutros grupos (serina-carbapenemases). Estas enzimas fazem parte do grupo B de Ambler e não têm capacidade hidrolítica sobre os monobactamos (Bush *et al.*, 2010). Ao contrário de outras carbapenemases, as metalo-carbapenemases não são inactivadas pelo ácido clavulânico, tazobactamo, ácido borónico e/ou avibactamo, sendo apenas inibidas por EDTA e DPA (ácido dipicolínico) (Nordmann *et al.*, 2012; Brolund, 2013).

O grupo 4 inclui as penicilinases que não são inibidas pelo ácido clavulânico (Bush *et al.*, 2010).

1.3.1. Beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs)

As beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs) são enzimas capazes de hidrolisar um largo espectro de antibióticos beta-lactâmicos, nomeadamente penicilinas, cefalosporinas (incluindo as de largo espectro) e monobactams (só não têm poder hidrolítico sobre as cefamicinas e carbapenemos). Têm ainda como característica serem enzimas inibidas por inibidores de beta-lactamases, como o ácido clavulânico.

Actualmente, as ESBLs são as beta-lactamases mais frequentemente encontradas entre *Enterobacteriaceae* (Gupta, 2007).

Poucos anos após a introdução das cefalosporinas de largo espectro no mercado, surgiu a primeira ESBL, designada de SHV-2, a qual se verificou que era codificada por um gene localizado num plasmídeo (Knothe *et al.*, 1983).

No final do ano 1980, em hospitais Franceses, identificaram-se em diferentes isolados de *Klebsiella* sp. vários genes TEM e SHV contendo mutações relativamente aos genes codificando para TEM-1, TEM-2 ou SHV-1, as quais originavam enzimas TEM e SHV com capacidade de hidrólise sobre a ceftazidima. Esta descoberta criou a necessidade de distinguir beta-lactamases de beta-lactamases de largo espectro. Assim, em 1989, Philippon definiu que para serem consideradas beta-lactamases de largo espectro, deveriam possuir as seguintes características: serem transferíveis, terem capacidade hidrolítica sobre as penicilinas e cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração (Figura 2), e serem *in vitro* inativadas por inibidores de beta-lactamases (por exemplo, ácido clavulânico) (Tielman, 2013).

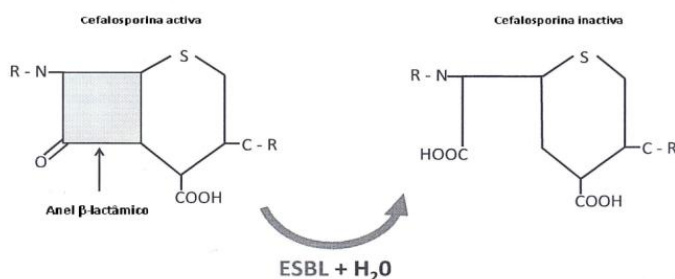


Figura 2. Representação da inativação de uma cefalosporina de largo espectro por hidrólise do anel beta-lactâmico, desencadeada pela acção de ESBLs (beta-lactamases de largo espectro) (adaptado de Tielman, 2013).

A incidência de ESBLs tem vindo a aumentar em todo o mundo, sendo principalmente descritas em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (Bradford, 2001; Livermore *et al.*, 2007; Thenmozhi, 2014). Assim, é de extrema importância monitorizar, caracterizar e reportar *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs, bem como os seus perfis de resistência aos antibióticos, de modo a implementar estratégias para minimizar a sua disseminação e salvaguardar as moléculas de antibióticos mais recentes e eficazes (Cornaglia *et al.*, 2008).

1.3.1.1. Classificação das ESBLs

As ESBLs são classificadas consoante a sua sequência em aminoácidos e capacidade hidrolítica sobre antibióticos beta-lactâmicos. Existe uma grande diversidade de ESBLs e a descoberta de novas ESBLs é muito frequente. Os tipos de ESBLs mais comuns são enzimas CTX-M, SHV e TEM, embora existam outras menos frequentes em *Enterobacteriaceae*, como por exemplo as do tipo PER, VEB, TLA, GES, BES e SFO (Sousa, 2006; Coque, 2008; Libisch *et al.*, 2008; Zong *et al.*, 2009).

TEM-1, TEM-2 e SHV-1 foram as primeiras enzimas do tipo TEM e SHV a serem descritas. No entanto, e como já foi referido anteriormente, não possuem actividade hidrolítica sobre cefalosporinas de largo espectro (Livermore, 1995). A partir destas enzimas, por mutações pontuais que levaram a uma alteração no centro activo e, conseqüentemente, ao aumento da capacidade hidrolítica e espectro de acção, surgiram as ESBLs (Paterson *et al.*, 2005).

As ESBLs do tipo TEM adquiriram esta designação devido ao utente onde foram inicialmente detectadas (TEMoniera). Estas enzimas foram inicialmente identificadas em *E. coli* (Paterson *et al.*, 2005). As ESBLs do tipo SHV-2 e SHV-5 são predominantes em *Klebsiella pneumoniae* de origem hospitalar, apresentando uma prevalência de cerca de 90%. SHV-12 é frequente em animais de consumo humano na Europa (EFSA, 2011). Dados referentes a Agosto de 2014 (<http://www.lahey.org.studies/>) indicam que actualmente estão descritas 219 variantes de enzimas do tipo TEM e 188 do tipo SHV. Convém referir no entanto que nem todas estas variantes descritas são ESBLs. Por exemplo, algumas enzimas TEM não podem ser consideradas ESBLs devido à escassez ou muito reduzida capacidade de hidrólise sobre as cefalosporinas de largo espectro (CMT – *Complex Mutant TEM*) e resistência à

acção dos inibidores de beta-lactamases (IRT – *Inhibitor Resistant TEM*) (Robin *et al.*, 2006).

Tem-se verificado uma emergência e disseminação drásticas e preocupantes de enzimas CTX-M por todo o mundo, sendo actualmente consideradas as ESBLs mais frequentes (Ogbolu, 2013). As enzimas CTX-M podem ser classificadas em cinco grupos de acordo com a sua sequência de aminoácidos, designados de CTX-M-1 (CTX-M-15 é a mais disseminada mundialmente), CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (cada grupo inclui várias variantes destas enzimas) (Lartigue *et al.*, 2007). Actualmente existem 159 variantes de enzimas CTX-M (Agosto de 2014) (<http://www.lahey.org.studies/>).

1.3.2. Outras beta-lactamases descritas em *Enterobacteriaceae*

Existem outras beta-lactamases produzidas por *Enterobacteriaceae* também com relevância clínica, nomeadamente as oxacilinas (grupo D de Ambler), as AmpC cromossómicas e/ou plasmídicas (grupo C de Ambler) e as carbapenemases (grupos B, A e D de Ambler) (Thomson, 2010).

As oxacilinas (enzimas do tipo OXA) são assim designadas por apresentarem uma grande actividade hidrolítica sobre a oxacilina e cloxacilina (Sousa, 2006). A maioria das beta-lactamases do tipo OXA não tem um perfil de hidrólise extenso sobre cefalosporinas de largo espectro e é inibida parcialmente pelo ácido clavulânico, motivos pelos quais não são habitualmente consideradas ESBLs (Paterson *et al.*, 2005). OXA-20, OXA-22, OXA-24, OXA-25, OXA-26 e OXA-27 são alguns exemplos de enzimas do tipo OXA que não são consideradas ESBLs (Siu *et al.*, 2000).

As beta-lactamases AmpC eram tradicionalmente consideradas enzimas cromossómicas, embora tenham sido descritas AmpCs plasmídicas que têm vindo a ser cada vez mais frequentemente descritas em *Enterobacteriaceae* (principalmente em *E. coli* e *K. pneumoniae*) (Philippon *et al.*, 2002). A mobilização de genes *bla*_{AmpC} do cromossoma para plasmídeos terá sido feita por sequências de inserção (Jacoby, 2009). Actualmente, as AmpC plasmídicas mais frequentemente descritas em *Enterobacteriaceae* são do tipo CMY e DHA (Pfeifer *et al.*, 2010).

As carbapenemases têm um perfil hidrolítico extenso sobre carbapenemos, cefalosporinas, penicilinas e em alguns casos sobre monobactamos. São consideradas uma ameaça maior que as ESBLs devido à sua actual emergência, disseminação e, principalmente, devido ao facto de comprometerem o sucesso terapêutico de praticamente todos os antibióticos beta-lactâmicos. *E. coli* e *K. pneumoniae* são as espécies mais frequentemente descritas como produtoras de carbapenemases. As carbapenemases ImiPenem (IMP) são metalo-carbapenemases que hidrolisam os carbapenemos, tendo sido inicialmente detectadas em *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa* no Japão (início 1990). Em 1996, nos Estados Unidos, descobriram-se carbapenemases produzidas por *Klebsiella pneumoniae* (designadas de KPCs) e, mais tarde em Verona (1999), descobriu-se um integrão contendo um gene que codificava para uma metalo-carbapenemase que foi designada de VIM (*Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*). A carbapenemase que actualmente tem vindo a emergir de forma preocupante, foi inicialmente detectada (2008) em um paciente Sueco que tinha viajado para a Índia, tendo sido designada como Nova Deli metalo-beta-lactamase (NDM-1) (Lauretti *et al.*, 1999; Yigit *et al.*, 2001; Yong *et al.*, 2009; Berrazeg *et al.*, 2014; Dortet, 2014).

A prevalência dos diferentes tipos de carbapenemases varia de acordo com a região geográfica. O tipo NDM é mais frequente no Médio Oriente e Ásia, enquanto KPC é predominante na Europa. Relativamente ao continente Europeu, *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases são predominantes e endémicas no sul da Europa e menos frequentes nos países Nórdicos (Cantón *et al.*, 2012).

1.4. Epidemiologia global das ESBLs

A epidemiologia global das ESBLs é complexa. É necessário ter em consideração a área geográfica, o nicho (comunidade, hospital), o tipo de hospedeiro humano (pessoa saudável, paciente), reservatórios não humanos (ambiente, como por exemplo solos ou águas; animais, como por exemplo animais selvagens, aves migratórias, animais de consumo humano e de companhia), o tipo de transmissão (indirecto, por exemplo

através da cadeia alimentar; directo, por exemplo, entre pessoas) e o envolvimento de elementos genéticos móveis (mais frequentemente plasmídeos) e/ou clones bacterianos (; Mesa, 2006; Oteo *et al.*, 2006).

1.4.1. Disseminação geográfica

Tendo em conta a actual disseminação global das ESBLs, é importante recolher dados epidemiológicos que permitam monitorizar a sua ocorrência nas áreas geográficas mais epidémicas, de forma a implementar e acompanhar o resultado de estratégias para o seu controlo. Desta forma, a informação que se segue remete para as áreas geográficas onde se verifica uma maior ocorrência de ESBLs.

Europa

Novas enzimas TEM e SHV continuam a emergir na Europa e clones epidémicos específicos têm sido reportados como sendo importantes na sua disseminação, embora os dados epidemiológicos referentes aos diferentes países Europeus variem bastante.

No que diz respeito às enzimas CTX-M, os dados disponíveis revelam que há uma distribuição geográfica específica para cada tipo de enzima. Assim, CTX-M-9 e CTX-M-14 são mais frequentes em Espanha, enquanto CTX-M-1 é mais comum na Itália (Pitout, 2010; Lascols *et al.*, 2012). Na Suécia, Finlândia e Noruega verifica-se que há uma predominância de enzimas CTX-M-14 e CTX-M-15 (Forssten *et al.*, 2010; Brolund *et al.*, 2014).

Em Portugal, as enzimas TEM eram as mais prevalentes. No entanto, nos últimos dez anos, a CTX-M-15 tem vindo a disseminar-se em larga escala no país (Fernandes *et al.*, 2014).

África

Em África, há uma prevalência de ESBLs de classe A e D. CTX-M-15 é a enzima mais reportada, embora as AmpCs plasmídicas e carbapenemases tenham sido já também

descritas no continente Africano. Comparativamente com outros locais geográficos, em África não há muitos dados epidemiológicos sobre ESBLs, o que está relacionado com a escassez de investigações em determinadas áreas do continente (Storberg, 2014).

Ásia

A Ásia é o continente onde se tem verificado um aumento constante na prevalência de ESBLs. Condições de higiene precárias, água potável de má qualidade, deficiente controlo na prescrição e venda de antibióticos, são os factores mais relevantes para a emergência e disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs a que se tem assistido no continente Asiático (Tham, 2012).

Existem, no entanto, diferenças epidemiológicas no continente Asiático. No Japão, considerando as ESBLs do tipo CTX-M, verifica-se um predomínio da enzima CTX-M-9, enquanto na China a CTX-M-14 é mais frequente. Na Índia, a CTX-M-15 é a ESBL mais frequentemente identificada em *Enterobacteriaceae* (Muzaheed, *et al.*, 2008; Chong *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2014).

Na Tailândia o problema está a atingir dimensões ainda mais assustadoras depois de um estudo efectuado em voluntários saudáveis daquele país ter revelado que cerca de 30-50% estão colonizados por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs, maioritariamente enzimas do tipo CTX-M (Hawkey, 2008).

Dados referentes a outras áreas do continente Asiático indicam um aumento significativo na colonização de pessoas saudáveis e utentes previamente hospitalizados por bactérias produtoras de diferentes variantes de ESBLs, nomeadamente do tipo VEB (*Vietnamese extended-spectrum beta-lactamase*) (Hawkey, 2008).

América do Sul

Na América do Sul verifica-se que há uma prevalência de enzimas CTX-M-2 na Argentina, embora se verifique a emergência de CTX-M-15, CTX-M-8 e CTX-M-9 (Sennati *et al.*, 2012).

No Brasil e Colômbia-verifica-se uma elevada prevalência de enzimas SHV-5 e SHV-12 (Guzmán-Blanco *et al.*, 2014).

Os dados epidemiológicos descritos para as diferentes áreas geográficas, referem-se a isolados bacterianos de hospitais, locais onde se verifica uma elevada pressão selectiva devido à constante exposição a antibióticos. Contudo, a colonização ou infecção por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs não é restrita apenas a doentes hospitalizados. Na comunidade, há humanos saudáveis e pacientes não hospitalizados que estão colonizados e/ou infectados por estas bactérias. Assim, a Figura 3 remete para a distribuição mundial de pessoas da comunidade colonizadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs.

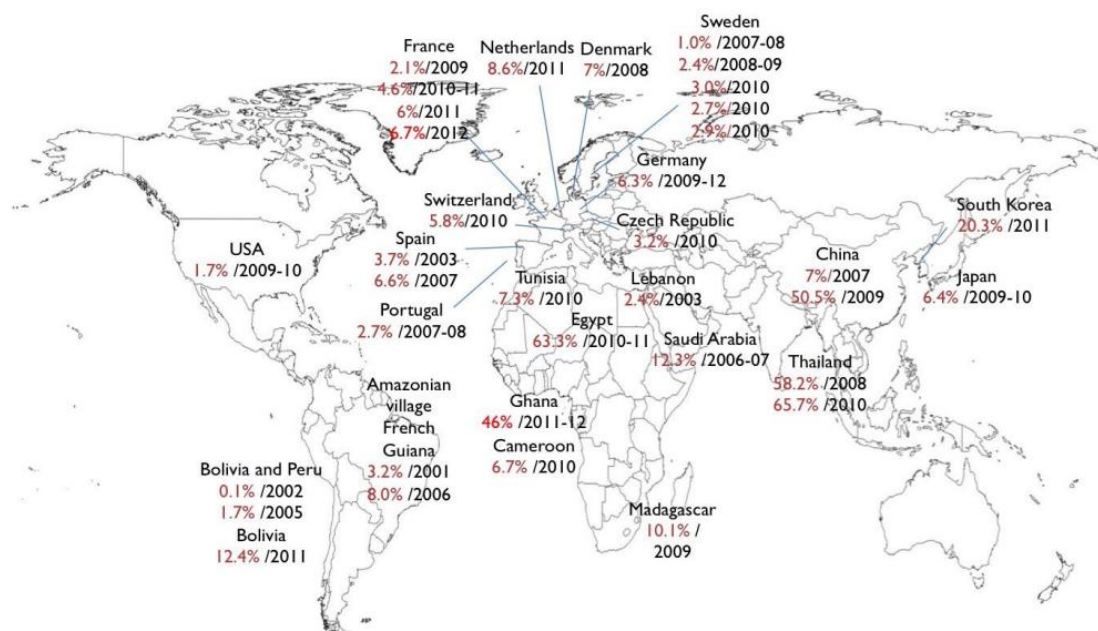


Figura 3. Prevalência mundial de humanos da comunidade portadores de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs (adaptado de Balkhed, 2014)

1.4.2. Mecanismos de disseminação

A disseminação de ESBLs pode ocorrer através de dispersão clonal de estirpes bacterianas ou por transferência horizontal de genes que codificam para ESBLs entre bactérias da mesma e/ou espécies diferentes.

1.4.2.1. Dispersão clonal

A dispersão clonal está mais frequentemente associada a casos em que uma determinada bactéria se adapta e permanece num determinado ambiente (hospitalar, local de produção animal ou outra infra-estrutura). Esta adaptação permite que as bactérias se multipliquem por sucessivas divisões celulares e transmitam à sua descendência os genes responsáveis pela resistência aos antibióticos (por replicação de DNA). É de extrema importância detectar estes focos de clones bacterianos de modo a travar a sua disseminação e consequente transmissão de resistência a antibióticos, já que habitualmente se tratam de clones portadores de características (cápsula, adesinas, fímbrias, capacidade de sequestro de ferro, etc.) que os tornam altamente eficientes para uma dispersão epidémica e/ou pandémica (Hawkey *et al.*, 2009).

As repercussões do sucesso epidémico do clone de *E. coli* ST131 produtor de CTX-M-15 podem dever-se à introdução de plasmídeos IncFII contendo genes que codificam para a enzima CTX-M-15. Actualmente, a ocorrência deste clone não é exclusiva nos humanos e tem-se verificado um agravamento na sua dispersão. Amos e colaboradores (2014) efectuaram uma investigação acerca da sua prevalência em águas residuais que afluíam a um rio em Inglaterra e constataram que a maior parte das bactérias resistentes a cefalosporinas de terceira geração aí detectadas eram *E. coli* ST131, havendo uma predominância de enzimas CTX-M-15 (prevalentes em animais de companhia e aves migratórias em Inglaterra). Este estudo concluiu que a elevada incidência de bactérias resistentes a cefalosporinas de terceira geração se devia ao facto de nas imediações deste rio existirem quintas de produção animal que contribuiriam para a contaminação fecal. Mora *et al.* (2010), por sua vez, efectuou estudos em aviários e carne de frango comercializada, tendo identificado *E. coli* ST131 produtor não só de CTX-M-15, mas também CTX-M-9.

1.4.2.2. Transferência horizontal de genes

A transferência horizontal de genes caracteriza-se pela transmissão de material genético móvel a outras bactérias, não necessariamente suas descendentes ou pertencentes à mesma espécie.

A transferência horizontal pode ocorrer por três processos diferentes: transformação, transdução ou conjugação (Murray *et al.*, 2009).

A transformação ocorre quando as bactérias captam para o seu genoma DNA livre, por exemplo, proveniente da lise de uma bactéria. O processo de transdução está relacionado com fenómenos em que as bactérias são infectadas por bacteriófagos que injectam DNA no genoma da bactéria hospedeira. O processo em que há interacção física entre bactérias e que envolve troca e partilha de DNA através de plasmídeos (ou até transposões), é denominado de conjugação (Figura 4). Neste processo as bactérias interagem entre si através de pili (Murray *et al.*, 2009).

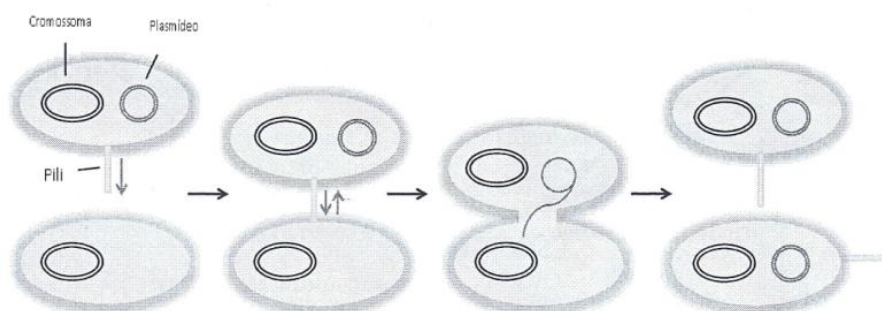


Figura 4. Processo de conjugação bacteriana (adaptado de Titelman, 2013).

A flora intestinal é o reservatório ideal para se trocarem e adquirirem genes, nomeadamente genes de resistência aos antibióticos. Caracteriza-se por muitas interações entre diferentes espécies de bactérias que, quando estimuladas pelo uso de

antibióticos, são forçadas a sofrerem uma selecção natural. As estirpes resistentes acabam por ser seleccionadas e por aumentar em número sob essa pressão selectiva, podendo depois partilhar os genes de resistência a antibióticos que albergam através de plasmídeos, por exemplo. Os plasmídeos podem albergar genes que conferem resistência a antibióticos pertencentes a diferentes classes. Este facto é responsável pelo surgimento de perfis de multiresistência a antibióticos, particularmente típicos entre bactérias produtoras de ESBLs. *E. coli* é detentora de uma tendência natural para partilhar múltiplos genes de resistência a antibióticos através de pili, sendo desta forma, uma das grandes responsáveis pela disseminação de ESBLs entre *Enterobacteriaceae* (Bennett, 2008).

Os genes *bla*_{ESBL} podem ser transferidos através de diferentes elementos genéticos móveis, especialmente plasmídeos e transposões (Cantón *et al.*, 2003).

Os plasmídeos são constituídos por cadeias duplas de DNA circular localizados fora do cromossoma da bactéria hospedeira. Possuem capacidade replicativa autónoma e podem albergar genes de resistência a antibióticos e factores de virulência essenciais para a sobrevivência e adaptação rápida a qualquer ambiente mais inóspito. A maior parte das bactérias possui plasmídeos, os quais podem variar em tamanho e podem codificar proteínas necessárias para a formação de pili (essencial para a sua transferência para outras bactérias por conjugação). O sucesso da disseminação das ESBLs deve-se ao facto da sua transmissão entre bactérias da mesma espécie, de diferentes espécies ou de diferentes famílias, ser frequentemente efectuada por plasmídeos (Carattoli, 2011).

A diversidade de hospedeiros de plasmídeos é determinada pelo tipo de grupo de incompatibilidade do plasmídeo (Inc), que é responsável pela replicação e controlo de número de cópias. Plasmídeos IncF são mais restritos a determinadas espécies de bactérias e estão maioritariamente relacionados com ESBLs do tipo CTX-M-14, por exemplo. Os plasmídeos do tipo IncFII, IncA/C, IncN, IncL/M e IncI são os mais disseminados em bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e associados a genes que codificam as ESBLs CTX-M-14, SHV-5, entre outras, possuindo habitualmente um tamanho compreendido entre 50-200 kb (Carattoli, 2011).

Os transposões simples, também designados de sequências de inserção (ISs), são constituídos por sequências curtas de DNA (cerca de 700–2500 pares de bases) (Murray

et al., 2009). Podem ter diferentes localizações, particularmente em diferentes plasmídeos, tendo potencial para se moverem e disseminar genes de resistência a antibióticos (Bennett, 2008). A sequência de inserção *ISEcp1* está associada à disseminação de enzimas CTX-M, como por exemplo, CTX-M-2 e CTX-M-9 (Cantón *et al.*, 2012).

Quando duas sequências de inserção se encontram a flanquear zonas que contêm genes (codificando ou não para resistência a antibióticos), passam a constituir um transposão composto. Os transposões não têm capacidade replicativa. No entanto, são estruturas genéticas altamente eficazes a transportar genes entre, por exemplo, plasmídeos e cromossoma da mesma bactéria ou de bactérias diferentes (no caso de transposões conjugativos) (Bennett, 2008). Por exemplo, os genes *bla_{KPC}* têm sido descritos associados ao transposão Tn4401. Este transposão possui os genes transposase (*tnpA*), resolvase (*tnpR*) e duas sequências de inserção (*ISKpn6* e *ISKpn7*). Supõe-se que foi com este transposão que os genes *bla_{KPC}* se começaram a disseminar (Nordmann *et al.*, 2009).

Existem ainda elementos genéticos designados de integrões que, apesar de não terem mobilidade própria, podem associar-se a transposões ou plasmídeos e assim, adquirir mobilidade e contribuir para a disseminação da resistência aos antibióticos. *Cassettes* de genes podem ser incorporadas ou removidas de integrões, independentemente da sua estrutura (Harbottle *et al.*, 2006). Os integrões podem albergar múltiplas *cassettes* de genes de resistência a antibióticos transcritos por um promotor comum existente no integrão (Toleman *et al.*, 2006).

1.5. Epidemiologia de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em animais de consumo humano

A primeira detecção de bactérias produtoras de ESBLs em animais de consumo humano ocorreu durante o período de 2000-2001 num matadouro Espanhol, em que foram identificados isolados de *E. coli* produtores de ESBLs em galinhas saudáveis (Brinas *et al.*, 2003).

Dados epidemiológicos de outros países não permitem comparar prevalências de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs com muita exactidão, uma vez que a metodologia adoptada nos estudos varia de país para país. Assim, por exemplo, a prevalência de *E. coli* produtoras de ESBLs pode sofrer uma variação na ordem de 0,2-40,1% consoante a metodologia utilizada nos estudos relativos a cada país (Smet *et al.*, 2010). Desta forma, a informação que se segue é apenas relativa a estudos efectuados em determinados países sem, portanto, efectuar comparações.

A ocorrência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em animais de consumo tem sido vastamente reportada nos últimos anos. CTX-M-1 é a ESBL mais reportada em animais de consumo humano e começou a disseminar-se desde que foi descoberta em 2005, numa suinicultura Dinamarquesa. No entanto, nos últimos anos, as enzimas CTX-M-14, CTX-M-32 e CTX-M-15 têm emergido em suiniculturas Dinamarquesas e o mesmo padrão se verifica nos restantes países Europeus, apesar de em geral, CTX-M-1 e CTX-M-14 serem as mais frequentes (Aarestrup *et al.*, 2006; Blanc, *et al.*, 2006; Agersø *et al.*, 2012).

O clone *E. coli* ST131 produtor de CTX-M-15, portador de numerosos factores de virulência e frequentemente envolvido em infecções extraintestinais no homem, tem sido o mais estudado. Foi inicialmente descoberto na sequência de infecções urinárias e septicémias em recém-nascidos, mas actualmente não se restringe apenas a humanos. Já se verificou a disseminação deste clone em várias espécies de animais, incluindo animais de consumo humano (suínos, bovinos, entre outros), animais selvagens e animais de companhia, existindo já vários estudos que sugerem uma transmissão a partir de animais de consumo humano para o homem, apesar dos dados recolhidos serem ainda insuficientes para comprovar esta transmissão (Mora *et al.*, 2010; Overdevest *et al.*, 2011; Platell *et al.*, 2011).

De um modo geral, os subtipos de enzimas CTX-M (CTX-M-1, -2, -3, -8, -9, -14, -15, -17, -18, -20, -32, -53) têm sido detectados em animais de consumo (sobretudo suínos) na grande maioria dos países Europeus. Variantes de enzimas SHV (SHV-2,-5,-12) e TEM (TEM-20,-52,-106,-126) têm também sido detectadas, apesar de não terem uma disseminação tão vasta como as enzimas do tipo CTX-M. Plasmídeos endémicos pertencentes aos grupos de incompatibilidade IncF, IncA/C, IncN, IncHI2, IncI1 e IncK albergam particularmente genes *bla*_{TEM-52} e *bla*_{CTX-M-1, -9, -14, -32}, prevalentes não só em

animais de consumo como referido anteriormente, mas também em animais de companhia, em produtos alimentares (lacticínios, carne) e em humanos (EFSA, 2011).

No que diz respeito a Portugal, num estudo recente de Rodrigues *et al.* (2013) verificou-se uma ocorrência de TEM-52 (a ESBL mais frequente neste estudo), CTX-M-32 e CTX-M-1 em *E. coli* de suiniculturas intensivas de diferentes regiões geográficas de Portugal. Estes resultados indicam um aumento da diversidade de ESBLs relativamente ao estudo efectuado pelo mesmo grupo de investigação durante o período de 1998-2004 (Machado *et al.*, 2008).

Plasmídeos, genes bla_{ESBL} e clones de bactérias podem ser transmitidos para os humanos através da ingestão de produtos provenientes de animais de consumo, através do contacto com animais e/ou, indirectamente, com o ambiente onde ambos estão inseridos. Pessoas que têm como actividade ocupacional tratar de animais têm um maior risco de virem a ser portadoras de bactérias produtoras de ESBLs (EFSA, 2011).

Desta forma, os animais, em particular os suínos, parecem constituir reservatórios de bactérias contendo genes bla_{ESBL} que podem ser transferidos para outras bactérias (pertencentes ou não à família *Enterobacteriaceae*) e para outros nichos (ambiente, homem). No homem, estes genes podem passar a estar albergados em bactérias pertencentes à flora intestinal que podem mais tarde tornar-se patogénicas extraintestinais, caso haja oportunidade para tal. Por exemplo, há fortes suspeitas de que as enzimas CTX-M-1, CTX-M-14 e CTX-M-27, detectadas em *E. coli* de pacientes hospitalizados, sejam originárias de bactérias provenientes de animais de consumo humano. Para se comprovar este facto é necessário efectuar estudos mais detalhados (Hammerum *et al.*, 2014). A Figura 5 esquematiza as diferentes vias de transmissão de bactérias e/ou genes de resistência entre os diferentes nichos.

Caracterização molecular de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

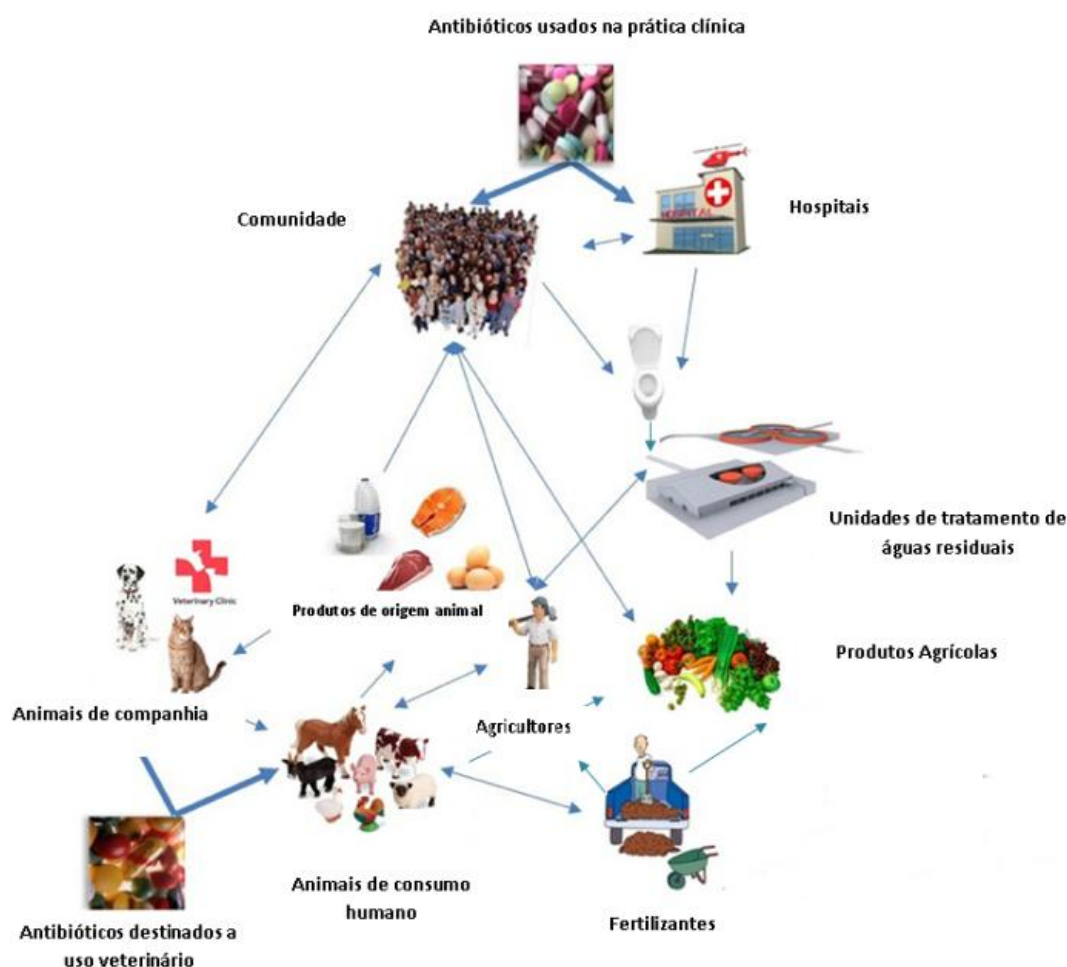


Figura 5. Diferentes vias de transmissão de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou genes de resistência entre os diferentes nichos (adaptado de Cantas, 2013).

No que diz respeito à produção de suínos para consumo humano, existem regimes de produção intensiva e extensiva (Humane Society International, 2014). Estes regimes de produção apresentam diferenças que teoricamente se reflectirão nos dados epidemiológicos relativos à ocorrência de bactérias produtoras de ESBLs em cada caso. Os regimes de produção extensivos privilegiam uma dieta natural e diversificada, que respeita as necessidades nutricionais do organismo dos suínos e não impõe restrições quanto à quantidade ou momentos para se alimentar (Humane Society International, 2014). A área extensa e pastoreio ao ar livre evitam que o espaço fique sobrelotado e, desta forma, os suínos não são forçados a ficar confinados ao mesmo espaço. Já o

sobre lotamento nas suiniculturas com regime de produção intensivo promove um maior contacto físico entre suínos, aumentando a probabilidade da disseminação de bactérias produtoras de ESBLs e/ou genes *bla*_{ESBL}, e eventuais doenças. Para além disso, as suiniculturas intensivas privilegiam dietas baseadas em rações fortemente suplementadas com nutrientes (proteínas, sobretudo) e monetariamente mais acessíveis, que visam promover um crescimento mais rápido do que aquele que se verifica em circunstâncias naturais (Sørensen *et al.*, 2014). Estas rações contêm organismos geneticamente modificados (OGMs, soja e milho sobretudo), o que tem vindo a intrigar a comunidade científica sobre a sua importância na transmissão de genes que conferem resistência aos antibióticos (Antibiotic Resistance Markers in Genetically Modified (GM) Crops, 2001). Num estudo recente, constatou-se que estes organismos geneticamente modificados (soja, entre outros) possuem plasmídeos que albergam genes *bla*_{ESBL}, constituindo assim um risco elevadíssimo para a disseminação de ESBLs (Ho Wan, 2014).

A suplementação das rações com OGMs (soja, entre outros) provoca úlceras e processos inflamatórios graves no estômago dos suínos, bem como outros problemas de saúde graves (Carman, 2013). A ocorrência de processos inflamatórios severos na mucosa do tracto gastrointestinal gera desequilíbrios na flora normal e favorece a proliferação de bactérias patogénicas que se aproveitam do facto do sistema imunitário estar menos alerta e mais focado na reparação e controle dos processos inflamatórios existentes (Carman, 2013). Desta forma, há uma forte possibilidade da suplementação com OGMs promover a disseminação de ESBLs e/ou transferência de genes vários na flora intestinal dos suínos.

Sabe-se ainda que a suplementação das rações com soja geneticamente modificada tem consequências no sistema imunitário e na absorção de nutrientes, sobretudo de minerais (Coulibaly *et al.*, 2011). A elevada concentração de anti-nutrientes (ácido fítico, por exemplo) impossibilita a absorção de minerais essenciais para o desenvolvimento físico e fortalecimento do sistema imunitário. Para contrariar as carências de zinco e consequentemente, o adocimento dos animais, é usual suplementar também as rações com zinco (Guo-jun *et al.*, 2009). Esta suplementação tem também implicações na flora normal dos suínos e promove a disseminação de genes de resistência aos antibióticos por processos de co-selecção de genes de resistência a metais e por outros mecanismos.

O estudo de Bednorz *et al.* (2013) revelou que a incidência de clones de *E. coli* multirresistentes aumentou cerca de 20% quando os suínos ingeriram rações suplementadas com zinco (em relação ao grupo controlo não alimentado com zinco). A suplementação com zinco favorece a troca de plasmídeos que contêm também genes que conferem resistência a antibióticos e, desta forma, é uma má opção quando se pretende um fortalecimento do sistema imunitário dos suínos (Bednorz *et al.*, 2013).

No decurso das práticas de produção nas suiniculturas, há ainda a possibilidade de agricultores que praticam agricultura biológica recorrerem ao uso de fezes de suínos como fertilizantes naturais. Este facto pode contribuir para que os vegetais fiquem contaminados com bactérias produtoras de ESBLs, uma vez que os solos e ambiente aquático podem passar a constituir reservatórios destas bactérias e/ou dos seus genes de resistência aos antibióticos (Reuland *et al.*, 2014).

Não se deve também invalidar a hipótese das fezes de suínos contaminadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs poderem contaminar águas residuais que podem vir a ser usadas na agricultura, no quotidiano, e assim constituir uma forma de disseminação de ESBLs (APUA Newsletter, 2014).

A persistência de fezes nas instalações também atrai e constitui um excelente meio para o aparecimento e persistência de insectos, nomeadamente moscas. As suiniculturas são o ambiente de eleição para estas moscas que, adquirem e transportam bactérias, incluindo bactérias resistentes a antibióticos (Looft *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013). Estudos recentes comprovaram que as moscas provenientes de locais de produção de animais de consumo humano estão colonizadas por bactérias com perfis de resistência e linhagem clonal iguais aos encontrados em bactérias de fezes desses animais (Blaak *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2011).

Finalmente, a maior parte dos antibióticos usados como promotores de crescimento não são muito bem absorvidos pelo sistema digestivo dos animais de consumo humano, acabando por ser eliminados para o ambiente, contribuindo para a selecção no ambiente de bactérias resistentes a antibióticos, incluindo as produtoras de ESBLs (Zhu *et al.*, 2013).

Suplementos de probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos, argila e extractos de plantas constituem uma boa alternativa ao uso de antibióticos como medida preventiva de

infecções, maioritariamente em crias de suínos. Probióticos e prebióticos têm efeitos benéficos na flora intestinal dos suínos e reduzem o risco de diarreia através da estimulação do sistema imunitário, alteram o pH do lúmen intestinal, facilitam a digestão, promovem uma maior absorção e aproveitamento de nutrientes provenientes da alimentação e reduzem o risco de bactérias patogénicas resistentes a antibióticos persistirem na flora intestinal (Vondruskova *et al.*, 2010).

Em 2008, as autoridades Alemãs de controlo e monitorização de resistência aos antibióticos forçaram a Indústria Farmacêutica e Farmácias Alemãs a contabilizarem e divulgarem a quantidade de antibióticos que se destinaram a uso veterinário. Esta fiscalização contribuiu para que durante os anos de 2012 e 2013 se tivesse reduzido a quantidade de antibióticos usados em veterinária em cerca de 170 toneladas (APUA Newsletter, 2014).

Seria ideal que se pudesse aplicar este modelo em Portugal e que o Ministério da Agricultura e Pecuária mobilizasse fundos para que se pudesse efectuar um controlo mais rigoroso e restrito da utilização de antibióticos em veterinária. Seria benéfico não só para a saúde pública, mas também para a economia nacional, uma vez que implicaria uma redução de custos em antibióticos e hospitalizações (a diminuição da utilização de antibióticos em veterinária iria atenuar a disseminação de bactérias resistentes a antibióticos e, conseqüentemente, a população não iria padecer tão frequentemente de infecções de difícil tratamento). Neste sentido, a Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária de Portugal propôs um plano com normas que visam diminuir o uso de antibióticos em animais e, conseqüentemente, minimizar a disseminação da resistência a antibióticos e a sua transmissão para humanos (Ponte, 2013).

Desta forma, recomenda-se que as autoridades veterinárias cumpram e respeitem a legislação em vigor referente a medicamentos veterinários; acompanhem, sensibilizem e invistam na formação dos profissionais de saúde de modo a executarem boas práticas de distribuição de medicamentos veterinários; desenvolvam vias terapêuticas alternativas ao uso de antibióticos; divulguem e disponibilizem resumos das características dos antibióticos de uso veterinário para que possam ser usados de forma correcta; monitorizem, fiscalizem e vigiem as práticas veterinárias. Este plano tem a duração de cinco anos e entrou em vigor em 2014 (Ponte, 2013).

II. Objectivos

Os antibióticos foram usados durante muito tempo e de forma indiscriminada como promotores de crescimento em suínos e outros animais de consumo humano. Este facto despoletou uma emergência e disseminação de bactérias resistentes a antibióticos que para além de serem usados em veterinária, são também usados em prática clínica.

O uso de antibióticos nas práticas veterinárias (tratamento de infecções), promove uma co-selecção e subsequente persistência de bactérias resistentes a antibióticos.

Há uma escassez de dados epidemiológicos referentes à ocorrência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em suiniculturas de produção intensiva e extensiva Portuguesas. Assim, este trabalho teve como objectivos:

- a) Avaliar a ocorrência e diversidade de ESBLs em suiniculturas Portuguesas de produção intensiva e extensiva;
- b) Avaliar a resistência a antibióticos não beta-lactâmicos entre os isolados produtores de ESBLs detectados.

III. Material e Métodos

1. Isolados bacterianos

Os isolados bacterianos analisados no presente trabalho foram obtidos no decorrer de um projecto de investigação que teve início em 2006 no Laboratório Associado REQUIMTE/Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Em concreto, durante 2006 e 2007 foram recolhidas inúmeras amostras oriundas de uma suinicultura de produção intensiva da região Norte e de uma suinicultura de produção extensiva da região Sul de Portugal, nomeadamente zaragatoas rectais e da pele de animais das salas de cobrição, de gestação, maternidade e de engorda; amostras de água não tratada usada para encher os bebedouros e amostras dos bebedouros de diferentes salas; amostras de ração obtidas do saco inicial e dos comedouros para animais de cobrição e gestação; zaragatoas da ventilação das salas lavadas e desinfectadas, destinadas a receber porcas no final da gestação; zaragatoas da parede de salas e dos pavimentos; amostras da fossa da sala de cobrição e maternidade; amostras da segunda lagunagem, última lagunagem e esterco seco; e amostras do rio próximo dos locais de produção.

As amostras foram inoculadas em meio de MacConkey sem antibiótico e em meio de MacConkey com diferentes antibióticos (cefotaxima, ceftazidima), de forma a seleccionar o crescimento de bactérias resistentes aos antibióticos referidos, uma vez que estas existem por norma em menor número nas amostras.

As placas foram incubadas a 37°C durante um período de 24 horas, tendo sido seleccionados os diferentes morfotipos de colónias por cada placa. A identificação presuntiva de *Enterobacteriaceae* foi feita realizando a coloração de Gram, o teste da oxidase e a análise da fermentação da glucose em caldo glucosado (Ferreira e Sousa, 2000).

Foi no âmbito destes estudos prévios que se identificaram 193 isolados (suinicultura intensiva, n=146; suinicultura extensiva, n=47) pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, os quais foram seleccionados para o presente trabalho de investigação.

2. Detecção de isolados produtores de ESBLs

A detecção da expressão de ESBLs nos isolados analisados neste estudo foi efectuada através do teste do duplo sinergismo (DDST, *Double Disc Sinergy Test*). A suspensão bacteriana preparada em soro fisiológico estéril e ajustada a uma densidade óptica de 0,5 McFarland foi inoculada no meio de cultura Mueller-Hinton, e posteriormente dispuseram-se os discos contendo cefotaxima (30 µg), cefepima (30 µg), ceftazidima (30 µg) e aztreonamo (30 µg) a 25mm de distância de um disco de amoxicilina e ácido clavulânico (30 µg) (Jarlier *et al.*, 1988).

3. Detecção e caracterização de genes que codificam ESBLs

3.1. Extração do DNA bacteriano

Foi efectuada uma extração de DNA dos isolados em que se detectou a expressão de ESBLs pelo teste do duplo sinergismo.

Cerca de duas ou três colónias da cultura bacteriana pura foram recolhidas e transferidas para 300µL de água ultrapura estéril e, num vórtex, foram homogeneizadas. De seguida, submeteu-se a suspensão bacteriana a uma fervura em banho de água (GFL®, Burgwadel, Alemanha) durante quinze minutos, centrifugou-se (Sigma, Osterode am Harz, Alemanha) a 14000r.p.m durante cinco minutos e recolheu-se o sobrenadante (contendo o DNA), o qual foi armazenado a -20°C (Machado *et al.*, 2007).

3.2. Amplificação dos ácidos nucleicos por PCR – Polymerase Chain Reaction

Os genes *bla*_{ESBL} mais disseminados mundialmente foram amplificados por PCR em termocicladores MyCyclerTM e iCyclerTM (Bio-Rad, Hércules, EUA). Assim, utilizaram-se *primers* e condições de amplificação específicos para detecção de *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA}, os quais se encontram descritos na Tabela 2 (Machado *et al.*, 2007).

A detecção de genes *bla*_{CTX-M} decorreu em duas fases. A primeira fase teve como objectivo verificar se os isolados continham genes *bla*_{CTX-M}. Nos casos em que o resultado foi positivo, passou-se à segunda fase, na qual se efectuou uma nova

amplificação recorrendo-se a *primers* mais específicos que permitiram determinar o grupo do gene *bla*_{CTX-M} (Machado *et al.*, 2007).

Em todas as reacções de PCR recorreu-se a controlos positivos e controlos negativos.

3.3. Electroforese

Após a amplificação por PCR, os produtos obtidos foram detectados através de electroforese em gel de agarose com concentrações entre 1,5-2%, usando as seguintes condições de electroforese: 90V, 45 minutos, tampão TAE 1X.

Para se poder visualizar os produtos de PCR sob a luz UV, adicionou-se um agente intercalante de ácidos nucleicos que emite fluorescência quando colocado num transiluminador. O agente intercalante usado foi o SYBR Green® a uma concentração de 0,03µL/mL.

Através do programa de aquisição de imagem *Molecular Imager ChemiDoc^{XRS}*, foi possível armazenar e visualizar os resultados da electroforese em formato digital. O tamanho dos fragmentos obtidos por PCR foi estimado por comparação com o marcador de peso molecular Hyperladder IV (Bioline, Uppsala, Suécia).

3.4. Purificação dos produtos amplificados

Quando apropriado, procedeu-se à purificação de DNA através da utilização do *kit* GRS PCR & Gel Purification (GRISP®, Porto, Portugal), seguindo as instruções do fabricante.

3.5. Sequenciação

Os produtos de PCR purificados foram enviados para a empresa Macrogen (Amesterdão, Holanda) para serem sequenciados.

As sequências obtidas foram comparadas com sequências existentes em bases de dados genéticos mundiais (GenBank) usando a ferramenta “BLAST alignment” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para se identificarem sequenciais iguais ou semelhantes às obtidas. As sequências de aminoácidos correspondentes às sequências nucleotídicas obtidas foram também alinhadas com as de várias ESBLs do mesmo tipo (CTX-M, TEM, SHV ou OXA) usando a ferramenta ClustalW2 Multiple Sequences

Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), de modo a ser possível a identificação da variante de ESBL, de acordo com os locais de mutação de cada ESBL publicados no *site* <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>.

4. Avaliação da susceptibilidade a antibióticos

A avaliação da susceptibilidade a antibióticos não beta-lactâmicos foi feita em todos os isolados identificados como produtores de ESBLs, seguindo as normas CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2010).

Para tal, preparou-se uma suspensão bacteriana em tubos estéreis contendo soro fisiológico e aferiu-se a densidade óptica para 0,5 MacFarland. A suspensão bacteriana obtida foi inoculada em meio de cultura Mueller-Hinton onde, de seguida, se colocaram discos estéreis impregnados com concentrações rigorosas de antibióticos, definidas pelas normas CLSI (CLSI, 2010).

Os antibióticos testados foram o ácido nalidíxico (30 µg), amicacina (30 µg), apramicina (15 µg), canamicina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), espectinomicina (25 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (10 µg), netilmicina (30 µg), tobramicina (10 µg), sulfonamidas (300 µg), tetraciclinas (30 µg), tigeciclina (15 µg) e trimetoprim (5 µg),

As placas foram incubadas a 37°C durante um período de 24 horas. Findo esse período, os halos de inibição foram medidos com uma craveira e os isolados classificados como susceptíveis (S), com resistência intermédia (I) ou resistentes (R).

Todos os isolados que apresentaram uma susceptibilidade intermédia foram considerados como resistentes.

Tabela 2. Condições de PCR usadas neste trabalho.

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>	<i>Gene</i>	<i>Condições de amplificação</i>	<i>Tamanho (bp)</i>	<i>Referência</i>
TEM-F TEM-R	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA	TEM	1 ciclo a 94°C (10 minutos); 35 ciclos a 94°C (1 minuto), 35 ciclos a 58°C (1 minuto), 35 ciclos a 72°C (1 minuto);; 1 ciclo a 72°C(1 minutos)	868	Rasheed <i>et al.</i> , 1997
SHV-F SHV-R	GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC TTA GCG TTG CCA GTG CTC	SHV	1 ciclo a 94°C (10 minutos), 35 ciclos a 94°C (40 segundos), 35 ciclos a 56°C (40 segundos), 35 ciclos a 72°C (40 segundos) e 1 ciclo a 72°C (10 minutos)	930	Rasheed <i>et al.</i> , 1997
OXA-GroupIII-F OXA-GroupIII-R	TTT TCT GTT GTT TGG GTT TT TTT CTT GGC TTT TAT GCT TG	OXA	1 ciclo a 94°C (10 minutos), 35 ciclos a 94°C (35 segundos), 35 ciclos a 51°C (35 segundos), 35 ciclos a 72°C (35 segundos) e 1 ciclo a 72°C (10 minutos)	427	Bert <i>et al.</i> , 2002
CTX-M-F' CTX-M-R'	TTT GCG ATG TGC AGT ACC AGT AA CGA TAT CGT TGG TGG TGC CAT A	CTX-M	1 ciclo a 94°C (10 minutos), 35 ciclos a 94°C (35 segundos), 35 ciclos a 51°C (35 segundos), 35 ciclos a 72°C (35 segundos) e 1 ciclo a 72°C (10 minutos)	544	Edelstein <i>et al.</i> , 2003
CTX-M1-F3 CTX-M1-F2	GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC AGC CGC CGA CGC TAA TAC A	CTX-M Grupo I*	1 ciclo a 94°C (10 minutos), 35 ciclos a 94°C (35 segundos), 35 ciclos a 55°C (35 segundos), 35 ciclos a 72°C (35 segundos) e 1 ciclo a 72°C (10 minutos)	499	Pitout <i>et al.</i> , 2004
Toho1-2F Toho1-1R	GCG ACC TGG TTA ACT ACA ATC C CGG TAG TAT TGC CCT TAA GCC	CTX-M Grupo II*	1 ciclo a 94°C (10 minutos), 35 ciclos a 94°C (35 segundos), 35 ciclos a 55°C (35 segundos), 35 ciclos a 72°C (35 segundos) e 1 ciclo a 72°C (10 minutos)	351	Pitout <i>et al.</i> , 2004
CTX-M-8/25-F CTX-M-8/25-R	CGC TTT GCC ATG TGC AGC ACC GCT CAG TAC GAT CGA GCC	CTX-M Grupo III*	1 ciclo a 94°C (10 minutos), 35 ciclos a 94°C (35 segundos), 35 ciclos a 55°C (35 segundos), 35 ciclos a 72°C (35 segundos) e 1 ciclo a 72°C (10 minutos)	307	Pitout <i>et al.</i> , 2004
CTXM914-F CTX-M914-R	GCT GGA GAA AAG CAG CGG AG GTA AGC TGA CGC AAC GTC TG	CTX-M Grupo IV*	1 ciclo a 94°C (10 minutos), 35 ciclos a 94°C (35 segundos), 35 ciclos a 62°C (35 segundos), 35 ciclos a 72°C (35 segundos) e 1 ciclo a 72°C (10 minutos)	474	Pitout <i>et al.</i> , 2004
CTX-M-10deg-F CTX-M-15rv	ATG GTT AAA AAA TCA CTG CGY C TCC GTT TCC GCT ATT ACA AAC	CTX-M Grupo I* (sequenciação)	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 51°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	889	Machado <i>et al.</i> , 2006

* **Grupo I** inclui CTX-M-1, -3, -10 a -12, -15 (UOE-1), -22, -23, -28, -29, -30 e outras mais recentes; **Grupo II** inclui CTX-M-2, -4 ao -7, -20, Toho-1 e outras mais recentes; **Grupo III** inclui CTX-M-8 e outras mais recentes; **Grupo IV** inclui CTX-M-9, -13, -14, -16 ao -19, -21, -27, Toho-2 e outras mais recentes.

IV. Resultados e Discussão

Ocorrência de ESBLs em suiniculturas de produção intensiva e extensiva

Não se observaram *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs na suinicultura extensiva analisada.

Dos isolados obtidos provenientes da suinicultura intensiva, 21% (31/146) dos isolados de *Enterobacteriaceae* eram produtores de ESBLs.

Este resultado é um reflexo da utilização prévia de antibióticos como promotores de crescimento que, desde 2006 é proibida na Europa (The Lancet Infectious Diseases Commission, 2013). O sobrelotamento das suiniculturas intensivas e outros factores descritos na secção 1.5 favorecem a disseminação de ESBLs nas suiniculturas intensivas.

Diversidade das ESBLs detectadas

Dos isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs, nenhum isolado possuiu os genes *bla_{OXA}* e *bla_{SHV}*. No entanto, todos os isolados demonstraram ter genes *bla_{CTX-M}* do grupo 1, os quais por sequenciação foram caracterizadas como codificando para CTX-M-32 (Tabela 3). Alguns destes isolados com genes *bla_{CTX-M-32}* possuíam ainda genes *bla_{TEM}*, embora sejam necessários estudos futuros para averiguar se codificam ou não para variantes do tipo ESBL.

Verificou-se que na suinicultura estudada no âmbito do presente trabalho, houve uma predominância de enzimas CTX-M-32. Outros estudos realizados em suiniculturas e outros locais de produção animal na Europa, indicaram que de facto, esta enzima é das mais prevalentes (EFSA, 2011). Rodrigues *et al.* (2013) também observou um aumento na ocorrência de enzimas CTX-M-32, mas também TEM-52 e CTX-M-1, em diferentes suiniculturas de produção intensiva Portuguesas.

Estudos prévios efectuados por Rodrigues e colaboradores (2013) em suiniculturas intensivas em Portugal, constataram que o uso de antibióticos em veterinária tem sido frequente. Verificaram igualmente que, há uma prevalência dos mesmos tipos de enzimas encontrados no presente estudo. Há suspeitas que esta disseminação se possa dever à mobilização de

plasmídeos epidémicos (IncN/ST1, por exemplo) e/ou clones particulares (ST10 CC, por exemplo) que têm vindo a emergir na comunidade e animais de consumo humano na Europa, realçando a possibilidade de que se disseminam através da cadeia alimentar. A elevada promiscuidade dos diferentes elementos genéticos móveis pode contribuir para que se verifique uma maior diversidade e amplificação de plasmídeos que codificam para ESBLs (Rodrigues *et al.*, 2013).

É prudente monitorizar e adoptar medidas preventivas que minimizem a disseminação de bactérias produtoras de ESBLs e/ou genes *bla*_{ESBL} de animais de consumo humano para humanos.

Tabela 3. Caracterização dos isolados produtores de ESBLs identificados neste trabalho.

Isolado	Amostra (origem)	Beta-lactamases (genes <i>bla</i> detectados e/ou sequenciados) ^a	Perfil de resistência a antibióticos não beta-lactâmicos ^b
S 521	Zaragatoa rectal (animal da sala de cobrição)	<u>CTX-M-32</u>	Spc, Nal, Sul, Tet, Clo
S 525	Fossa da sala de cobrição	TEM, <u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Neo
S 526	Fossa da sala de cobrição	TEM, <u>CTX-M-32</u>	Gen, Tob, Str, Spc, Nal, Sul, Tmp, Tet, Neo, Kan
S 527	Fossa da sala de cobrição	<u>CTX-M-32</u>	Gen, Tob, Str, Spc, Nal, Sul, Tmp, Tet, Neo, Net, Kan
S 528	Fossa da sala de cobrição	TEM, <u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Nal, Tmp, Tet, Apr
S 532	Fezes-Sala de cobrição	<u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Nal, Tmp, Tet, Apr
S 545	Fezes-sala de gestação	<u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Nal, Sul, Tmp
S 561	Fezes-sala de machos	<u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Nal, Sul, Tet, Clo
S 562	Fezes-sala de machos	<u>CTX-M-32</u>	Gen, Str, Spc, Cip, Nal, Sul, Tmp, Tet, Neo, Kan
S 563	Fezes-sala de machos	<u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Sul, Tmp, Clo
S 565	Fezes-sala de machos	<u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Nal, Sul, Tmp, Neo
S 570	Zaragatoa do ninho de leitões-salas lavadas e desinfectadas	<u>CTX-M-32</u>	Str
S 577	Zaragatoa da ventilação-salas lavadas e desinfectadas	<u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Nal, Tmp, Tet
S 585	Fezes da porca mãe-Maternidade	TEM, <u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Cip, Nal, Sul, Tmp
S 593	Comedouro-água residual sem comida-Maternidade	<u>CTX-M-32</u>	Gen, Tob, Str, Spc, Nal, Sul, Tmp, Tet, Neo, Kan
S 601	Zaragatoa de leitão com 14 dias-Maternidade	<u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Nal, Tmp
S 602	Zaragatoa de leitão com 14 dias-Maternidade	<u>CTX-M-32</u>	Str, Cip, Nal, Sul, Tet, Neo
S 607	Zaragatoa da parede da sala-Maternidade	<u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Nal, Sul, Tmp
S 612	Zaragatoa do pavimento dos leitões-Maternidade	<u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Cip, Nal, Sul, Tmp, Tet, Clo, Neo, Kan, Apr
S 614	Zaragatoa do pavimento dos leitões-Maternidade	TEM, <u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Nal, Sul, Tmp, Tet, Clo
S 619	Zaragatoa do pavimento dos leitões- Maternidade velha	<u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Cip, Nal, Tmp
S 626	Fezes porca mãe-maternidade velha	<u>CTX-M-32</u>	Spc
S 627	Fezes porca mãe-maternidade velha	<u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Nal, Sul, Tet, Clo
S 631	Zaragatoa das ripas da fossa interna-Maternidade velha	<u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Nal, Sul, Tmp, Tet, Clo
S 633	Zaragatoa das ripas da fossa interna-Maternidade velha	<u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Nal, Tmp, Clo
S 642	Fezes-Sala de engorda (porcos para abate com cerca de 6	<u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Nal, Sul, Tmp
S 668	Segunda lagunagem	<u>CTX-M-32</u>	Str, Spc, Nal, Sul, Tmp
S 670	Segunda lagunagem	<u>CTX-M-32</u>	Spc, Nal, Tet
S 671	Segunda lagunagem	<u>CTX-M-32</u>	Spc, Nal, Sul, Tmp
S 682	Esterco seco	TEM, <u>CTX-M-32</u>	Str, Spc

^aOs genes identificados por sequenciação como codificando para beta-lactamases do tipo ESBL são indicados a sublinhado e negrito; ^bGen-Gentamicina; Tob. Tobramicina; Str-Estreptomicina; Spc-Espectinomicina; Cip-Ciprofloxacina; Nal-Ácido Nalidíxico; Sul-Sulfonamidas; Amp-Trimetoprim; Tet-Tetraciclina; Clo-Cloranfenicol; Neo-Neomicina; Net-Netilmicina; Kan-Canamicina; Apr-Apramicina.

Resistência a antibióticos não beta-lactâmicos entre os isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs

Verificou-se que os isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de enzimas CTX-M-32, apresentaram um predomínio de perfis de resistência para as tetraciclinas (55%) e sulfonamidas (65%). A elevada taxa de resistência para as sulfonamidas deve-se sobretudo ao facto de serem antibióticos frequentemente usados na produção mundial de animais de consumo humano, devido ao preço mais acessível relativamente a outros antibióticos (Wang *et al.*, 2014). O perfil de resistência que se verifica para estes antibióticos pode dever-se a genes *sul1*, *sul2* e *sul3* que codificam dihidropteroato sintetase com fraca afinidade para as sulfonamidas (Wang *et al.*, 2014). Este tipo de genes estão habitualmente localizados em transposões que codificam para resistência a múltiplos antibióticos, a qual acaba por ser co-seleccionada pelo uso das sulfonamidas (Wang *et al.*, 2014).

Relativamente à classe dos aminoglicosídeos, especificamente para a canamicina, verificou-se que 16% dos isolados apresentaram um perfil de resistência. Quanto à gentamicina, verificou-se que apenas 13% dos isolados apresentaram um perfil de resistência. O perfil de resistência para a gentamicina, que embora neste estudo não abranja tantos isolados, supõe-se que está mais frequentemente presente em isolados de *E. coli* com os genes *aacC2* [*aac(3)-II*], *aacC4* [*aac(3)-IV*], *aacC3* [*aac(3)-III*], e *aadB* [*ant(2'')- I*] (Szmolka *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2011). Constatou-se que para a tobramicina, verificou-se que 13% dos isolados apresentaram um perfil de resistência. Obteve-se um perfil de resistência para a apramicina de 13%. Observaram-se ainda resistências à neomicina (35%) e estreptomicina (87%).

O antibiótico netilmicina foi o antibiótico pertencente à classe dos aminoglicosídeos para o qual se verificou a menor taxa de resistência (3%). A amicacina foi o único antibiótico aminoglicosídeo onde não se observaram perfis de resistência.

Obteve-se para a espectinomicina (aminociclitol), um perfil de resistência de 65%.

Neste estudo, verificou-se que para a ciprofloxacina (fluoroquinolona), 16% dos isolados apresentaram um perfil de resistência. A taxa de resistência para o ácido nalidíxico foi de 80%. As fluoroquinolonas são usadas para tratar infecções em animais de consumo humano

devido ao seu largo espectro de acção. Enrofloxacina é uma fluoroquinolona de terceira geração que é usada para tratar infecções em animais de consumo (Araneda, *et al.*, 2013).

Convém realçar que de um modo geral, a resistência às quinolonas não é muito frequente em locais de produção animal, embora se verifiquem perfis de resistência em alguns isolados de *E. coli* provenientes de locais de produção de animais (Kojima *et al.*, 2009).

Relativamente ao cloranfenicol, verificou-se que cerca de 23% dos isolados apresentaram um perfil de resistência. Estes resultados estão em conformidade com os resultados obtidos em diversos estudos Europeus, devendo-se sobretudo à abolição do uso deste antibiótico em animais de consumo humano desde 1994 (Glenn *et al.*, 2012; Szmolka *et al.*, 2012). O florfenicol é um derivado do cloranfenicol usado para tratar infecções respiratórias em bovinos e suínos. No entanto, tem-se verificado a existência de isolados de *E. coli* com perfis de resistência ao cloranfenicol, mediados pelos genes *catA1*, *floR* e *cmlA1* responsáveis pela inactivação enzimática e extrusão do cloranfenicol. O gene *catA1* é particularmente problemático devido ao facto de estar frequentemente integrado num *cluster* de genes que garante a expressão desta resistência mesmo quando não se verifica uma exposição directa ao cloranfenicol mas sim, por exemplo, ao florfenicol (Glenn *et al.*, 2012; Szmolka *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos indicaram a presença de um padrão de multiresistência devido à associação de perfis de resistência a várias classes de antibióticos, nomeadamente aminoglicosídeos-aminociclitolis, beta-lactâmicos, sulfonamidas, quinolonas e tetraciclinas.

V. Conclusão

Os isolados provenientes da suinicultura extensiva estudada não produziram ESBLs

Tendo em conta os resultados obtidos, verificou-se que 31 isolados provenientes da suinicultura intensiva comprovaram ser produtores de ESBLs do tipo CTX-M-32.

Dados epidemiológicos de outras suiniculturas e locais de produção de animais de consumo humano estão em concordância com os resultados deste estudo, visto que CTX-M-32 é das ESBLs do tipo CTX-M mais prevalente em animais de consumo humano.

Tendo em conta que não há sobrelotamento nas suiniculturas extensivas e há um uso mais prudente de antibióticos, não se observa tanta incidência de ESBLs. Os resultados obtidos neste estudo estão concordantes relativamente ao que se observa noutras suiniculturas extensivas mundiais.

Os isolados produtores de ESBLs apresentaram um perfil de multiresistência, sendo adicionalmente resistentes a aminoglicosídeos, sulfonamidas, quinolonas e tetraciclina.

Estes resultados devem-se ao maior consumo de antibióticos nas suiniculturas intensivas e maior proximidade entre os suínos, visto estarem todos limitados a infraestruturas comuns de dimensões mais reduzidas.

Os suínos, bem como outros animais de consumo humano, constituem assim um reservatório de *Enterobacteriaceae* e outras bactérias que albergam genes que conferem resistências aos antibióticos. Actualmente, as *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs têm vindo a emergir e a disseminar nas suiniculturas intensivas e/ou outros regimes intensivos de produção de animais de consumo humano devido ao uso recorrente de antibióticos para tratar animais doentes, prevenir doenças e promover um acréscimo na taxa de crescimento. É de extrema importância tomar medidas para reduzir o uso de antibióticos, de entre as quais se destaca a suplementação das rações com probióticos, prebióticos, extractos de plantas que promovam um crescimento mais saudável, fortalecimento do sistema imunitário e redução da incidência de infecções oportunistas, entre outros.

É importante promover um uso racional e maior controlo de antibióticos usados na medicina animal, de forma a evitar o agravamento da disseminação de bactérias produtoras de ESBLs e a consequente perda de eficácia clínica de diversos antibióticos, quer em uso humano, quer em uso animal.

VI. Bibliografia

Aarestrup, F. M. *et al.* (2006). Beta-lactamases among extended-spectrum beta-lactamase resistant (ESBL) *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in the Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), pp. 115-121.

Agersø, Y. *et al.* (2012). Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67(3), pp. 582–588.

Ahmad, A. *et al.* (2011). Insects in confined swine operations carry a large antibiotic resistant and potentially virulent enterococcal community. *BMC Microbiology*, pp. 11-23.

Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 289 (1036), pp. 321-331.

Amos, G. C. A. *et al.* (2014). Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69, pp. 1785-1791.

Antibiotic Resistance Markers in Genetically Modified (GM) Crops [Em Linha]. Disponível em <http://www.biosafety.be/ARGMO/Documents/EFB_AntibioticRM_English.pdf> [Consultado em 3/12/2014].

APUA Newsletter. Tracking Antibiotic Resistance Genes in the Environment. [Em Linha]. Disponível em <http://www.tufts.edu/med/apua/news/newsletter_60_2110964016.pdf> Trimestral. [Consultado em 1/12/2014].

Araneda, C. *et al.* (2013). Single and multiple pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in pigs. *Bioequivalence & Bioavailability*, 5, pp. 041-046

Balkhed, A. (2014). *Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae antibiotic consumption, detection and resistance epidemiology*. Tese de Doutorado. Linköping University, Linköping. 71 pp.

Bednorz, C. *et al.* (2013). The broader context of antibiotic resistance: zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), pp. 396-403.

Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153, pp. 347-357.

Berrazeg, M. *et al.* (2014). New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: an eview using google maps. *EuroSurveillance*, 19(20), pp. 208 – 209.

Blaak, H. *et al.* (2014). Detection of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms. *Environmental Microbiology*, 80, pp. 239-246.

Blanc, V. *et al.* (2006). ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Veterinary Microbiology*, 118(3-4), pp. 299-304.

Briñas, L. *et al.* (2003). Beta-lactamase characterization in *Escherichia coli* isolates with diminished susceptibility or resistance to extended-spectrum cephalosporins recovered from sick animals in Spain. *Microbiology Drug Resistance*, 9(2), pp. 201-209.

Brolund, A. *et al.* (2014). Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007-2011. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, pp. 344-352.

Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), pp. 1–14.

Bush, K. (1989). Characterization of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(3), pp. 259-263.

Bush, K. (1989). Classification of β -lactamases: groups 1, 2a, 2b and 2b'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(3), pp. 264-270.

Bush, K. (1989). Classification of β -lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3 and 4. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(3), pp. 271-276.

Bush, K., Jacoby, G.A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), pp. 969-976.

Cantas, L. *et al.* (2013). A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 96(4), pp. 1-14.

Cantón, R., Coque, T. M., Baquero, F. (2003). Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16(4), pp. 315-325.

Cantón, R. (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic mechanisms in the clinical setting. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(1), pp.20-25.

Cantón, R. *et al.*, (2012). CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 110(3), pp. 1-19.

Carattoli, A. (2011). Plasmids in gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, pp. 654-658.

Carman, J. A. *et al.* (2013). A long-term toxicology study on pigs fed a combined genetically modified (GM) soy and maize diet. *Journal of Organic Systems*, 8, pp. 38-54.

Choi, M. J. *et al.* (2011). Apramycin and gentamicin resistances in indicator and clinical *Escherichia coli* isolates from farm animals in Korea. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8, pp. 119–123.

Chong, Y. *et al.* (2013). Community spread of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*: a long term study in Japan. *Journal of Medical Microbiology*, 62, pp.1038-1043.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 17th. Approved standards M100-S17. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI, Wayne, Pa.

Cornaglia, G, Garau, J., Livermore, D. M. (2008). Living with ESBLs. Introduction. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1), pp.1-2.

Coulibaly, A. *et al.* (2011). Phytic Acid in Cereal Grains: Structure, Healthy or Harmful Ways to Reduce Phytic Acid in Cereal Grains and Their Effects on Nutritional Quality. *American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology*, 1, pp. 1-22.

Edelstein, M. *et al.* (2003). Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 47, pp. 3724–3732.

European Food Safety Authority (2011). *Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum- β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food-producing animals*. Parma, Itália.

Ewers, C. *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.

Fernandes, R. *et al.* (2014). Molecular characterization of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in northern Portugal. *The Scientific World Journal*, doi: 10.1155/2014/782897.

Ferreira, W. F. C., Sousa, J.C (2000). *Microbiologia*. Porto, Edição Lidel, Volume 2.

Forssten, S. D. *et al.* (2010). Emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during the years 2000 and 2004 in Helsinki, Finland. *Clinical Microbiology and Infection*, 16, pp.1158-1161.

Glenn, L. M. *et al.* (2012). Analysis of antimicrobial resistance genes detected in multiple-drug resistant *Escherichia coli* isolates from broiler chicken carcasses. *Microbial Drug Resistance*, 18, 453–463.

Gonçalves, A. *et al.* (2014). Comparative proteomics of an extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* strain from the Iberian wolf. *Journal Proteomics*, 104, pp. 80-93.

- Guo-jun, S. *et al.* (2009). Effects of dietary zinc level and an inflammatory challenge on performance and immune response of weanling pigs. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences*, 9, pp. 1303 – 1310.
- Gupta, V. (2007). An update on newer β -lactamases. *Indian Journal of Medical Research*, 126, pp. 417-427.
- Haeggman, S. (2010). *Evolution of beta-lactam resistance in Klebsiella pneumoniae*. Tese de Doutorado. Karolinska Institutet, Estocolmo. 32 pp.
- Hammerum, A.M. *et al.* (2014). Characterization of extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) – producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth- generation cephalosporins. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 69(10), pp. 2650-2657.
- Harbottle, H. *et al.* (2006). Genetics of antimicrobial resistance. *Animal Biotechnology*, 17, pp. 111-124.
- Hawkey, P.M. *et al.* (2009). The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(1), pp. 3-10.
- Ho Wan, M. (2014). Horizontal transfer of GM DNA why is almost no one looking? Open letter to Kaare Nielsen in his capacity as a member of the European Food Safety Authority GMO panel. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 25, 25918.
- Humane Society International. [Em Linha]. Disponível em <http://www.hsi.org/assets/pdfs/hsi-fa-white-papers/welfare_of_animals_in_the_pig.pdf> [Consultado em 1/12/2014].
- Jacoby, G. A., Munoz-Price, L. S. (2005). The new beta-lactamases. *The New England Journal of Medicine*, 352(4), pp. 380-391.
- Jarlier, V. *et al.* (1988). Extended broad spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactams agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(4), pp. 867-878.

Knothe, H. *et al.* (1983). Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofex, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11(6), pp.315-7.

Lartigue, M.F. *et al.* (2007). Extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M type now in Switzerland. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 52(8), pp. 2855-2860.

Lascols, C. *et al.* (2012). Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel beta-lactamases: a snapshot of extended spectrum beta-lactamases throughout the world. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, pp. 1632–1639.

Laurettil, L. *et al.* (1999). Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from *Pseudomonas Aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 43(7), pp. 1584-1590.

The Lancet Infectious Diseases Commission. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.reactgroup.org/uploads/news/The-Lancet-Infectious-Diseases-Commission-on-Antibiotic-Resistance-Nov2013.pdf>>. [Consultado em 1/09/2014].

Libisch, B. *et al.* (2008). Identification of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 54(3), pp.330-338.

Livermore, D.M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology and impact. *Clinical Infectious Diseases*, 36(1), pp. 1-23.

Livermore, D.M. *et al.* (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), pp. 165-174.

Looft, T. *et al.* (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, pp. 1691-1696.

Machado, E. (2006). Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy, 50, pp. 3220–3221.

Machado, E. *et al.* (2007). High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(6), pp. 1370-1374.

Mesa, R. J. *et al.* (2006). Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 58(1), pp. 211-215.

Mitsuhashi, S, Inoue, M. (1981). *Beta-lactam antibiotics*. New York, Ed. S. Mitsuhashy, pp. 41-56.

Mohanty, S. *et al.* (2010). Use of the cefepime-clavulanate ESBL Etest for detection of extended spectrum beta-lactamases in AmpC co-producing bacteria. *Journal of Infection in Developing Countries*, 4(1), pp. 24-29.

Mora, A. *et al.* (2010). Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, pp. 6991–6997.

Mshana, S. E. *et al.* (2009). Prevalence of multiresistant gram-negative organisms in a tertiary hospital in Mwanza, Tanzania. *BMC Research Notes*, pp. 2-49.

Murray, P.R. *et al.* (2009). *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro, Elsevier.

Muzahed, D. Y. *et al.* (2008). High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* among inpatients and outpatients with urinary tract infection in Southern India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, pp. 1393-1394.

Nordmann, P. *et al.* (2019). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 9, pp. 228-236.

- Nordmann, P. *et al.* (2012). The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiology*, 19(12), pp. 588-595.
- Ogbolu, D. *et al.* (2013). Dissemination of IncF plasmids carrying beta-lactamase genes in Gram-negative bacteria from Nigerian hospitals. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 7(5), pp. 382-390.
- Oteo, J. *et al.* (2006). Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *Journal Clinical Microbiology*, 44(7), pp. 2359-2366.
- Overdeest, I. *et al.* (2011). Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerging Infectious Disease journal*, 17, pp. 1216–1222.
- Paterson, D. L., Bonomo. R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology*, 18(4), pp. 657-686.
- Pfeifer, Y. *et al.* (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, pp. 371–379.
- Pitout, J. D., Hossain, A., and Hanson, N. D. (2004). Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, pp. 5715–5721.
- Pitout, J. D. (2010). Infections with extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*: changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs*, 70, pp. 313–333.
- Platell, J. L. *et al.* (2011). Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Veterinary Microbiology*, 153, pp. 99–108.
- Poole, K. (2004). Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(17), pp. 2200-2223.

Ponte, H. (2014). Plano de acção nacional para a redução do uso de antibióticos nos animais. [Em Linha]. Disponível em < www.omv.pt/download/eandgav61i.pdf > [Consultado em 1/10/2014].

Rasheed, J. K. *et al.* (1997). Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 41, pp. 647–653.

Rawat, D., Nair, D. (2010). Extended-spectrum β -lactamases in Gram negative bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(3), pp. 263–274.

Reuland, E. A. *et al.* (2014). Prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in raw vegetables. *Clinical Microbiology and Infection*, 33(10), pp. 1843-1846.

Richmond, M.H., Sykes, R. B. (1973). The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Advances in Microbial Physiology*, 9, pp. 31-88.

Robin, F. *et al.* (2007). CMT-type beta-lactamase TEM-125, an emerging problem for extended-spectrum beta-lactamase detection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(7), pp. 2403-2408.

Rodrigues, C. *et al.* (2013). IncI1/ST3 and IncN/ST1 plasmids drive the spread of *bla*_{TEM-52} and *bla*_{CTX-M-1/-32} in diverse *Escherichia coli* clones from different piggeries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68, pp. 2245–2248.

Sawai, T., Mitsunashi, S., Yamagishi, S. (1968) . Comparison of the chromosomal and extrachromosomal genetic determinants controlling staphylococcal penicillinase production. *Japanese Journal of Microbiology*, 12(4), pp. 531-533.

Siu, L. K. *et al.* (2000). β -Lactamases in *Shigella flexneri* isolates from Hong Kong and Shanghai and a novel OXA-1-like β -lactamase, OXA-30. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 2034–2038.

Smet, A. *et al.* (2010). Broad-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(3), pp. 295-316.

Sousa, J.C. (2006). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Porto, Ed. Universidade Fernando Pessoa, Segunda Edição.

Sørensen, M. *et al.* (2014). *Memorandum on "The feeding of genetically modified glyphosate resistant soy products to livestock"*. Aarhus University, Denmark, 14pp.

Storberg, V. (2014). ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Africa a non-systematic literature review of research published 2008-2012. *Infection Ecology and Epidemiology*, 4, pp. 203-242.

Sykes, R. B., Matthew, M. (1976). The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2(2), pp. 115-157.

Tham, J. (2012). *Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae epidemiology, risk factors, and duration of carriage*. Tese de Doutorado. Lund University, Malmo. 85 pp.

Thenmozhi, S. *et al.* (2014). Antibiotic resistance mechanism of ESBL producing *Enterobacteriaceae* in clinical field: a review. *International Journal of Pure Applied Bioscience*, 2 (3), pp. 207-226.

Thomson, K. (2010). Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), pp. 1019-1025.

Titelman, E. (2013). *Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae epidemiology and dynamics of fecal carriage*. Tese de Doutorado. Karolinska Institutet, Estocolmo. 42pp.

Toleman, M. A. *et al.* (2006). ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 70, pp. 296-316.

Van de Sande-Bruinsma, N. *et al.* (2008). Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (11), pp. 1722-1730.

Vondruskova, H. *et al.* (2010). Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhea in weaned piglets: a review. *Veterinarni Medicina*, 55(5), pp. 199-224.

Wang, N. *et al.* (2014). Sulfonamide-resistant bacteria and their resistance genes in soils fertilized with manures from Jiangsu province, southeastern China. *Public Library of Science One*, 9(11): e112626 doi:10.1371/journal.pone.0112626.

Yigit, H. *et al.* (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), pp. 1151-1161.

Yong, D. *et al.* (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), pp. 5046-5054.

Xia, S. *et al.* (2014). Dominance of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset and hospital-onset infection in China. *Public Library of Science One*, 9, e100707 doi:10.1371/journal.pone.0100707.

Zong, Z. *et al.* (2009). A *bla*_{VEB-1} variant, *bla*_{VEB-6} associated with repeated elements in a complex genetic structure. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 53(4), pp. 1693-1697.

Zhu, Y.G. *et al.* (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, pp. 3435-3440.

Caracterização molecular de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Caracterização molecular de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal

Caracterização molecular de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal