

Cátia Diana da Costa Queirós

**Estudo da suscetibilidade aos antibióticos em  
isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de  
suiniculturas Portuguesas**



**Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde**

**Porto, 2013**



Estudo da suscetibilidade aos antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas Portuguesas

**Cátia Diana da Costa Queirós**

**Estudo da suscetibilidade aos antibióticos em  
isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de  
suiniculturas Portuguesas**



**Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde**

**Porto, 2013**

Estudo da suscetibilidade aos antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas Portuguesas

**Cátia Diana da Costa Queirós**

**Estudo da suscetibilidade aos antibióticos em isolados de  
*Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas  
Portuguesas**

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

---

**Cátia Diana da Costa Queirós**

**Orientador  
Prof. Doutora Elisabete Machado**

## SUMÁRIO

O reconhecimento da resistência antimicrobiana como um fenómeno emergente em saúde pública, tem constituído um problema a nível mundial. A comunidade científica constatou a necessidade de realizar a avaliação da suscetibilidade aos antibióticos em “bactérias indicadoras” de diversas origens, como uma medida para combater o aumento da resistência antimicrobiana. As bactérias comensais *Escherichia coli* são colonizadoras do trato gastrointestinal da maioria dos animais e humanos permitindo realizar estudos de emergência, ocorrência e disseminação da resistência aos antibióticos. Em Portugal, a maioria dos estudos centra-se na pesquisa de ESBLs em *Enterobacteriaceae* provenientes das fezes de animais para consumo humano, existindo poucos estudos desenvolvidos sobre a avaliação dos perfis de suscetibilidade em *Enterobacteriaceae* provenientes de diferentes tipos de amostras de suiniculturas (rações, animais, águas, esgotos), assim como sobre a ocorrência de ESBLs e a análise da estrutura populacional de *Enterobacteriaceae* neste nicho. O presente estudo tem como objetivos: (i) testar a suscetibilidade a vários antibióticos em *Enterobacteriaceae* provenientes de suínos e de diversos ambientes de suiniculturas Portuguesas, (ii) detetar a ocorrência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em suiniculturas Portuguesas e (iii) analisar a estrutura populacional de *Escherichia coli* provenientes de suínos e de diversos ambientes de suiniculturas Portuguesas. Foram analisadas amostras provenientes de cinco suiniculturas Portuguesas distribuídas pela região Norte, Centro e Sul do país. Após pré-enriquecimento, as amostras foram inoculadas em meios de agar MacConkey com ou sem antibióticos. Os diferentes morfotipos foram identificados presuntivamente através da realização da coloração de Gram, teste de oxidase e fermentação da glucose e também por técnicas de biologia molecular, nomeadamente PCR. Foi feito o estudo da estrutura populacional de *E. coli* pela determinação dos grupos filogenéticos e testada a suscetibilidade a vinte e três antibióticos utilizando o método de difusão em agar. A deteção da produção de beta-lactamases de espectro alargado foi efetuada através do teste do duplo sinergismo (DDST). De um modo geral, os grupos filogenéticos com maior frequência foram o A1 (54%, 59/110), o A0 (22%, 24/110) e o B1 (21%, 23/110). Os grupos com menor frequência foram o D1 (3%, 3/110) e o D2 (1%, 1/110). Relativamente ao grupo B2 não se verificou a presença de isolados pertencentes a este grupo. Os antibióticos não beta-lactâmicos para os quais se

observou uma maior frequência de resistência foram as tetraciclinas (84%, 146/174), a estreptomicina (75%, 130/174), as sulfonamidas (73%,127/174), o trimetoprim (72%, 125/174), e a espectinomicina (56%, 98/174). Entre os antibióticos beta-lactâmicos a maior taxa de resistência foi observada para a amoxicilina e ácido clavulânico (16%, 28/174) cefotaxima (15%, 26/174) e a cefoxitina (13%, 23/174). Detetou-se a produção de beta-lactamases de espectro alargado em 14% (25/174) dos isolados testados. A elevada ocorrência de resistência a antibióticos nas *Enterobacteriaceae* testadas é preocupante, uma vez que bactérias resistentes a antibióticos e/ou os seus genes de resistência poder-se-ão disseminar no ambiente ou atingir o Homem através da cadeia alimentar, constituindo uma importante ameaça para a saúde pública.

## SUMMARY

Recognition of antimicrobial resistance as an emerging phenomenon in public health has been a worldwide problem. The scientific community has found the need for assessing susceptibility to antibiotics in "indicator bacteria" from various sources as a measure to combat increasing antimicrobial resistance. Commensal *Escherichia coli* bacteria colonize the gastrointestinal tract of most animals and human, allowing the study of the emergency, occurrence and spread of antibiotic resistance. In Portugal, most studies focuses on the research of ESBLs in *Enterobacteriaceae* from the feces of animals for human consumption. However, there are only few studies conducted on the evaluation of susceptibility profiles in *Enterobacteriaceae* from different types of samples of pig farms (feed, animals, water, sewage), on the occurrence of ESBLs and on the analysis of the population structure of this niche. The present study aims to: (i) test the susceptibility to various antibiotics in *Enterobacteriaceae*, from pigs and pig farms from Portuguese diverse environments, (ii) detect the occurrence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Portuguese pig farms and (iii) analyze the structure of the population of *Escherichia coli* from pigs and pig farms from Portuguese diverse environments. We analyzed samples from five Portuguese pig farms distributed by the North, Centre and South. After pre-enrichment, samples were inoculated onto MacConkey agar media with or without antibiotics. The different morphotypes were presumptively identified by performing Gram staining, oxidase test and glucose fermentation and also by molecular biology techniques, including PCR. The study of

the population structure of *E. coli* was made by determining the phylogenetic groups and the susceptibility to twenty three antibiotics was tested using the agar diffusion method. Detection of beta- lactamases production of extended spectrum was performed by testing the double synergism (DDST). In general, the most frequent phylogenetic groups were A1 (54%, 59 /110), A0 (22%, 24 /110) and B1 (21%, 23 /110). Otherwise, the less frequent groups were D1 (3%, 3/ 110) and D2 (1%, 1 /110). There was no evidence of the presence of strains belonging to the group B2. The non-beta-lactam antibiotics for which we observed a higher frequency of resistance were tetracycline (84%, 146/174), streptomycin (75%, 130/174), sulfonamides (73%, 127/174) trimethoprim (72%, 125/ 174) and spectinomycin (56%, 98 /174). Among the beta-lactam antibiotics the highest rate of resistance was observed for amoxicillin and clavulanic acid (16%, 28/174) cefotaxime (15%, 26/174) and ceftiofur (13%, 23/174). The production of broad spectrum beta- lactamase was verified in 14% (25 /174) of the isolates tested. The high incidence of antibiotic resistance in the tested *Enterobacteriaceae* is worrying, since antibiotic resistant bacteria and/or their resistance genes will be able to spread in the environment or achieving man through the food chain, constituting a major threat to public health.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, pelo carinho e paciência que sempre tiveram e por me terem proporcionado uma vida de estudante com acesso a tudo o que precisei. Sem vocês nunca teria conseguido.

Ao meu irmão e à Céu, pelo apoio que me têm dado, apesar de estarem longe.

À minha prima Helena, pelo carinho, compreensão e pelos bons momentos que passamos juntas.

A todos os meus amigos, em especial à Tânia e à Cidália, pela amizade e força que sempre me transmitiram, mas acima de tudo por estarem comigo nos bons e nos maus momentos.

À Professora Doutora Elisabete Machado, pela disponibilidade, profissionalismo e paciência que teve ao longo do trabalho laboratorial e escrito que a minha monografia exigiu.

A todos que de alguma forma, estiveram presentes no decorrer da minha vida académica e contribuíram para a minha formação como pessoa e profissional.

## ÍNDICE GERAL

I.	Introdução .....	15
1.	Uso de antibióticos em veterinária.....	15
2.	Resistência aos antibióticos em bactérias de origem animal.....	19
2.1.	Emergência e mecanismos de disseminação.....	21
2.2.	Transmissibilidade ao Homem.....	22
2.3.	<i>Enterobacteriaceae</i> como indicadores de pressão seletiva.....	24
2.4.	Mecanismos de resistência aos antibióticos em <i>Enterobacteriaceae</i> provenientes de animais para consumo humano .....	27
2.4.1.	Resistência a antibióticos beta-lactâmicos .....	29
2.4.2.	Resistência a quinolonas .....	31
2.4.3.	Resistência a outras famílias de antibióticos .....	32
3.	Impacto da resistência aos antibióticos na saúde pública .....	33
II.	Objetivos.....	36
III.	Material e Métodos .....	37
1.	Isolados bacterianos .....	37
2.	Identificação das espécies de <i>Enterobacteriaceae</i> e análise da estrutura populacional de <i>E. coli</i> .....	38
2.1.	Identificação presuntiva.....	38
2.2.	Identificação definitiva por técnicas de biologia molecular .....	38
2.2.1.	Extração de DNA.....	38
2.2.2.	Amplificação e sequenciação de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	38
2.2.3.	Eletroforese e visualização dos resultados .....	39
2.2.4.	Purificação de DNA para sequenciação .....	39
2.3.	Análise da estrutura populacional de <i>E. coli</i> .....	40
3.	Avaliação da suscetibilidade aos antibióticos .....	40
4.	Deteção da expressão de beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs) .....	41
IV.	Resultados .....	42
1.	Identificação e análise da estrutura populacional de <i>E. coli</i> .....	42
2.	Identificação de outras espécies de <i>Enterobacteriaceae</i> por sequenciação do gene <i>16S rDNA</i> .....	44

Estudo da suscetibilidade aos antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de  
suiniculturas Portuguesas

3. Avaliação da suscetibilidade aos antibióticos .....	44
V. Discussão.....	47
VI. Conclusão .....	52
VII. Bibliografia.....	53
VIII. Anexos .....	66
Anexo I.....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Venda das várias classes de antibióticos utilizados em veterinária para animais para consumo humano (incluindo cavalos), em miligramas por unidade de correção da população (mg/PCU), para 25 países em 2011.....	18
<b>Figura 2.</b> Venda de substâncias ativas por classes de antibiótico.....	19
<b>Figura 3.</b> Distribuição dos diferentes grupos filogenéticos pelos isolados de <i>E. coli</i> provenientes das suiniculturas analisadas .....	43
<b>Figura 4.</b> Percentagem de resistência aos antibióticos não beta-lactâmicos em <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas das diferentes suiniculturas analisadas .....	45
<b>Figura 5.</b> Percentagem de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas das diversas suiniculturas analisadas.....	46

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1.** Condições de amplificação e reacionais usadas na identificação de *E. coli* e na amplificação do gene *16S rDNA* ..... 38

**Tabela 2.** Condições de amplificação e reacionais usadas na análise da estrutura populacional de *E. coli*..... 40

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AEM – Agência Europeia do Medicamento  
AMC – Amoxicilina e Ácido Clavulânico  
AMK – Amicacina  
APR – Apramicina  
ATM – Aztreonamo  
Bp – Pares de bases  
CAZ – Ceftazidima  
CIP – Ciprofloxacina  
CLED – *Cysteine Lactose Electrolyte Deficient Medium*  
CLO – Cloranfenicol  
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*  
CTX – Cefotaxima  
DDST – *Double-disk synergy test*  
DHFR – Dihidrofolato redutase  
DHPS – Dihidropteroato sintetase  
DNA – *Deoxyribonucleic acid*  
dNTP's – Deoxinucleótidos trifosfatados  
*E. coli* – *Escherichia coli*  
EFSA – *European Food Safety Authority*  
EMB – *Eosin Methylene Blue*  
ESBLs – *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*  
ESVAC – *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption*  
FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*  
FEP – Cefepime  
FOX – Cefoxitina  
GEN – Gentamicina  
H<sub>2</sub>O – Água  
I - Intermédio  
IPM – Imipnemo  
KAN – Canamicina  
L – Litro

mg – Miligrama  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio  
min – Minuto  
MLST – *Multilocus Sequence Typing*  
mm – Milímetro  
mM - Milimolar  
NAL – Ácido Nalidíxico  
NEO – Neomicina  
NET – Netilmicina  
OIE – *World Organisation for Animal Health*  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PBPs – *Penicillin-Binding-Proteins*  
PCR – *Polymerase Chain Reaction*  
PCU – *Population Correction Unit*  
PFGE – *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*  
pmol – Picomol  
R – Resistente  
S – Sensível  
seg – Segundos  
SPT – Espectinomicina  
SS – *Salmonella-Shigella*  
STR – Estreptomicina  
SUL – Sulfonamidas  
TAE – Tris-Acetato EDTA  
TET – Tetraciclina  
TIG – Tigeciclina  
TMP – Trimetoprim  
TOB – Tobramicina  
TSB – *Trypticase Soy Broth*  
UE – União Europeia  
µg – Micrograma  
µL – Microlitro  
XLD – *Xylose Lysine Deoxycholate*

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Uso de antibióticos em veterinária

A introdução de antibióticos na década de 1940 para o tratamento de doenças infecciosas constituiu um grande avanço para a medicina humana (WHO, 2011). Os antibióticos são compostos químicos que matam ou inibem o crescimento de microrganismos. Podem ser produzidos naturalmente por microrganismos como fungos (por exemplo, a penicilina) e bactérias (por exemplo, as tetraciclina), ou podem ser obtidos sinteticamente ou semi-sinteticamente (como as fluoroquinolonas e a amoxicilina, respetivamente) (Jensen *et al.*, 2006; Kalmokoff *et al.*, 2010). Algumas das classes de antibióticos são usadas simultaneamente em medicina humana e em medicina veterinária, tais como os beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), sulfonamidas (associadas ou não ao trimetoprim), tetraciclina, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas e também quinolonas (incluindo as fluoroquinolonas), possuindo uma variedade de aplicações terapêuticas e preventivas em animais destinados ao consumo humano (Dibner e Richards, 2005).

Na sequência da utilização de antibióticos na medicina, estes foram introduzidos na medicina veterinária em 1950 e usados intensivamente na produção intensiva de animais para consumo humano como tratamento, mas também profilaticamente para evitar o desenvolvimento de doenças infecciosas num grande número de animais, pelo que grandes quantidades de antibióticos são usados anualmente nestes locais de produção. As suiniculturas são um dos locais onde parece existir um grande uso de antibióticos (Bibbal *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2013; Kalmokoff *et al.*, 2010). Os mecanismos pelos quais os antibióticos afetam a eficiência alimentar e o ganho de peso não estão totalmente compreendidos, de qualquer modo promovem o crescimento do animal e a rentabilidade económica do produtor (Jensen *et al.*, 2006; Kalmokoff *et al.*, 2010).

Nos Estados Unidos, o uso de antibióticos como promotores de crescimento aumentou cinquenta vezes entre 1951 e 1978, sendo que o aumento do uso de

antibióticos para tratamento de infeções em animais e humanos aumentou cerca de dez vezes. Durante este período, muitos dos isolados bacterianos provenientes de humanos e de animais que eram previamente suscetíveis aos antibióticos, tornaram-se resistentes aos mesmos (Snary *et al.*, 2004).

O uso de antibióticos como promotores de crescimento continuou até 1986, quando a Suécia proibiu a sua utilização. Durante os 10 anos seguintes cresceu a preocupação sobre o aumento contínuo da resistência aos antibióticos. Os investigadores verificaram que a utilização de antibióticos na alimentação animal poderia representar riscos para a saúde humana devido à disseminação de bactérias resistentes através da cadeia alimentar (van der Fels-Klerx *et al.*, 2006; Snary *et al.*, 2004). Consequentemente, alguns países proibiram a utilização de antibióticos como promotores de crescimento, como a Dinamarca e a Noruega, que proibiram a avoparcina em 1995. Posteriormente, em 1997, foi retirada a autorização de utilização de avoparcina em toda a União Europeia (UE) (van der Fels-Klerx *et al.*, 2006; WHO, 2011). Desde 1997, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendou que o uso de antibióticos como promotores de crescimento em animais fosse proibido devido ao risco que estes apresentam para a saúde pública (WHO, 2011).

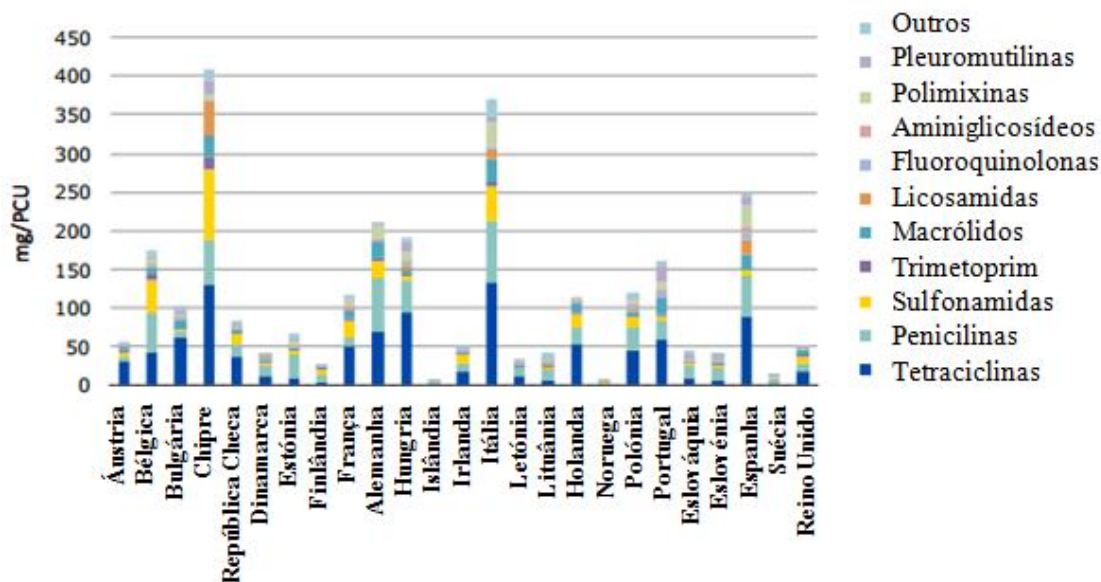
A partir de 2006 foi proibido o uso destas moléculas na UE (Snary *et al.*, 2004; WHO, 2011). Um estudo efetuado na Dinamarca revelou que entre 1992 e 2008 o consumo de antibióticos por quilograma de suíno produzido caiu mais de 50%. Esta diminuição esteve associada à implementação de medidas para interromper o seu uso como promotores de crescimento. Durante esse período a produtividade melhorou significativamente, sugerindo que a mudança no consumo de antibióticos não prejudicou a produtividade animal a longo prazo (WHO, 2011).

Em suínos são frequentemente observadas infeções bacterianas entéricas, as quais têm uma importância crescente por conduzirem a grandes perdas económicas na indústria de suínos em todo o mundo (Menin *et al.*, 2008). Estas infeções podem levar a altas taxas de mortalidade e morbidade, sendo que as maiores perdas estão relacionadas com sequelas no trato gastrointestinal dos suínos. Como estas lesões

podem ser transitórias ou permanentes, verifica-se o atraso no crescimento do animal, a redução da eficiência alimentar e o custo com os tratamentos e alimentação adicionais, verificando-se assim uma maior utilização de antibióticos neste setor (Kools *et al.*, 2008; Menin *et al.*, 2008). De uma forma geral, os antibióticos são usados durante o desmame de suínos para tratamento de distúrbios gastrointestinais e mais tarde no tratamento de infeções intestinais (macrólidos) ou pneumonias (penicilinas e fluoroquinolonas) (Phillips *et al.*, 2004; Landers *et al.*, 2012).

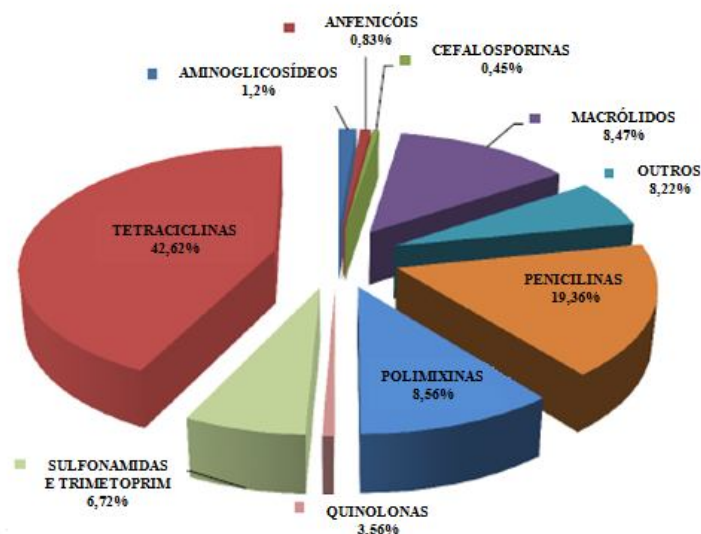
Atualmente, a maioria dos países não possui nenhum sistema de vigilância para o uso de antibióticos, existindo no entanto na UE a Agência Europeia do Medicamento, que trabalha para o desenvolvimento da vigilância do uso de antibióticos através da implementação de um projeto de monitorização do consumo de antimicrobianos em veterinária – ESVAC (*European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption*). Este projeto permite a recolha de dados do número de vendas e da utilização de antibióticos nos grandes grupos de espécies animais, nos diferentes Estados Membros da UE (DGV, 2010; EMEA, 2013). Segundo dados da venda de antibióticos na UE, verificou-se um maior número de vendas para tetraciclinas (37%), penicilina (23%), sulfonamidas (11%) e polimixinas (7%) (dados de 2011) (EMEA, 2013). Do número total de vendas houve uma maior utilização de formas farmacêuticas para tratamento em grupo, entre as quais, pó para administração oral (48%), pré-misturas (36%) e soluções orais (8%), enquanto que para tratamento individual as vendas são menores, nomeadamente, formas injetáveis (7%) e outras formas de aplicação (1%) (intra-mamária e intra-uterina) (dados de 2011) (EMEA, 2013). Em países como a Dinamarca, Noruega, Finlândia, Estónia e Suécia, a utilização de antibióticos é relativamente baixa, devido às medidas implementadas que restringem o seu uso (Figura 1) (EMEA, 2013).

**Figura 1.** Venda das várias classes de antibióticos utilizados em veterinária para animais para consumo humano (incluindo cavalos), em miligramas por unidade de correção da população (mg/PCU), para 25 países em 2011 (adaptado de EMEA, 2013).



Segundo dados da Direcção-Geral de Veterinária sobre a venda de antibióticos para animais em Portugal, verificou-se um maior número de vendas na classe das tetraciclina, seguido das penicilinas, polimixinas e macrólidos (dados do ano 2010), sendo que estas quatro classes de antimicrobianos, em conjunto, representam cerca de 80% das vendas (Figura 2) (DGV, 2010). Estes dados vão de encontro aos reportados para o programa ESVAC da EMEA (Figura 1).

**Figura 2.** Venda de substâncias ativas por classes de antibiótico (adaptado DGV, 2010).



Neste país, dos medicamentos antimicrobianos destinados à veterinária, 85,31% foram utilizados em suínos e 11,83% em aves (não sendo contabilizadas neste estudo aves canoras e ornamentais) (dados do ano 2010). A maior utilização de antibióticos em suínos e aves poderá estar relacionada com o tipo de exploração destes animais em Portugal, nomeadamente a produção intensiva (DGV, 2010).

## 2. Resistência aos antibióticos em bactérias de origem animal

O elevado uso de antibióticos em humanos e também em veterinária, nomeadamente, na produção de animais para consumo humano é um dos grandes fatores para o desenvolvimento de resistência em várias espécies bacterianas, pois alguns antibióticos não são metabolizados, sendo excretados intactos através da urina e das fezes, podendo deste modo contaminar o ambiente e colonizar outros animais e indivíduos (Landers *et al.*, 2012; Martinez, 2009).

Tanto o Homem como os animais podem ser uma fonte de bactérias resistentes aos antibióticos, uma vez que o desenvolvimento da resistência poderá estar associado à colonização do intestino com bactérias resistentes provenientes do meio ambiente e da alimentação, ou através da troca de elementos genéticos que codificam para resistência

entre bactérias entéricas e bactérias provenientes do ambiente ou alimentos (Martinez, 2009; Phillips *et al.*, 2004). Animais selvagens, como gaivotas e roedores podem adquirir essa resistência no meio ambiente e transmiti-la a animais destinados ao consumo humano, através das fezes depositadas nas pastagens e outros géneros alimentícios destinados à alimentação (Phillips *et al.*, 2004). Recentemente foi noticiada a presença de bactérias multirresistentes em mamíferos (lobos, raposas, veados, coelhos e lontras) e em aves (pássaros e gaivotas) selvagens, sem exposição aparente a antimicrobianos (Costa *et al.*, 2013). Existindo um conjunto de fatores importantes relacionados com a aquisição de resistência bacteriana, nomeadamente a presença de concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos em locais onde estas aves procuram alimento, assim como a diversidade bacteriana existente no ambiente, sugerindo que o desenvolvimento da resistência bacteriana não se limita ao nicho ecológico onde surge inicialmente ou onde existe uma grande pressão de antibióticos (Collignon *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2013; Selvam *et al.*, 2012).

Por outro lado, o crescente aumento de animais de companhia, bem como o aumento da esperança média de vida destes, levou a um acréscimo na prescrição de antimicrobianos neste grupo, tendo como consequência o desenvolvimento de resistências bacterianas que podem passar para o Homem devido ao contacto próximo destes animais com o Homem (Costa, *et al.*, 2013). Foi já documentada a presença de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Enterococcus* spp. resistentes a antibióticos, em cães e gatos (Costa *et al.*, 2013).

Bactérias comensais de animais são frequentemente encontradas em alimentos para consumo humano, podendo servir como reservatório para genes de resistência que podem ser transferidos para o Homem, através da cadeia alimentar (Landers *et al.*, 2012). Animais destinados à alimentação como porcos, frangos, perus e bovinos são desta forma uma fonte de espécies bacterianas que podem causar infeções em humanos, incluindo as espécies *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (Collignon *et al.*, 2009). Alguns estudos descreveram a resistência à ciprofloxacina observada em isolados de *Campylobacter* spp. provenientes de frangos, assim como a presença de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em

amostras de carne de bovino, vitela, cordeiro, carneiro, porco, peru e frango, adquiridas num mercado Holandês (Collignon *et al.*, 2009; Marshall e Levy., 2011).

### **2.1. Emergência e mecanismos de disseminação**

A exposição da flora intestinal aos antibióticos é um fator determinante no desenvolvimento de resistência. Quando o antibiótico é administrado ao animal, o nível de desenvolvimento e o tempo de exposição da microflora intestinal ao antibiótico dependem do modo de administração do fármaco, havendo uma maior exposição através da administração por via oral (Bibbal *et al.*, 2007).

As bactérias podem desenvolver mecanismos de resistência aos antibióticos através de mutações espontâneas ou da aquisição de genes de outras bactérias por conjugação (que envolve o contacto direto de células, transferência de plasmídeos ou transposões), transdução (mediada por bacteriófagos) ou a transformação (envolvendo a captação de DNA livre resultante de lise bacteriana). Para que estes fenómenos ocorram é necessário a existência de plasmídeos, sequências de inserção, transposões, integrões e/ou *cassettes* genéticas que codifiquem para genes de resistência nas células bacterianas (Antunes *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2013; Giedraitienė *et al.*, 2011; Silva e Mendonça, 2012).

A ocorrência de determinados genes de resistência entre bactérias pertencentes a diferentes ecossistemas poderá indicar a existência de um fluxo genético entre células pertencentes a diferentes comunidades. A mobilidade genética permite a fácil disseminação dos genes de resistência aos diferentes antibióticos e também a sua acumulação em alguns clones multirresistentes (Giedraitienė *et al.*, 2011; Silva e Mendonça, 2012). Quando os genes de resistência a antibióticos estão associados a plasmídeos, a resistência dissemina-se mais rapidamente entre as bactérias, quando se encontra associada a genes localizados no cromossoma, a disseminação da resistência é mais lenta (Giedraitienė *et al.*, 2011). Além disso, as bactérias podem conservar a resistência por longos períodos, mesmo na ausência de exposição a antibióticos,

podendo observar-se ainda hoje bactérias resistentes a antibióticos que são raramente utilizados na terapêutica (Martinez, 2009; Silva e Mendonça, 2012).

Através da transferência horizontal de genes pode ocorrer a difusão simultânea de resistência a diferentes classes de antibióticos, em particular se os genes para a resistência se localizam no elemento genético transmissível. Este modo de disseminação de genes pode levar a fenómenos de co-resistência, devido à transferência em simultâneo de genes que conferem resistência a várias classes de antibióticos (Choudhury *et al.*, 2012). Assim, a utilização de um tipo de antibiótico pode provocar resistência não só ao mesmo antibiótico, mas também a outros antibióticos da mesma classe ou até de outras classes (Antunes *et al.*, 2006; Bibbal *et al.*, 2007).

A elevada presença de bactérias que apresentam genes de resistência aos antibióticos em suínos, comparativamente a bovinos e ovinos, pode ser justificada pela quantidade de antibióticos vendidos para a produção de várias espécies animais (Selvam *et al.*, 2012).

## **2.2. Transmissibilidade ao Homem**

A transmissão de bactérias resistentes e genes de resistência de animais para o Homem ocorre muitas vezes pelo contacto direto com animais ou o ambiente (exposição ocupacional) onde estes se encontram, ou através da contaminação de produtos alimentares de origem animal (transmissão através da cadeia alimentar). Por exemplo, as espécies bacterianas *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp. e *E. coli* podem contaminar os alimentos em várias etapas do processamento de alimentos (EFSA, 2013; Phillips *et al.*, 2004). Outro tipo de alimentos como frutas e vegetais contaminados por dejetos dos animais ou água contaminada podem também constituir uma via de transmissão (Alali *et al.*, 2008). Foi reportada a presença de isolados de *E. coli* resistentes a vários antibióticos em produtos hortícolas num mercado em Londres, durante uma investigação de um surto causado por *E. coli* (Phillips *et al.*, 2004). Na Holanda, foi descrita a resistência de *Enterococcus* spp. a glicopéptidos nas fezes de um criador de perus e a resistência de *Enterococcus faecium* a estreptograminas nas fezes

de um criador de frangos (EFSA, 2013). No Canadá foi reportada numa exploração de frangos (ambiente e frangos) a presença de *Enterococcus* spp. resistentes a vários antibióticos, incluindo lincosamidas, tetraciclinas penicilina e ciprofloxacina (Furtula *et al.*, 2013).

A resistência aos antibióticos verificada em bactérias isoladas de alimentos para consumo humano tem sido vista como uma potencial fonte de transmissão da resistência ao Homem, através da cadeia alimentar (Bywater *et al.*, 2004). Alguns estudos efetuados em suínos têm demonstrado que os tratamentos antimicrobianos utilizados na indústria de produção animal são responsáveis pelo aumento da resistência aos antibióticos em bactérias entéricas e zoonóticas provenientes de suínos, aumentando o risco destas bactérias serem transmitidas ao Homem pela cadeia alimentar (Delsol *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2011; van der Fels-Klerx *et al.*, 2011).

Num estudo realizado em vários países da Europa em isolados de bactérias zoonóticas provenientes de animais para consumo (suínos, frangos e bovinos) observaram-se diferenças nos níveis de resistências aos antibióticos entre as diversas espécies bacterianas, sendo que a resistência foi maior para *E. coli*, de seguida para *Campylobacter* spp. e por último para *Salmonella* spp. Para *E. coli* verificou-se uma elevada resistência em isolados de suínos provenientes de Espanha para vários antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclinas e trimetoprim /sulfametoxazol). Para *Campylobacter* spp. a maior resistência foi observada para o ácido nalidíxico e ciprofloxacina em isolados de frangos (provenientes da França e da Noruega) e para o ácido nalidíxico em isolados de bovinos (Bywater *et al.*, 2004).

Segundo dados da UE, em 2011, a zoonose mais comum e que tem vindo a aumentar nos últimos anos é a causada por *Campylobacter* spp., pois a presença desta bactéria em carne de frango continua a ser elevada (EFSA, 2013). Embora tenha vindo a diminuir o número de casos de zoonoses provocadas por *Salmonella* spp., a sua presença é frequentemente encontrada em carnes e produtos derivados, tendo-se observado uma diminuição em carne de frango devido à implementação de programas de controlo de *Salmonella* spp. (EFSA, 2013). O número de infeções reportadas em

humanos também tem vindo a aumentar para *E. coli* patogénicas (Síndrome hemolítica urémica), sendo mais comum em carne de bovinos (EFSA, 2013). Apesar do número de casos ter sido maior em 2011 do que em 2010, as infeções causadas por *Yersinia enterocolitica* têm vindo a diminuir ao longo dos anos (habitualmente associada a carne de porco e suínos) (EFSA, 2013).

### **2.3. *Enterobacteriaceae* como indicadores de pressão seletiva**

As *Enterobacteriaceae* constituem uma família numerosa de géneros e espécies de bacilos de Gram negativo que possuem várias características em comum, tais como, serem aeróbios-anaeróbios facultativos, não possuírem a capacidade de formar esporos, poderem ter mobilidade através de flagelos ou serem imóveis, fermentarem a glucose e outros açúcares com ou sem produção de gás, produzirem a catalase, reduzirem nitratos a nitritos e serem citocromo-oxidase negativos. A ausência de citocromo-oxidase e a fermentação da glucose são características importantes para a diferenciação de outras famílias, como *Pseudomonadaceae* e *Vibrionaceae* (Denton, 2007; Ferreira e Sousa, 2000). Crescem facilmente em diferentes meios de cultura, nomeadamente em meios diferenciais como CLED (*Cysteine Lactose Electrolyte Deficient Medium*) agar, e em meios seletivos e diferenciais como MacConkey agar, o EMB (*Eosin Methylene Blue*) agar o XLD (*Xylose Lysine Deoxycholate*) agar, ou o SS (*Salmonella-Shigella*) agar (Ferreira e Sousa, 2000).

Esta família de bactérias ocupa diferentes nichos ecológicos, podendo encontrar-se distribuída pelo solo, plantas, água e também na flora intestinal de humanos e animais (Kijima-Tanaka *et al.*, 2003; van den Boogard e Stobberingh, 2000; Varga *et al.*, 2008). Alguns organismos desta família são agentes causadores de infeções intestinais (diarreias) em humanos e em animais, como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Yersinia enterocolitica* entre outras, sendo denominados de agentes patogénicos entéricos. Podem também ser agentes causadores de infeções extra-intestinais, como infeções urinárias, sépsis, meningite (por exemplo, *E. coli*) ou pneumonia (frequentemente *Klebsiella* spp.) (Escobar-Páramo *et al.*, 2006; Kijima-Tanaka *et al.*, 2003).

Na flora intestinal do Homem e dos animais estas bactérias (aí presentes em grande número) estão expostas a agentes antimicrobianos essencialmente administrados por via oral, e que passam por isso pelo intestino, potenciando emergência de bactérias resistentes e/ou as trocas de material genético (contendo genes de resistência) entre elas. Daí que a flora intestinal do Homem e dos animais seja considerada o mais importante reservatório de bactérias resistentes e de genes de resistência aos antibióticos (Pena *et al.*, 2004; van den Boggard e Sotobberingh, 2000).

A espécie bacteriana *E. coli* é uma das mais prevalentes no intestino dos animais e dos humanos. É por isso frequentemente utilizada como bactéria indicadora da pressão seletiva causada pelos antibióticos usados na produção de animais para consumo humano, uma vez que o seu isolamento e identificação são relativamente fáceis (Bibbal *et al.*, 2009; Knezevic e Petrovic, 2008; Moreno *et al.*, 2006; van den Boggard e Sotobberingh, 2000). A utilização de *E. coli* como indicador de pressão seletiva é importante, uma vez que as mudanças na suscetibilidade aos antibióticos, verificadas nestes organismos podem conduzir ao desenvolvimento de resistência em bactérias potencialmente patogénicas (Bibbal *et al.*, 2009; Knezevic e Petrovic, 2008).

A análise da estrutura populacional de *E. coli* (clonalidade) pode ser efetuada por várias técnicas, tais como, PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), MLST (*Multilocus Sequence Typing*) ou por determinação dos grupos filogenéticos, sendo esta última, uma forma mais de *screening* que se baseia na deteção por PCR dos genes *chuA* e *yjaA* e fragmentos de DNA do gene *TspE4.C2* (Clermont *et al.*, 2000; Johnson e Stell, 2000; Rodríguez-Baño *et al.*, 2012). Segundo vários autores, existem quatro grupos filogenéticos principais de *E. coli*: A, B1, B2 e D (Rodríguez-Baño *et al.*, 2012; Carlos *et al.*, 2010; Clermont *et al.*, 2000; Le Gall *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2006). De modo a melhorar o estudo populacional de *E. coli* foi proposto o uso dos sub-grupos A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, B1, B2<sub>2</sub>, B2<sub>3</sub>, D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, que são determinados pelas diferentes combinações dos marcadores genéticos referidos na técnica proposta por Clermont *et al.* (2000) (Carlos *et al.*, 2010; Escobar-Páramo *et al.*, 2006).

Estes grupos apresentam diferentes características genotípicas e fenotípicas. Aparentemente diferem nos diferentes nichos ecológicos que ocupam e em algumas características, como a taxa de crescimento, a utilização de açúcares, a resistência a antibióticos, a presença de fatores de virulência e o tamanho do genoma (Carlos *et al.*, 2010; Le Gall *et al.*, 2007; Vignaroli *et al.*, 2012). De um modo geral, as bactérias dos grupos A e B1 estão associadas à flora comensal do intestino, a uma baixa patogenicidade pelo facto de existir uma baixa probabilidade de apresentarem fatores de virulência e a uma maior resistência aos antibióticos, comparativamente às bactérias dos grupos B2 e D que apresentam uma menor resistência aos antibióticos e associam-se a uma maior patogenicidade, pela presença de um maior número de fatores de virulência responsáveis pela causa de infeções extra-intestinais (Asai *et al.*, 2011; Carlos *et al.*, 2010; Clermont *et al.*, 2000; Silva e Mendonça, 2012). A elevada presença de fatores de virulência nas bactérias associadas a infeções extra-intestinais (B2 e D), tais como toxinas, adesinas, sideróforos, invasinas e revestimentos de polissacarídeos, facilita a colonização e invasão do hospedeiro, a diminuição dos mecanismos de defesa do hospedeiro e a lesão dos tecidos, justificando o facto das bactérias pertencentes aos grupos B2 e D possuírem um genoma maior que as bactérias pertencentes a outros grupos (Bok *et al.*, 2013; Cooke *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2001). Consequentemente, os isolados de *E. coli* pertencentes aos grupos B2 e D são bons modelos para investigar a evolução da virulência bacteriana e da resistência aos antibióticos, já que são frequentemente responsáveis por muitas infeções extra-intestinais, constituindo um importante problema de saúde pública (Carlos *et al.*, 2010, Le Gall *et al.*, 2007).

Segundo Escobar-Páramo *et al.* (2006) que comparou a distribuição dos grupos filogenéticos em amostras de fezes de aves, mamíferos animais e humanos, verificou uma prevalência dos grupos B1 e D em aves, A e B1 em mamíferos animais e A e B2 em humanos (Escobar-Páramo *et al.*, 2006). Outro autor descreveu uma maior prevalência do grupo A em suínos e bovinos e do grupo A e D em frangos, verificando-se uma maior resistência a cefalosporinas nos isolados de *E. coli* do grupo A (68,4%), enquanto os outros grupos, à exceção do grupo B2 obtiveram valores de resistência entre 8,6 e 14,4% (Asai *et al.*, 2011). Num estudo efetuado por Moreno *et al.* (2006) em isolados de *E. coli* de origem humana, verificou-se que os pertencentes aos grupos filogenéticos A e B1 possuíam uma maior resistência às fluoroquinolonas (74%) e um

menor número de fatores de virulência, comparativamente aos isolados do grupo B2 (nestes a sensibilidade às fluoroquinolonas foi de 76%) (Moreno *et al.*, 2006). O facto das bactérias pertencentes aos grupos A e B1 estarem associadas a uma maior resistência aos antibióticos poderá estar relacionado com a pressão exercida pelo elevado uso de antibióticos no tratamento de infeções em humanos e em animais, levando à seleção de bactérias resistentes (Johnson *et al.*, 2003; Le Gall *et al.*, 2007).

#### **2.4. Mecanismos de resistência aos antibióticos em *Enterobacteriaceae* provenientes de animais para consumo humano**

A grande utilização de antibióticos em animais em todo o mundo, sobretudo na produção de animais para consumo humano, pode favorecer o desenvolvimento de resistências bacterianas, levando a que cada vez mais os antibióticos utilizados em clínica sejam menos eficazes no tratamento de infeções (Giedraitienė *et al.* 2011).

Existem vários estudos que documentam a presença de elevadas taxas de resistência em bactérias provenientes de animais para consumo humano. Em Portugal verificou-se uma elevada resistência em sulfonamidas, quinolonas, e tetraciclina, em isolados de *E. coli* provenientes de amostras de fezes de suínos (Jones-Dias *et al.* 2013; Pena *et al.*, 2004; Hendriksen *et al.*, 2008).

Segundo um estudo realizado em doze países da UE, em que foi testada a suscetibilidade em vários isolados de *E. coli* provenientes de suínos doentes durante um período de três anos, observou-se uma elevada resistência a vários antibióticos, nomeadamente: tetraciclina (Portugal: 98% em 2004), ampicilina (Espanha: 72,2% em 2004; Holanda: 93% em 2003) e estreptomicina (Letónia: 92% em 2004) (Hendriksen *et al.*, 2008). Foi também testada a suscetibilidade em isolados de *E. coli* provenientes de suínos saudáveis, obtidos a partir de onze países da Europa durante o mesmo período, tendo-se verificado uma menor resistência bacteriana do que no estudo anterior (Hendriksen *et al.*, 2008). Apesar da baixa resistência nos suínos saudáveis, o nível de

resistência pareceu aumentar para alguns antibióticos, como estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclina e trimetoprim (Hendriksen *et al.*, 2008).

Dados dos Estados Unidos demonstram a presença de *E. coli* em amostras de carne de frango, peru e porco, em que a resistência foi mais elevada para tetraciclina (50,3%), estreptomicina (36,4%) e sulfametoxazole (31,6%) (Zhao *et al.*, 2012). No Canadá verificou-se a presença de isolados de *E. coli* provenientes de fezes de suínos aparentemente saudáveis, com elevada resistência a tetraciclina (66,8%), sulfametoxazole (46,0%) e estreptomicina (33,4%) (Rosengren *et al.*, 2008). Foi também documentado no Brasil, em leitões com diarreia, a presença de isolados de *E. coli* e de *Salmonella* spp. com diferentes níveis de resistência a vários antibióticos, nomeadamente oxitetraciclina (94% e 77%, respetivamente), tetraciclina (89,5% e 42,1%) e norfloxacina (83,3% e 39,3%), e em menor grau neomicina (55% e 6,2%) e gentamicina (62,7% e 3,5%) (Menin *et al.*, 2008).

Outros autores descrevem a presença de elevadas resistências em países do Sudoeste Asiático (Tang *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012). Na China foi observada uma elevada resistência a vários antibióticos como ampicilina, trimetoprim, sulfonamidas, tetraciclina, neomicina, estreptomicina, canamicina, ciprofloxacina e ofloxacina com elevadas taxas de resistência (81,9% - 100%) em isolados de *E. coli* extraintestinais recolhidos de suínos, entre 2004 e 2007 (Tang *et al.*, 2012). Noutros países como a Malásia, a Tailândia e o Vietnã observou-se uma elevada resistência à ampicilina (22 - 49%), tetraciclina (41 - 92%) e sulfonamidas (17 - 68%) em isolados de *Salmonella* spp. obtidos de animais para consumo humano (Hao Van *et al.*, 2012).

A elevada resistência aos antibióticos em animais para consumo humano observada em vários países, incluindo Portugal, entre os quais beta-lactâmicos, quinolonas, tetraciclina e sulfonamidas, é atualmente um problema de saúde pública dado serem antibióticos frequentemente utilizados em clínica para tratamento de infeções bacterianas causadas por *Enterobacteriaceae* (EMEA, 2013). Face a este problema, a OMS desenvolveu uma lista de antibióticos criticamente importantes para a medicina humana, entre os quais, fluoroquinolonas, macrólidos e cefalosporinas de

terceira e quarta geração, destacando a necessidade de melhorar a sua utilização em animais destinados ao consumo humano (Collignon *et al.*, 2009; EMEA, 2013).

#### **2.4.1. Resistência a antibióticos beta-lactâmicos**

As *Enterobacteriaceae* podem apresentar vários mecanismos de resistência a esta classe de antibióticos, tais como a redução do acesso aos PBPs por alteração ou diminuição dos canais de porina impedindo a entrada dos antibióticos na célula, ou, mais comumente, pela inativação enzimática através da hidrólise do anel beta-lactâmico presente nos beta-lactâmicos, por quebra da ligação amida do anel beta-lactâmico, através de beta-lactamases, como por exemplo as penicilinases que degradam as penicilinas e as cefalosporinases que degradam as cefalosporinas (Hasman *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2007; Paterson e Bonomo, 2005). Contudo, a ação hidrolítica de algumas beta-lactamases não é eficaz sobre os carbapenemos e pode também ser inibida por antibióticos como o ácido clavulânico, tazobactam e sulfactam, conhecidos como inibidores de beta-lactamases (Mosquito *et al.*, 2011).

As beta-lactamases estão organizadas em várias classes de acordo com a sequência de aminoácidos presentes nas moléculas das enzimas (Sousa, 2006). Na classe A encontram-se por exemplo as TEM-1, TEM-2 e SHV-1, enzimas que possuem serina no centro ativo e que permitem a hidrólise de algumas cefalosporinas (segunda, terceira e quarta geração) e penicilinas, sendo produzidas, mais vulgarmente por *Klebsiella* spp. e *E. coli*, no entanto, também podem ser produzidas por outras bactérias de Gram negativo como *Salmonella* spp. e *Enterobacter* spp. As enzimas da Classe B designam-se de metalo-beta-lactamases, contêm zinco no centro ativo e são raras, embora estejam a aumentar nos últimos anos. Da classe C fazem parte as beta-lactamases do tipo AmpC cromossómicas, por exemplo, as quais são resistentes à inibição pelos inibidores de beta-lactamases, apesar de hidrolisarem a maioria dos antibióticos beta-lactâmicos (são usualmente designadas de cefalosporinares). A classe D inclui enzimas do tipo OXA, capazes de hidrolisar as oxacilinas (Agersø *et al.*, 2012; Hawkey, 2008; Hiroi, 2011; Horton *et al.*, 2011, Mosquito *et al.*, 2011; Rayamajhi, *et al.*, 2008). Destas quatro classes de beta-lactamases, as enzimas das classes A e C têm

vindo a aumentar com os atuais níveis de pressão antibiótica verificada em explorações de animais para consumo, assim como o elevado uso de cefalosporinas de terceira e quarta geração no Homem (Dahshan *et al.*, 2010; Paterson e Bonomo, 2005).

Na Europa, as ESBLs mais comuns em animais para consumo são do tipo CTX-M-1, CTX-M-14, TEM-52 e SHV-12, provenientes de isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp. (EFSA, 2011). A presença de ESBLs da família CTX-M em animais para consumo humano, tais como, bovinos, frangos e suínos é cada vez mais comum (Ewers *et al.*, 2012; Horton *et al.*, 2011). Por exemplo, CTX-M-1 foi reportada em vários países, nomeadamente, em França em isolados de *Salmonella enterica* de frangos e de humanos, em Espanha e na Dinamarca em *E. coli* isoladas de suínos, e na Holanda em *E. coli* provenientes de bovinos (Agersø *et al.*, 2012; Cloeckaert *et al.*, 2010; Hawkey, 2011; Horton *et al.*, 2011). Na Holanda, Grécia e França foi detetada a presença de outras ESBLs em isolados de *Salmonella* spp. de origem animal, nomeadamente CTX-M-2, CTX-M-9 e CTX-M-32 (Ewers *et al.*, 2012; Riaño *et al.*, 2006). Já em Espanha foram detetadas ESBLs do tipo CTX-M-14 e SHV-12 em *E. coli* isoladas de fezes de galinhas saudáveis (2000 e 2001) (Briñas *et al.*, 2003). Em outros países foram ainda descritas outras variantes de ESBL.

Relativamente a Portugal, têm sido observadas ESBLs do tipo TEM-52, SHV-2 e CTX-M-1 em frangos, SHV-12 em suínos, assim como várias variantes ESBL em animais selvagens, gaivotas, lobo ibérico e também nas suas presas (javalis, veados e coelhos) (Costa *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2008).

No caso das beta-lactamases do tipo AmpC adquiridas ou plasmídicas, a mais comum em animais é a CMY-2, tendo sido detetada em *Salmonella* spp. isolada de carne de animais para consumo humano em vários países, como Portugal, Alemanha, Irlanda, Suécia, Dinamarca, Finlândia, Estados Unidos, Canadá, Japão e China (Agersø *et al.*, 2012; Börjesson *et al.*, 2013; EFSA, 2011; Hao Van *et al.*, 2012; Hiroi *et al.*, 2012).

De uma forma geral, embora a maioria dos estudos ainda sejam maioritariamente feitos em isolados bacterianos de amostras humanas, tem-se verificado o aumento de ESBLs em animais para consumo humano, nomeadamente a presença de CTX-M em *Enterobacteriaceae* provenientes de frangos, suínos, bovinos, assim como de alimentos de origem animal (carne e leite), indicando que os animais podem tornar-se reservatórios ou mesmo fontes de infeção, contribuindo para a disseminação destas resistências (Ewers *et al.*, 2012; Geser *et al.*, 2012; Pitout *et al.*, 2005).

#### **2.4.2. Resistência a quinolonas**

Esta classe de antibióticos é considerada importante para o tratamento de pneumonia em bovinos jovens e ovelhas, mastites graves causadas por bactérias de Gram negativo e diarreias neonatais em leitões e bezerros (causadas por *E. coli*) (EMEA, 2006). Em bactérias de Gram negativo, como *E. coli*, a resistência às quinolonas pode ocorrer através de mutações produzidas na enzima DNA girase, mais concretamente no gene *gyrA*, assim como mutações no gene *parC*, que codificam para a DNA girase e para a topoisomerase IV, respetivamente (EMEA, 2006; Fortini *et al.*, 2011; Giedraitienė *et al.*, 2011; Veldman *et al.*, 2011). Também podem existir outros tipos de resistência, através de genes mediados por plasmídeos, como os genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*) que codificam para proteínas Qnr que se unem à DNA girase e topoisomerase IV impedindo o enrolamento do DNA, levando a que a replicação deste seja inibida (Carattoli, 2009; Fortini *et al.*, 2011; Giedraitienė *et al.*, 2011; Jacoby, 2005; Nordmann e Poirel, 2005; Rice, 2012; Schwarz e Chaslus-Dancla, 2001).

As consequências do surgimento de resistência às fluoroquinolonas entre bactérias de origem animal dependem da doença a tratar, assim como da disponibilidade de substâncias alternativas para o seu tratamento. Em alguns países da UE as fluoroquinolonas representam uma das poucas opções de tratamento farmacológico para algumas espécies de animais para consumo humano, uma vez que as substâncias alternativas podem não ser tão eficientes, devido a resistências, e deste modo comprometer a terapêutica a utilizar (EMEA, 2006).

Num estudo realizado em Portugal em isolados de *Salmonella* spp. e *E. coli* resistentes a quinolonas e provenientes de animais para consumo humano e de carne de vários animais (suínos, frangos, bovinos e coelhos), observou-se uma maior prevalência dos genes *qnrS1*, seguida de *qnrB2* e *qnrB19*, tendo-se verificados também mutações nos genes *gyrA* e *parC* (Jones-Dias *et al.*, 2013). Segundo Veldman *et al.* (2011), em isolados de *Salmonella enterica* e *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas e ácido nalidíxico provenientes de animais para consumo (frangos, perus, suínos, bovinos e ovelhas) e de humanos de 13 países da Europa, houve uma maior prevalência dos genes *qnrS1* e variantes de *qnrB* em *Salmonella* spp. e dos genes *qnrS1* e *qnrD* em *E. coli* (Veldman *et al.*, 2011). Os isolados de *Salmonella* spp. resistentes a fluoroquinolonas e ácido nalidíxico foram obtidos maioritariamente de humanos, aves e perus, dos seguintes países: Espanha, Holanda, Reino Unido, Alemanha e Dinamarca (Veldman *et al.*, 2011). Num outro estudo realizado na Holanda, foi observada a presença dos genes *qnrS1* e *qnrB19* em isolados de *E. coli* provenientes de animais para consumo (Veldman *et al.*, 2012).

#### **2.4.3. Resistência a outras famílias de antibióticos**

A resistência às sulfonamidas pode ocorrer pela expressão dos genes *sul1*, *sul2* e *sul3*, que codificam a produção de enzimas alternativas às enzimas constitutivas dihidropteroato sintetase (DHPS) e dihidrofolato redutase (DHFR) (Byrne-Bailey *et al.*, 2009; Carattoli, 2009; Ho *et al.*, 2009; Schwarz e Chaslus-Dancla, 2001; Wu *et al.*, 2010). Na Dinamarca, a prevalência de genes *sul2*, *sul1* e *sul3* em fezes de suínos, carne de suínos, e também em humanos, foi de 65%, 45% e 12%, respetivamente (Wu *et al.*, 2010). Outros estudos também verificaram uma maior prevalência do gene *sul2* em isolados de animais e de humanos, na Dinamarca, no Reino Unido e em Hong Kong (Hammerum *et al.*, 2006; Selvam *et al.*, 2012). Para o trimetoprim, a resistência baseia-se no mecanismo descrito nas sulfonamidas, no entanto este é expresso pelos genes *dfr*, tendo sido descrita a presença de vários genes em animais para consumo humano (Ho *et al.*, 2009; Šeputiene *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2011).

Na classe dos aminoglicosídeos o mecanismo de resistência mais comum é a inativação enzimática, conferida pelas enzimas N-acetiltransferase, O-adeniltransferase ou O-fosfotransferase (Jensen *et al.*, 2006). É interessante referir que foi descrita em suínos uma variante da enzima N-acetiltransferase que confere resistência tanto à apramicina como à gentamicina, tendo sido designada de AAC(3)-IV (Jensen *et al.*, 2006; Schwarz e Chaslus-Dancla, 2001).

No caso das tetraciclinas, o mecanismo de resistência mais comum baseia-se na presença de diferentes genes *tet* [por exemplo: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(I)* e *tet(Y)*], os quais codificam para bombas de efluxo que reduzem as concentrações de antibiótico na célula. Neste caso, tanto as bactérias resistentes como as sensíveis absorvem o antibiótico com a mesma rapidez, no entanto, diferem na capacidade de o expulsar, levando a que as bactérias apresentem diferentes níveis de resistência (Mosquito *et al.*, 2011; Giedraitienė *et al.*, 2011, Stanton *et al.*, 2011). Existem também outros mecanismos de resistência codificados por outros genes que atuam na proteção ribossomal e na degradação enzimática do antibiótico (Schwarz e Chaslus-Dancla, 2001; Stanton *et al.*, 2011). Alguns autores descreveram uma maior prevalência de vários genes *tet* em isolados de suínos, tais como *tet(G)*, *tet(Y)*, *tet(A)* e *tet(B)* (Selvam *et al.*, 2012; Stanton *et al.*, 2011).

Finalmente, o mecanismo de resistência mais comum ao cloranfenicol é por inativação enzimática através da acetilação da molécula do antibiótico, impedindo a sua ligação aos ribossomas bacterianos. Este processo é mediado pela enzima cloranfenicol acetiltransferase, a qual pode ser do tipo A ou B, sendo codificada pelo gene *catA* (Giedraitienė *et al.*, 2011; Mosquito *et al.*, 2011). A resistência a este antibiótico também pode ser mediada pelos genes *cmlA* e *floB* através de sistemas exportadores específicos para o cloranfenicol (Schwarz e Chaslus-Dancla, 2001).

### **3. Impacto da resistência aos antibióticos na saúde pública**

O surgimento da resistência a antibióticos pode estar relacionado com vários fatores, sobretudo a elevada utilização de antibióticos como tratamento e como

profilaxia, em animais para consumo, através da administração oral para grupos ou bandos de animais (Collignon *et al.*, 2009). Consequentemente, pode ter vários efeitos na saúde humana, nomeadamente, efeitos diretos como o contacto com bactérias resistentes a antibióticos provenientes de animais e produtos alimentares, efeitos indiretos que resultam do contacto com organismos resistentes que foram distribuídos aos vários componentes do ecossistema (por exemplo, solo e água) e um impacto global na saúde pública, como o tratamento de infeções que muitas das vezes não respondam aos tratamentos padrão, o prolongamento da taxa de hospitalização, o aumento do número de mortes e consequentemente os custos para a economia de cada país (Silva e Mendonça, 2012; Landers *et al.*, 2012). Segundo a OMS, na União Europeia, cerca de 25 000 pessoas morrem a cada ano vítimas de infeções causadas por bactérias que apresentam resistência aos antibióticos (WHO, 2011).

Devido à grande variedade de fatores que podem contribuir para o aparecimento de resistência aos antibióticos em animais destinados ao consumo humano, e que podem levar a riscos para a saúde humana, existe um elevado número de modelos de avaliação que permitem abordar o tema. Contudo, há uma baixa probabilidade de qualquer um desses modelos quantificar com precisão a relação entre os antibióticos utilizados em animais para consumo e a resistência aos antibióticos observada em humanos (Landers *et al.*, 2012). O conhecimento sobre a adequada utilização destas moléculas, tal como o regime de dosagem, poderá levar à redução da seleção de resistência, assegurando uma melhor utilização no futuro (EMEA, 2013; Snary *et al.*, 2004).

A disseminação de ESBLs para o Homem constitui uma das situações de resistência a antibióticos preocupante, uma vez que este mecanismo de resistência tem vindo a aumentar gradualmente ao longo dos anos e, na maior parte das vezes, as bactérias produtoras de ESBLs são co-resistentes a vários antibióticos não beta-lactâmicos (Hendriksen *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2008). Isto leva a que o número de antibióticos que podem ser usados no tratamento de infeções no Homem por este tipo de bactérias seja muito reduzido (Hasman *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2008; Paterson e Bonomo, 2005).

Face ao aumento da resistência aos beta-lactâmicos e a outros agentes antimicrobianos em bactérias comensais de animais para consumo humano, a OMS e outras organizações oficiais [*European Food Safety Authority* (EFSA), Agência Europeia do Medicamento (AEM), *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e *World Organisation for Animal Health* (OIE)] têm incentivado a implementação de programas de monitorização da resistência aos antibióticos em bactérias deste nicho ecológico, de modo a evitar a sua disseminação (Bywater *et al.*, 2004; EFSA, 2013; EMEA, 2013; WHO, 2011).

Em concreto, a OMS, em conjunto com os seus estados membros, tem trabalhado para a implementação de programas nacionais de vigilância do uso de antibióticos de modo a garantir o cumprimento de princípios que visam a diminuição da resistência antimicrobiana em animais destinados à alimentação, nomeadamente: a proibição de antibióticos promotores de crescimento, a prescrição e o uso racional de antibióticos, e a restrição do uso de algumas moléculas importantes para a medicina humana em animais para consumo (EFSA, 2013; EMEA, 2013; WHO, 2011). A gravidade da situação levou ainda a OMS a desenvolver uma lista de antibióticos criticamente importantes em medicina humana, para os quais a estratégia de gestão de risco é mais urgente, nomeadamente fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira e quarta geração, e macrólidos. Esta lista é atualizada regularmente de acordo com a disponibilização de novos dados, incluindo os padrões de resistência bacteriana, novas doenças e o desenvolvimento de novos medicamentos (EMEA, 2013; WHO, 2011).

## II. OBJETIVOS

Em Portugal são poucos os estudos desenvolvidos sobre a avaliação dos perfis de suscetibilidade em *Enterobacteriaceae* provenientes de diferentes tipos de amostras de suiniculturas (rações, animais, águas, esgotos), assim sobre a ocorrência de ESBLs e a análise da estrutura populacional de *Enterobacteriaceae* neste nicho (a maioria dos estudos centra-se na pesquisa de ESBLs em *Enterobacteriaceae* provenientes das fezes dos animais para consumo humano).

Assim, o presente estudo tem como objetivos:

- i) Testar a suscetibilidade a vários antibióticos em *Enterobacteriaceae* provenientes de suínos e de diversos ambientes de suiniculturas Portuguesas;
- ii) Detetar a ocorrência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em suiniculturas Portuguesas;
- iii) Analisar a estrutura populacional de *Escherichia coli* provenientes de suínos e de diversos ambientes de suiniculturas Portuguesas.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Isolados bacterianos

O processo de recolha de amostras e a obtenção dos isolados bacterianos incluídos neste estudo foram efetuados previamente, dado este trabalho se inserir em um projeto de investigação de maiores dimensões que decorre no REQUIMTE/Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, não estando por isso aqui descritos pormenorizadamente.

Foram recolhidas cinquenta e sete (57) amostras do ambiente de suiniculturas da região Norte, Centro e Sul de Portugal. As amostras foram recolhidas de seis suiniculturas designadas de suinicultura A (Sul, n=1), suinicultura B (Sul, n=11), suinicultura C (Centro, n=18), suinicultura E (Norte, n=10) e suinicultura F (Norte, n=17), entre Abril de 2006 e Dezembro de 2007. O processamento das amostras incluiu um enriquecimento prévio em água peptonada (18 horas, 37°C) e posterior sementeira de uma alíquota de 0.2 mL do enriquecimento em meios de agar MacConkey com e sem os seguintes antibióticos: ceftazidima (1 mg/L), cefotaxima (1 mg/L), tetraciclina (6 mg/L) e sulfonamidas (256 mg/L). Foram selecionados os diferentes morfotipos observados em cada um dos meios utilizados, os quais foram congelados em meio TSB contendo glicerol (criopreservante) para os estudos que se seguiram.

Os 191 isolados bacterianos analisados no presente estudo foram recolhidos de amostras de fezes (n=34), rações (n=38), esterco seco (n=2), água de lagunagens (n=5), água limpa de pocilgas (n=15), água suja de pocilgas (n=15), pó de pocilgas (n=3), xerume (n=4), ar das salas (maternidade e gestação) (n=11), água dos bebedouros (n=20), água de fossas internas (n=8), efluentes (n=5), doseadores de ração (n=5), pó da sala de maternidade (n=3) e zaragatoas [rectais (n=11), nasais (n=4), da superfície dos animais (n=6), de superfícies (n=1) e da ventilação (n=1)].

## **2. Identificação das espécies de *Enterobacteriaceae* e análise da estrutura populacional de *Escherichia coli***

### **2.1 Identificação presuntiva**

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).

### **2.2 Identificação definitiva por técnicas de biologia molecular**

#### **2.2.1 Extração de DNA**

O DNA bacteriano foi extraído recorrendo à lise das bactérias por fervura, tendo sido já efetuado anteriormente no decurso do projeto de investigação onde se inseriu este trabalho.

#### **2.2.2 Amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A identificação de *E. coli* foi efetuada através da amplificação de DNA (gene *malB*) pela técnica de PCR (Bibbal *et al.*, 2009). Para isso utilizou-se a metodologia descrita por Wang *et al.* (1996), indicando-se na Tabela 1 os *primers* e as condições de amplificação usadas (Wang *et al.*, 1996). Para os isolados não identificados como *E. coli* por este PCR, procedeu-se à amplificação do gene *16S rDNA* também através da técnica de PCR, utilizando os *primers* e as condições de amplificação descritas por Hérítier *et al.* (2003) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Condições de amplificação e reacionais usadas na identificação de *E. coli* e na amplificação do gene *16S rDNA*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' -> 3')	Tamanho do produto amplificado (bp)	Condições reacionais	Condições de amplificação	Referência(s)
ECO-1	GACCTCGGTTTAGTTCACAGA	585	H <sub>2</sub> O – 35,2 mM, <i>Buffer</i> – 1 x, MgCl <sub>2</sub> – 1,5 mM, dNTP's – 0,2 mM, <i>Primers</i> – 0,8 pmol/μL, DNA <i>polymerase</i> – 0,04 u/μL.	94°C, 10 min.; 35 ciclos envolvendo os seguintes passos: 94°C – 40 seg., 59°C – 40 seg. e 72°C – 40 seg.; 72°C, 10 min.	Wang <i>et al.</i> , 1996
ECO-2	CACACGCTGACGCTGACCA				
SeqA	AGAGTTTGATCCTGGYTYAGA	1542	H <sub>2</sub> O – 31,7 mM, <i>Buffer</i> – 1x, MgCl <sub>2</sub> – 2 mM, dNTP's – 0,2 mM, <i>Primers</i> – 3 pmol/μL, DNA <i>polymerase</i> – 0,04 u/μL	94°C, 10 min.; 35 ciclos envolvendo os seguintes passos: 94°C – 1 min., 59°C – 1 min. e 72°C – 2 min.; 72°C, 10 min.	Héritier <i>et al.</i> , 2003
SeqB	ACGGYTACCTGTTACGACTTC				

### 2.2.3 Eletroforese e visualização dos resultados

Os produtos de amplificação das reações de PCR foram separados em eletroforese horizontal usando um gel de agarose a 1.5% em Tris-Acetato EDTA (TAE) 1X. Foi adicionado ao gel um composto com afinidade para o DNA e que emite fluorescência, Midori Green (GRISP®, Porto, Portugal). Foram aplicados 10 μL de cada amostra nos poços do gel de agarose. A eletroforese decorreu a 100V durante 30 minutos. Os resultados foram visualizados em transiluminador (Bio-Rad®, Amadora, Portugal) e adquiridos digitalmente.

### 2.2.4 Purificação de DNA para sequenciação

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

### 2.3 Análise da estrutura populacional de *E. coli*

A caracterização da população de *E. coli* foi realizada por PCR *multiplex* (Clermont *et al.*, 2000), através da amplificação dos genes (*chuA* e *yjaA*) e do fragmento de DNA TspE4.C.2, que permitem a determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli*. Os *primers* e as condições de amplificação utilizadas encontram-se na Tabela 2 (Clermont *et al.*, 2000). A extração de DNA, assim como a amplificação de DNA por PCR, eletroforese e visualização dos resultados foram efetuadas da forma descrita nas secções 2.2.1, 2.2.2 e 2.2.3. Com a exceção na eletroforese, em que foi utilizado um gel de agarose a 2%. Os resultados obtidos foram interpretados pela análise da combinação de bandas obtidas para os genes *chuA* e *yjaA* e fragmento de DNA TspE4.C.2, proposta por Clermont *et al.* (2000), permitindo a classificação em grupos filogenéticos.

**Tabela 2.** Condições de amplificação e reacionais usadas na análise da estrutura populacional de *E. coli*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' -> 3')	Tamanho do produto amplificado (bp)	Condições reacionais	Condições de amplificação	Referência
ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	H <sub>2</sub> O – 32,2 mM, <i>Buffer</i> – 1 x, MgCl <sub>2</sub> – 1,5 mM, dNTP's – 0,2 mM, <i>Primers</i> – 0,8 pmol/μL, DNA <i>polymerase</i> – 0,04 u/μL.	94°C, 10 min.; 35 ciclos envolvendo os seguintes passos: 94°C – 30 seg., 57°C – 30 seg. e 72°C – 30 seg.; 72°C, 10 min.	Clermont <i>et al.</i> , 2000
ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA				
YjaA.1	TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG	211			
YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC				
TspE4C2.1	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152			
TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG				

### 3. Avaliação da suscetibilidade aos antibióticos

A suscetibilidade aos antibióticos foi avaliada através do método de difusão em agar usando discos contendo os antibióticos a testar. Este método baseia-se na

preparação de um inóculo bacteriano com turvação equivalente a 0,5 unidades McFarland que é posteriormente semeado em meio de Mueller-Hinton II (CLSI, 2007).

Foram testados os seguintes antibióticos: amoxicilina e ácido clavulânico (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftadizima (30 µg), cefepime (30 µg), aztreonamo (30 µg), cefoxitina (30 µg), imipenemo (10 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), amicacina (30 µg), estreptomicina (10 µg), canamicina (30 µg), netilmicina (30 µg), neomicina (10 µg), espectinomicina (25 µg), apramicina (15 µg), tetraciclinas (30 µg), tigeciclina (15 µg), trimetoprim (5 µg), ácido nalidíxico (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg) e sulfonamidas (300 µg). Os resultados obtidos foram interpretados como comportamento de sensibilidade (S), sensibilidade intermédia (I) ou resistência (R), de acordo com os critérios do CLSI (CLSI, 2007). As bactérias com comportamento de sensibilidade intermédia foram consideradas como resistentes na análise dos resultados.

#### **4. Detecção de isolados produtores de beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs)**

Foi também pesquisada a presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs. Para isso recorreu-se ao teste do duplo sinergismo (DDST), posicionando os discos de forma correta, contendo cefepime (30 µg), ceftadizima (30 µg), aztreonamo (30 µg) e cefotaxima (30 µg) a 25 mm do disco contendo amoxicilina e ácido clavulânico (30 µg) para deteção do fenótipo ESBL (CLSI, 2007).

#### IV. RESULTADOS

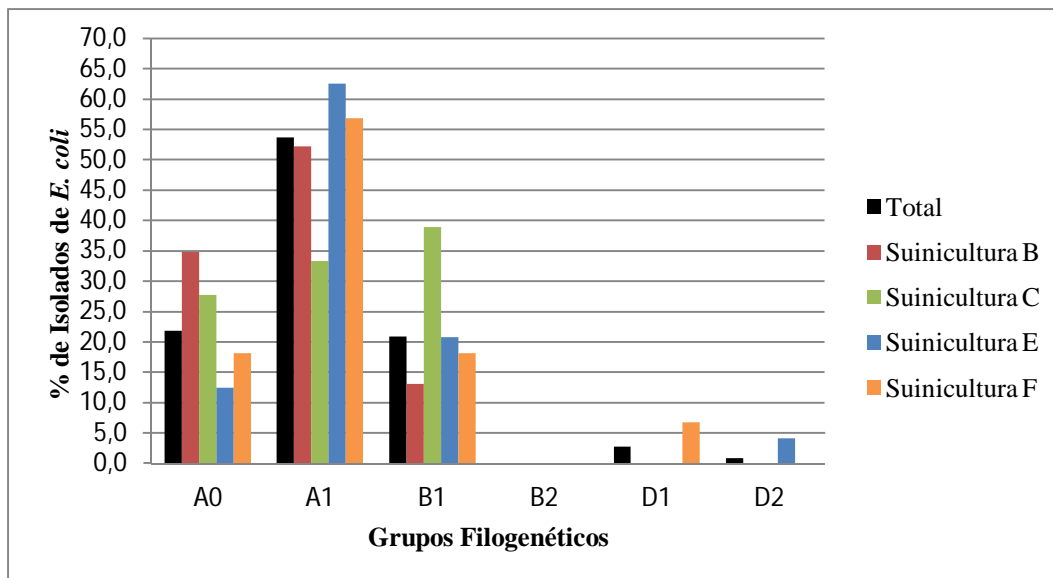
Dos 315 morfotipos bacterianos obtidos das amostras analisadas e previamente congelados, apenas 191 foram identificados como *Enterobacteriaceae*. Foram eliminados isolados provenientes da mesma amostra e com padrão de suscetibilidade aos antibióticos igual, o que resultou em 174 isolados bacterianos a caracterizar no presente estudo. Estes 174 isolados foram provenientes de um total de 43 amostras obtidas das diferentes suiniculturas: suinicultura A (n=1), suinicultura B (n=10), suinicultura C (n=10), suinicultura E (n=9) e suinicultura F (n=13).

##### 1. Identificação e análise da estrutura populacional de *E. coli*

Do total de 174 isolados de *Enterobacteriaceae*, 110 foram identificados como *E. coli*, sendo posteriormente analisada a sua estrutura populacional pela determinação dos grupos filogenéticos.

Para as várias suiniculturas verificaram-se diferentes distribuições dos grupos filogenéticos (Figura 3). A suinicultura A não foi considerada na análise dos resultados e na construção da figura uma vez que só foi obtido um isolado de *Enterobacteriaceae* deste local de produção (n=1, *E. coli*-A1).

**Figura 3.** Distribuição dos diferentes grupos filogenéticos pelos isolados de *E. coli* provenientes das suiniculturas analisadas.



Através da análise da Figura 3, onde se apresenta a distribuição da percentagem dos grupos filogenéticos pelas diferentes suiniculturas, verifica-se que a suinicultura B possui *E. coli* pertencente aos grupos A1 (52%, 12/23), A0 (35%, 8/23) e B1 (13%, 3/23) (Figura 3). Para a suinicultura C observou-se a presença de isolados dos filogrupos B1 (39%, 7/18), A1 (33%, 6/18) e A0 (28%, 5/18) (Figura 3). Na suinicultura E predominou o filogrupo A1 (63%, 15/24), embora também tenham sido detetados os grupos B1 (21%, 5/24), A0 (13%, 3/24) e, mais raramente, D2 (4%, 1/24) (Figura 3). Por último na suinicultura F, verificou-se também uma maior prevalência do grupo A1 (57%, 25/44), tendo sido adicionalmente identificados isolados de *E. coli* dos filogrupos A0 (18%, 8/44), B1 (18%, 8/44) ou D1 (7%, 3/44) (Figura 3). Em todas as suiniculturas não se registou a presença do filogrupo B2, enquanto que para as suiniculturas E e F foi observada a presença do filogrupo D2. De um modo geral, os grupos filogenéticos com maior frequência foram o A1 (54%, 59/110), o A0 (22%, 24/110) e o B1 (21%, 23/110). Os grupos com menor frequência foram o D1 (3%, 3/110) e o D2 (1%, 1/110). Relativamente ao filogrupo B2, nenhum isolado de *E. coli* demonstrou pertencer ao mesmo. Comparando os perfis de resistência aos antibióticos entre os diferentes grupos filogenéticos, verificou-se uma baixa prevalência de resistência no filogrupo D, apenas dois isolados. Em contrapartida nos filogrupos A e B a resistência foi mais elevada,

tendo-se observado uma maior prevalência de resistência, sobretudo nas sulfonamidas, trimetoprim, tetraciclina, espectinomicina e estreptomicina.

## **2. Identificação de outras espécies de *Enterobacteriaceae* por sequenciação do gene *16S rDNA***

Para os 64/174 isolados que deram um resultado negativo no PCR de detecção de *E. coli*, foi efetuada a amplificação e sequenciação do gene *16S rDNA* para identificação da espécie bacteriana a que pertenciam. Os resultados obtidos indicaram a presença de espécies de *Enterobacteriaceae* comuns na flora intestinal dos suínos, assim como no meio onde estes se encontram (por exemplo, *Providencia alcalifaciens*, *Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Serratia liquefaciens*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella planticola*, *Enterobacter hormaechei*), em vez de espécies patogénicas frequentemente envolvidas em infeções no Homem, pelo que não houve interesse em continuar a identificação bacteriana por biologia molecular para os restantes isolados não-*E. coli*.

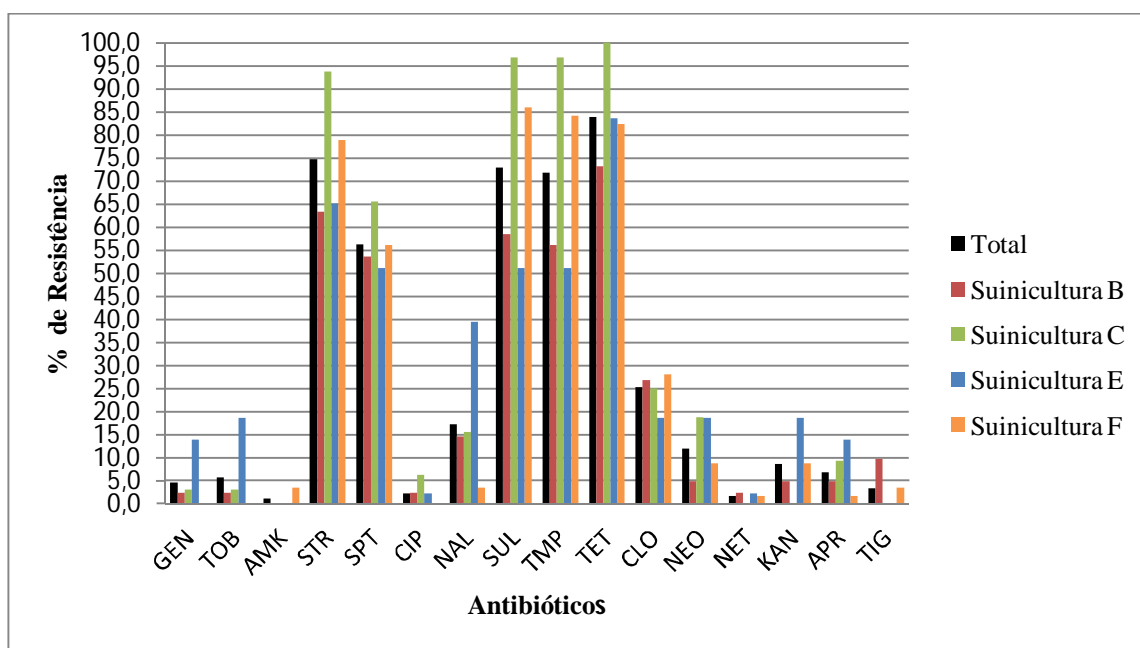
## **3. Avaliação da suscetibilidade aos antibióticos**

Para os diferentes antibióticos não beta-lactâmicos testados, verificaram-se diferentes taxas de resistência em isolados provenientes das diversas suiniculturas (Figura 4). Como da suinicultura A só foi obtido um isolado de *Enterobacteriaceae* (n=1), este não foi considerado na análise e construção da Figuras dos resultados. De qualquer forma, para este isolado foi observada resistência a estreptomicina, espectinomicina, sulfonamidas, trimetoprim, tetraciclina e cloranfenicol.

Analisando a Figura 4 onde se encontra a distribuição da percentagem de resistência aos antibióticos por suinicultura, verifica-se que na suinicultura B a taxa de resistência foi maior para as tetraciclina (73%, 30/41), estreptomicina (63%, 26/41), sulfonamidas (58%, 24/41), trimetoprim (56%, 23/41) e espectinomicina (54%, 22/41). Para a suinicultura C, obteve-se elevada resistência às tetraciclina (100%, 32/32),

sulfonamidas (97%, 31/32), trimetoprim (97%, 31/32), estreptomicina (94%, 30/32) e espectinomicina (66%, 21/32) (Figura 1). Na suinicultura E, a taxa de resistência foi maior para as tetraciclina (84%, 36/43), estreptomicina (65%, 28/43), espectinomicina (51%, 22/43), sulfonamidas (51%, 22/43), e trimetoprim (51%, 22/43). Finalmente, na suinicultura F foi frequente a resistência às sulfonamidas (86%, 49/57), trimetoprim (84%, 48/57), tetraciclina (82%, 47/57), estreptomicina (79%, 45/57) e espectinomicina (56%, 32/57). De uma forma geral, os antibióticos não beta-lactâmicos para os quais se observou uma maior frequência de resistência nas diversas suiniculturas foram as tetraciclina (84%, 146/174), a estreptomicina (75%, 130/174), as sulfonamidas (73%, 127/174), o trimetoprim (72%, 125/174) e a espectinomicina (56%, 98/174).

**Figura 4.** Percentagem de resistência aos antibióticos não beta-lactâmicos em *Enterobacteriaceae* isoladas das diferentes suiniculturas analisadas.



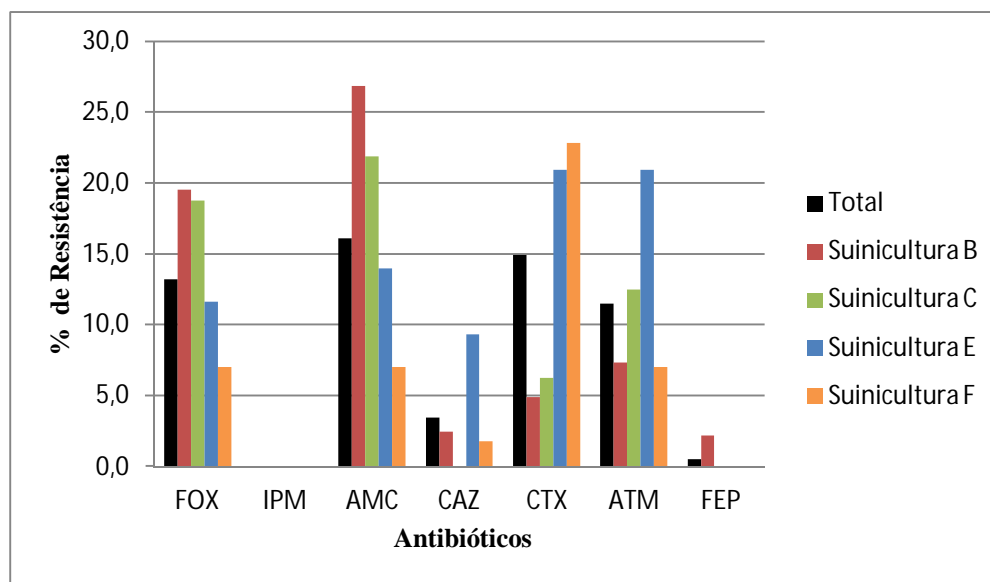
GEN, Gentamicina; TOB, Tobramicina; AMK, Amicacina; STR, Estreptomicina; SPT, Espectinomicina; CIP, Ciprofloxacina; NAL, Ácido Nalidíxico; SUL, Sulfonamidas; TMP, Trimetoprim; TET, Tetraciclina; CLO, Cloranfenicol; NEO, Neomicina; NET, Netilmicina; KAN, canamicina; APR, Apramicina; TIG, Tigeciclina.

Relativamente aos antibióticos beta-lactâmicos, observaram-se diferentes percentagens de resistência dos isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes das várias suiniculturas, embora nenhum tenha demonstrado ser resistente ao imipnemo (Figura 5). Nas suiniculturas B e C obteve-se maior taxa de resistência para a associação

amoxicilina e ácido clavulânico (27%, 11/41 e 22%, 7/32, respetivamente) e para a cefoxitina (19%, 8/41 e 19%, 6/32, respetivamente). Na suinicultura E, os beta-lactâmicos para os quais se observou uma frequência mais elevada de resistência foram a cefotaxima (21%, 9/43) e o aztreonamo (21%, 9/43), e na suinicultura F a cefotaxima (23%, 13/57). Por último, o isolado bacteriano da suinicultura A foi sensível aos antibióticos desta família.

No geral, os beta-lactâmicos para os quais foi observada mais frequentemente resistência foram a associação amoxicilina e ácido clavulânico (16%, 28/174), a cefotaxima (15%, 26/174), a cefoxitina (13%, 23/174) e o aztreonamo (11%, 20/174) (Figura 5). A produção de beta-lactamases de espectro alargado foi demonstrada em 14% (25/174) dos isolados incluídos no estudo, correspondendo na maioria a isolados de *E. coli* obtidas das suiniculturas E e F. Os isolados produtores de ESBLs foram detetados nas amostras de zaragatoas rectais ou de superfície dos suínos, fezes, rações, bebedouros e também em amostras da fossa interna das suiniculturas.

**Figura 5.** Percentagem de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em *Enterobacteriaceae* isoladas das diversas suiniculturas analisadas.



FOX, Cefoxitina; IPM, Imipnemo; AMC, Amoxicilina e Ácido Clavulânico; CAZ, Ceftazidima; CTX, Cefotaxima; ATM, Aztreonamo; FEP, Cefepime.

## V. DISCUSSÃO

Com este estudo pretendeu-se analisar a estrutura populacional de *E. coli* provenientes de várias suiniculturas, assim como testar a suscetibilidade de *Enterobacteriaceae* a diferentes antibióticos. De um modo geral, verificou-se uma maior prevalência de isolados de *E. coli* pertencentes aos grupos filogenéticos A1 e B1 nas diferentes suiniculturas, sendo que nas suiniculturas B, E e F o grupo A1 esteve representado em mais de 50% de *E. coli* analisadas. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Johnson *et al.* (2003), que indica que os isolados de animais estão associados aos filogrupos A e B1, enquanto os isolados de humanos associam-se mais aos filogrupos B2 e D (Johnson *et al.*, 2003). Outro estudo descreveu uma maior prevalência do grupo A em isolados de suínos e de bovinos, e do grupo D em isolados de frangos (Cortés *et al.*, 2010) A maioria dos isolados do grupo filogenético D detetados em vários estudos apresenta dois ou mais genes de virulência, estando deste modo associados a uma maior virulência (Asai *et al.*, 2011; Cortés *et al.*, 2010).

Apesar da baixa prevalência do grupo filogenético D, normalmente associado a elevada patogenicidade, a sua presença foi observada nas suiniculturas E e F, tendo sido nestas suiniculturas onde se detetou a existência de ESBLs. As infeções extra-intestinais estão classicamente associadas a estirpes de *E. coli* pertencentes aos grupos filogenéticos B2 e D (devido aos mecanismos de patogenicidade relacionados com a presença de fatores de virulência, como adesinas, hemolisinas, enterotoxinas) (Bok *et al.*, 2013). No entanto, as estirpes de *E. coli* dos grupos A e B1 também podem expressar estes fatores, pois através da transferência horizontal de genes (sobretudo através de plasmídeos) as bactérias do grupo B2 e D podem transferir essa informação genética para os grupos A e B1, transformando *E. coli*-A ou *E. coli*-B1 em estipes virulentas (Johnson *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos merecem especial atenção, pois embora *E. coli* dos grupos A e B1 não sejam habitualmente consideradas patogénicas por fazerem parte da flora comensal do intestino, podem ser uma fonte de disseminação de genes de resistência, uma vez que estas bactérias já têm vindo a ser associadas a infeções extra-intestinais

(Rodríguez-Baño *et al.*, 2012). Tem sido abordado que *E. coli* dos grupos filogenéticos A e B1 embora apresentem baixo potencial patogénico, podem ser capazes de produzir infeções extra-intestinais (Rodríguez-Baño *et al.*, 2012). Segundo Moreno *et al.* (2006), isolados de *E. coli* dos grupos A1 e B1 associaram-se de forma significativa a doentes com pielonefrite, sépsis e com fatores favoráveis a infeção (Moreno *et al.*, 2006). Num outro estudo realizado por Bok *et al.* (2013), em amostras de leitões e porcas, o grupo filogenético B1 foi o mais prevalente nos isolados de leitões, enquanto os isolados de porcas revelaram ser maioritariamente do grupo A. Tendo também sido identificados nos isolados de suínos saudáveis três genes de virulência intestinal (*escV*, *ehxA*, *estIII*) e quatro genes de virulência extra-intestinal (*hlyA*, *fimH*, *papA*, *sfaS*) sugerindo que os filogrupos A e B1 associam-se cada vez mais a infeções extra-intestinais, pela aquisição de fatores de virulência (Bok *et al.*, 2013; Rodríguez-Baño *et al.*, 2012).

A resistência aos diferentes antibióticos observada neste estudo em bactérias isoladas de animais para consumo humano e do ambiente das suiniculturas é preocupante, uma vez que bactérias resistentes e/ou genes de resistência podem ser transmitidos ao Homem, por exemplo através da cadeia alimentar (Bywater *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2008; Rosengren *et al.*, 2008).

Os elevados níveis de resistência a antibióticos não beta-lactâmicos observados, nomeadamente às tetraciclinas (84%), estreptomicina (75%), sulfonamidas (73%), trimetoprim (72%) e espectinomicina (56%), poderão estar relacionados com a grande utilização destas moléculas nas suiniculturas analisadas. De facto, segundo o relatório da Direção-Geral de Veterinária, verifica-se uma maior utilização de tetraciclinas (DGV, 2010). Diversos estudos desenvolvidos em vários países da Europa, incluindo Portugal, sobre a resistência a antibióticos em bactérias provenientes de amostras de suínos, revelam existir uma maior frequência de resistência às tetraciclinas (80% - 95%) e às sulfonamidas (62% - 79%), sendo que estas classes de antibióticos estão entre as mais vendidas na UE para uso veterinário (EFSA, 2011, 2013). Outros estudos referem ainda uma maior resistência à estreptomicina, trimetoprim, sulfonamidas, tetraciclinas e cloranfenicol (Bywater *et al.*, 2004; Hendriksen *et al.*, 2008; Pena *et al.*, 2004). Segundo um estudo realizado em 2010 em isolados de *E. coli* provenientes de carcaças

de suínos de vários países da Europa, foi reportada uma elevada resistência a tetraciclina, ampicilina, estreptomicina e sulfonamidas (EFSA, 2011). Os níveis de resistência observados para estes quatro antimicrobianos variaram consideravelmente entre países, sendo que a França e a Holanda obtiveram níveis relativamente elevados de resistência aos quatro antibióticos, enquanto a Finlândia obteve o menor nível de resistência para os mesmos antibióticos (EFSA, 2011).

Das suiniculturas em estudo, a suinicultura C foi aquela onde se observou mais frequentemente a resistência a antibióticos não beta-lactâmicos, tendo sido obtidas percentagens superiores a 90% para alguns dos antibióticos testados. O facto de ter sido registado o uso da amoxicilina nesta suinicultura poderá ter contribuído para a emergência e disseminação de bactérias resistentes, sobretudo aos beta-lactâmicos. Foi demonstrado por Bibbal *et al.* (2009) que a administração de ampicilina em suínos leva à seleção de *E. coli* resistentes à ampicilina pertencentes ao grupo filogenético A. Antes do tratamento o principal filogrupos observado era o B1, seguido pelo A, sendo que os filogrupos B2 e D eram raros. Depois do tratamento verificou-se uma maior prevalência de isolados do grupo A resistentes à ampicilina. Estes possuíam vários fenótipos de resistência a diferentes antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, estreptomicina, sulfonamidas, trimetoprim), sendo que a maioria dos isolados expressava o gene *bla*<sub>TEM</sub> (Bibbal *et al.*, 2009). Estes resultados sugerem que a transferência horizontal ou a seleção de determinantes de resistência pode ocorrer na população de *E. coli* da flora intestinal (Bibbal *et al.*, 2009; Soto *et al.*, 2006).

A resistência aos antibióticos poderá estar associada à ausência de alguns fatores de virulência (como fímbrias e hemolisina), pois verificou-se que em isolados de *E. coli* do grupo filogenético A1 e B1 provenientes de humanos, que apresentavam uma maior resistência a fluoroquinolonas, a presença de fatores de virulência era menor, quando comparados com os isolados do grupo B2 que apresentavam maior sensibilidade a este grupo de antibióticos (Moreno *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2006). Tem sido demonstrado que isolados de *E. coli* do grupo A resistentes a fluoroquinolonas possuem um baixo número de fatores de virulência, podendo estar associado à perda de fatores de virulência durante a aquisição de resistência ou devido à existência de duas populações

distintas em que a menos virulenta seja selecionada a partir da flora intestinal durante o tratamento com antibióticos (Johnson *et al.* 2002; Soto *et al.* 2006). Alguns autores defendem que a resistência ocorre devido a uma pressão seletiva causada pelos antibióticos na flora intestinal de animais, sendo que estirpes de *E. coli* do filogrupo B2, geralmente sensíveis aos antibióticos, são substituídas por *E. coli* dos filogrupos A e B1 (Johnson *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2006). Isto poderá justificar os resultados obtidos neste estudo, pois além da elevada prevalência dos filogrupos A e B1 estes apresentam uma maior resistência aos antibióticos, comparativamente ao menor número de isolados do filogrupo D em que a resistência aos antibióticos foi baixa. Deste modo, estes resultados vão de encontro ao descrito por alguns autores, nomeadamente o aumento da resistência nos filogrupos A e B1 e o aumento da frequência destes no envolvimento de infeções extra-intestinais (tradicionalmente associados aos filogrupos B2 e D (Corvec *et al.*, 2007; Johnson *et al.* 2003). O aumento da resistência a antibióticos em humanos pode estar relacionado com a utilização destes antibióticos na veterinária, uma vez que a transmissão da resistência pode ter origem alimentar (Corvec *et al.*, 2007; Johnson *et al.* 2002).

Por outro lado, as estirpes de *E. coli* produtoras de ESBLs estão a aumentar em todo o mundo como uma das causas de infeções nosocomiais, afetando com frequência doentes com predisposição para este tipo de infeções (Johnson *et al.* 2002; Moreno *et al.*, 2006). Num estudo realizado em Espanha em doentes hospitalizados, verificou-se uma maior prevalência dos grupos filogenéticos A e B1, contrastando com estudos anteriores em que a prevalência foi maior para os grupos B2 e D (Rodríguez-Baño *et al.*, 2012). Estes resultados podem dever-se a várias razões, pois a maioria dos casos ocorreu em doentes com fatores predisponentes para infeções, portanto, seriam necessários menos fatores de virulência para causar a infeção nestes pacientes, além de que o tratamento prévio com antibióticos era comum, podendo ter ocorrido a seleção de *E. coli* produtoras de ESBL multi-resistentes, independentemente do seu perfil de virulência (Johnson *et al.*, 2003; Rodríguez-Baño *et al.*, 2012).

A produção de ESBLs, verificada em alguns isolados das suiniculturas E e F, poderá também estar relacionada com o uso frequente de antibióticos nesses locais de

produção. Estas enzimas degradam as cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração (alguns tipos de ESBL hidrolisam o cefepime), antibióticos habitualmente usados no tratamento de infeções no Homem e animais (Paterson *et al.*, 2005; Pitout *et al.*, 2005). A elevada resistência a estes antibióticos poderá levar ao comprometimento da terapia, uma vez que restam poucas alternativas terapêuticas, pois, os isolados produtores de ESBLs exibem habitualmente resistência a antibióticos de outras classes, alguns também frequentemente usados na produção intensiva de animais, particularmente a estreptomicina, as sulfonamidas e o trimetoprim (DGV, 2010; Machado *et al.*, 2008).

A frequência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou a possível presença de integrões em amostras de fezes de animais para consumo humano e no ambiente de suiniculturas, torna estes locais de produção intensiva possíveis reservatórios para a disseminação de genes de resistência na comunidade, sobretudo através da cadeia alimentar, mas também através do ambiente (van den Boogard e Stobberingh, 2000; Varga *et al.*, 2008).

## VI. CONCLUSÃO

Em conclusão, os isolados de *E. coli* dos grupos filogenéticos A e B1, apesar de serem tradicionalmente associados a baixa patogenicidade (por apresentarem poucos fatores de virulência), podem ser agentes de infeções extra-intestinais. Face ao elevado número de isolados de *E. coli* provenientes dos grupos filogenéticos A e B1 encontrados nas diferentes suiniculturas, assim como as elevadas taxas de resistência aos antibióticos observadas nas bactérias de animais para consumo humano analisadas torna-se imperativa a implementação de programas de monitorização contínua da resistência a estas moléculas, assim como um uso racional dos antibióticos também em medicina veterinária. Estas medidas poderão levar a uma redução na disseminação de bactérias resistentes e/ou genes de resistência para a comunidade, diminuindo desta forma os riscos para a saúde pública.

## VII. BIBLIOGRAFIA

Agersø, Y. *et al.* (2012). Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC) producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, pp. 582–588.

Alali, W.Q. *et al.* (2008). Longitudinal Study of Antimicrobial Resistance among *Escherichia coli* Isolates from Integrated Multisite Cohorts of Humans and Swine, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), pp. 3672–3681.

Antunes, P., Machado, J., Peixe, L. (2006). Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, pp. 297–304.

Asai, T., *et al.* (2011). Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(52).

Bibbal, D. *et al.* (2007). Impact of Three Ampicillin Dosage Regimens on Selection of Ampicillin Resistance in *Enterobacteriaceae* and Excretion, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(15), pp. 4785–4790.

Bok, E. *et al.* (2013). Age as a Factor Influencing Diversity of Commensal *E. coli* Microflora in Pigs, *Polish Journal of Microbiology*, 62(2), pp.165–171.

Börjesson, S. *et al.* (2013). Frequent Occurrence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase and Transferable AmpC Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* on Domestic Chicken Meat in Sweden, *Applied and Environmental Microbiology*, 79(7), pp. 2463–2466.

Briñas, L. *et al.* (2003). Detection of CMY-2, CTXM- 14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, pp. 2056–2058.

Byrne-Bailey, K.G. *et al.* (2009). Prevalence of Sulfonamide Resistance Genes in Bacterial Isolates from Manured Agricultural Soils and Pig Slurry in the United Kingdom, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), pp. 696–702.

Bywater, R. *et al.* (2004). A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(4), pp. 744–754.

Carattoli, A. (2009). Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), pp. 2227–2238.

Carlos, C. *et al.* (2010). *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination, *BMC Microbiology*, 10(161).

Choudhury, R., Panda, S., Singh, D.V. (2012). Emergence and dissemination of antibiotic resistance: A global problem, *Indian Journal of Medical Microbiology*, 30(4), pp. 384–390.

Clermont, O. *et al.* (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group, *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), pp. 4555–4558.

Clinical and Laboratory Standards Institute, (CLSI). (2007). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth Informational Supplement M100-S17. [Em linha]. Disponível em <<http://www.microbiolab-bg.com/CLSI.pdf>>. Consultado em [10/03/2013].

Cloekaert, A. *et al.* (2010). IncI1 Plasmid Carrying Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase Gene *bla*CTX-M-1 in *Salmonella enterica* Isolates from Poultry and Humans in France, 2003 to 2008, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), pp. 4484–4486.

Collignon, P. *et al.* (2009). World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies for the Use of Antimicrobials in Food Production Animals, *Clinical Infectious Diseases*, 49, pp. 132–41.

Cooke, N.M. *et al.* (2010). Major differences exist in frequencies of virulence factors and multidrug resistance between community and nosocomial *Escherichia coli* bloodstream isolates, *J Clin Microbiol*, 48(4), pp. 1099-1104.

Cortés, P. *et al.* (2010). Isolation and Characterization of Potentially Pathogenic Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Strains from Chicken and Pig Farms in Spain, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9), pp. 2799–2805.

Corvec, S. *et al.* (2007). Most *Escherichia coli* strains overproducing chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamase belong to phylogenetic group A, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, pp. 872–876.

Costa, P.M., Loureiro, L., Matos, A.J.F. (2013). Transfer of Multidrug-Resistant Bacteria Between Intermingled Ecological Niches: The Interface Between Humans, Animals and the Environment, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, pp. 278-294.

Dahshan, H. *et al.* (2010). Characterization of Antibiotic Resistance and the Emergence of AmpC-Producing *Salmonella* *Infantis* from Pigs, *J. Vet. Med. Sci.*, 72(11), pp. 1437–1442.

Delsol, A.A. *et al.* (2010). Persistence of a wild type *Escherichia coli* and its multiple antibiotic-resistant (MAR) derivatives in the abattoir and on chilled pig carcasses, *International Journal of Food Microbiology*, 140, pp. 249–253.

Denton, M. (2007). *Enterobacteriaceae*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29 (3), pp. S9–S22.

Dibner, J.J., Richards J.D. (2005). Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action, *Poultry Science*, 84, pp. 634–643.

Direcção-Geral de Veterinária (DGV), (2010). Relatório Nacional de Monitorização do Consumo de Antimicrobianos em Portugal. [Em linha]. Disponível em <<http://www.dgv.min.agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos=17171&cboui=17171>>. [Consultado em 23/08/2013].

Escobar-Páramo, P. *et al.* (2006). Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates, *Environmental Microbiology*, 8(11), pp. 1975–1984.

European Food Safety Authority, (EFSA). (2011). Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals. [Em linha]. Disponível em <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2322.pdf>>. [Consultado em 14/06/2013].

European Food Safety Authority, (EFSA). (2013). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. [Em linha]. Disponível em <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3129.htm>>. [Consultado em 14/7/2013].

European Medicines Agency, (EMA), (2013). European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2013. 'Sales of veterinary antimicrobial agents in 25

EU/EEA countries in 2011. [Em linha]. Disponível em <[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2013/10/WC500152311.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2013/10/WC500152311.pdf)>. [Consultado em 15/10/2013].

European Medicines Agency, (EMA). (2006). Reflection paper on the use of quinolones in food-producing animals in the European Union: Development of resistance and impact of human and animal health. [Em linha]. Disponível em <[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Public\\_statement/2009/10/WC500005152.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2009/10/WC500005152.pdf)>. [Consultado em 12/02/2013].

European Medicines Agency, (EMA). (2008). Reflection paper on the use of 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> generation cephalosporins in food-producing animals in the European Union: Development of resistance and impact of human and animal health. [Em linha]. Disponível em <[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/10/WC500004307.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004307.pdf)>. [Consultado em 20/02/2013].

Ewers, C. *et al.* (2012). Extended-spectrum b-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.

Ferreira, W.F.C. e Sousa, J.C.F. (2000). *Microbiologia – Volume 2*. Lisboa, LIDEL – Edições Técnicas, Lda.

Fortini, D. *et al.* (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance and b-lactamases in *Escherichia coli* from healthy animals from Nigeria, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, pp. 1269–1272.

Furtula, V. *et al.* (2013). Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. Isolated from Environmental Samples in an Area of Intensive Poultry Production, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 10, pp. 1020-1036.

Geser, N., Stephan, R., Hächler, H. (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk, *BMC Veterinary Research*, 8(21).

Giedraitienė, A. *et al.* (2011). Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria, *Medicina (Kaunas)*, 47(3), pp. 137-46.

Hammerum, A.M. *et al.* (2006). Detection of *sul1*, *sul2* and *sul3* in sulphonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark, *Int J Food Microbiol*, 106, pp. 235-237.

Hao Van, T.T. *et al.* (2012), The antibiotic resistance characteristics of non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated from food-producing animals, retail meat and humans in South East Asia, *International Journal of Food Microbiology*, 154, pp. 98–106.

Hasman, H. *et al.* (2005).  $\beta$ -lactamases among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) – resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands, *J Antimicrob Chemother*, 56, pp. 115-121.

Hawkey, P.M. (2008). Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes, *British Journal of Pharmacology*, 153, pp. S406–S413.

Hendriksen, R.S. *et al.* (2008). Occurrence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and indicator bacteria in pigs in different European countries from year 2002 – 2004: the ARBAO-II study, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50(19).

Héritier, C. *et al.* (2003). Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), pp. 268-273.

Hiroi, M. *et al.* (2012). Prevalence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Food-Producing Animals, *J. Vet. Med. Sci.*, 74(2), pp. 189–195.

Ho, P.L. *et al.* (2009). Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals, *Letters in Applied Microbiology*, 49, pp. 627–634.

Ho, P.L. *et al.* (2011). Extensive dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* with multidrug resistance to ‘critically important’ antibiotics among food animals in Hong Kong, 2008–10, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, pp. 765–768.

Horton, R.A. *et al.* (2011). Fecal Carriage and Shedding Density of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Cattle, Chickens, and Pigs: Implications for Environmental Contamination and Food Production, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11), pp. 3715–3719.

Jacoby, G.A. (2005). Mechanisms of Resistance to Quinolones, *Clinical Infectious Diseases*, 41, pp. S120–6.

Jensen, V.F. *et al.* (2006). Correlation between apramycin and gentamicin use in pigs and an increasing reservoir of gentamicin-resistant *Escherichia coli*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, pp. 101–107.

Johnson, J.R. *et al.* (2002). Phylogenetic Background and Virulence Profiles of Fluoroquinolone-Resistant Clinical *Escherichia coli* Isolates from The Netherlands, *The Journal of Infectious Diseases*, 186, pp. 1852–6.

Johnson, J.R. *et al.* (2001). Phylogenetic Distribution of Extraintestinal Virulence-Associated Traits in *Escherichia coli*, *The Journal of Infectious Diseases*, 183, pp. 78–88.

Johnson, J.R. *et al.* (2003). Phylogenetic Origin and Virulence Genotype in Relation to Resistance to Fluoroquinolones and/or Extended-Spectrum Cephalosporins and Cephamycins among *Escherichia coli* Isolates from Animals and Humans, *The Journal of Infectious Diseases*, 188, pp.759–68.

Johnson, J.R. *et al.* (2004). Virulence characteristics and phylogenetic background of multidrug-resistant and antimicrobial-susceptible clinical isolates of *Escherichia coli* from across the United States, 2000-2001, *J Infect Dis*, 190, pp. 1739-44.

Johnson, J.R., Stell, A.L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise, *J Infect Dis*, 181(1), pp. 261-272.

Jones-Dias, D. *et al.* (2013). Assessing the molecular basis of transferable quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from food-producing animals and food products. *Vet. Microbiol.* [http:// dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.010](http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.010)

Kalmokoff, M. *et al.* (2011). Continuous feeding of antimicrobial growth promoters to commercial swine during the growing / finishing phase does not modify faecal community erythromycin resistance or community structure, *Journal of Applied Microbiology*, 110, pp. 1414–1425.

Kijima-Tanaka, M. *et al.* (2003). A national surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Japan, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, pp. 447–451.

Knezevic, P., Petrovic, O. (2008). Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, pp. 360–363.

Kools, S.A.E., Moltmann, J.F., Knacker, T. (2008). Estimating the use of veterinary medicines in the European union, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50, pp. 59–65.

Landers, T.F. *et al.* (2012). A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential, *Public Health Reports*, 127, pp. 283-298.

Le Gall, T. *et al.* (2001). Extraintestinal Virulence Is a Coincidental By-Product of Commensalism in B2 Phylogenetic Group *Escherichia coli* Strains, *Mol. Biol. Evol.*, 24(11), pp.2373–2384.

Machado, E. *et al.* (2008). Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

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

Marshall, B.M., Levy, S.B. (2011). Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health, *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), pp. 718–733.

Martinez, J.L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants, *Environmental Pollution*, 157, pp. 2893–2902.

Menin, A. *et al.* (2008). Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., *Ciência Rural*, 38(6), pp. 1687–1693.

Moreno, E. *et al.* (2006). Characterization of *Escherichia coli* isolates derived from phylogenetic groups A and B1 causing extraintestinal infection, *Enferm Infect Microbiol Clin*, 24(8), pp. 483-489.

Mosquito, S. *et al.* (2011). Mecanismos Moleculares de resistência Antibiótica, em *Escherichia coli* associadas a diarreia, *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(4), pp. 648-56.

Nordmann, P. Poirel, L. (2005). Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, pp. 463–469.

Paterson, D.L., Bonomo, R.A. (2005). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update, *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), pp. 657–686.

Pena, A. *et al.* (2004). Antibiotic residues in edible tissues and antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in pigs from Portugal, *Food Additives and Contaminants*, 21(8), pp. 749–755.

Phillips, I. *et al.* (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, pp. 28–52.

Pitout, J.D.D. *et al.* (2005). Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, pp. 52–59.

Rayamajhi, N. *et al.* (2008). Characterization of TEM-, SHV- and AmpC-type  $\beta$ -lactamases from cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from swine, *International Journal of Food Microbiology*, 124, pp. 183-187.

Riaño, I. *et al.* (2006). Detection and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, pp. 844–847.

Rice, L.B. (2012). Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to  $\beta$ -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones, *Foundation for Medical Education and Research*, 87(2), pp. 198-208.

Rodríguez-Baño, J. *et al.* (2012). Virulence profiles of bacteremic extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*: association with epidemiological and clinical features, *PLoS One*, 7:e44238.

Rosengren, L. *et al.* (2008). Antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* isolated from grow-finish pigs in 20 herds in Alberta and Saskatchewan, *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 72, pp.160–167.

Schwarz, S., Chaslus-Dancla, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance, *Vet. Res.* 32, pp. 201–225.

Selvam, A. *et al.* (2012). Fate of tetracycline, sulfonamide and fluoroquinolone resistance genes and the changes in bacterial diversity during composting of swine manure. *Bioresource Technology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.045>

Šeputienė, V. *et al.* (2010). Prevalence of trimethoprim resistance genes in *Escherichia coli* isolates of human and animal origin in Lithuania, *Journal of Medical Microbiology*, 59, pp. 315–322.

Silva, G. J., Mendonça, N. (2012). Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*, *Landes Bioscience*, 3(1), pp. 18–28.

Snary, E.L. *et al.* (2004). Antimicrobial resistance: a microbial risk assessment perspective, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(6), pp. 906–917.

Soto, S.M. *et al.* (2006). Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or independent pathways, respectively. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, pp. 649-53.

Sousa, J.C. (2006). Manual de Antibióticos Antibacterianos, 2ª Edição. Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa.

Stanton, T.B., Humphrey, S.B., Stoffregen, W.C. (2011). Chlortetracycline-Resistant Intestinal Bacteria in Organically Raised and Feral Swine, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), pp. 7167–7170.

Tang, X. *et al.* (2011). Antimicrobial resistances of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from swine in China, *Microbial Pathogenesis*, 50, pp. 207-212.

van den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, pp. 327–335.

van der Fels-Klerx, H.J. *et al.* (2011). Farm factors associated with the use of antibiotics in pig production, *Journal of Animal Science*, 89, pp. 1922-1929.

Varga, C. *et al.* (2008). Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolated from swine fecal samples in 90 Alberta finishing farms, *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 72, pp. 175–180.

Veldman, K. *et al.* (2012). Characterization of qnr-positive *Escherichia coli* isolates from food-producing animals in the Netherlands, *J Antimicrob Chemother*, 61, pp. 1229–33.

Veldman, K. *et al.* (2011). International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enteric* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries, *J Antimicrob Chemother*, 66 pp. 1278–1286.

Vignaroli, C. *et al.* (2012). New Sequence Types and Multidrug Resistance among Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Coastal Marine Sediments, *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), pp. 3916–3922.

Wang, R. *et al.* (1996). PCR Detection and Quantization of Predominant Anaerobic Bacteria in Human and Animal Fecal Samples, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(4), pp. 1242–1247.

World Health Organization, (WHO), (2011). Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. [Em linha]. Disponível em <[http://www.euro.who.int/data/assets/pdf\\_file/0005/136454/e94889.pdf](http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0005/136454/e94889.pdf)>. [Consultado em 22/06/2013].

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

Zhao, S. *et al.* (2012). Comparison of the Prevalences and Antimicrobial Resistances of *Escherichia coli* Isolates from Different Retail Meats in the United States, 2002 to 2008, *Applied and Environmental Microbiology*, 12, pp. 1701–1707.

VIII. ANEXOS

ANEXO I

POSTER apresentado no 3<sup>rd</sup> Congress of European Microbiologists (FEMS 2009).  
 Gotemburgo, Suécia, 28 Junho – 2 Julho 2009.

Organização: Federation of European Microbiological Societies

**Antibiotic resistant *Enterobacteriaceae* from Portuguese piggeries**

Machado E<sup>1,2</sup>, Queirós C<sup>1</sup>, Silva V<sup>1</sup>, Monteiro A<sup>1</sup>, Silva R<sup>1</sup>, Coque TM<sup>3</sup>, and Peixe L<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>CEBIMED, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal; <sup>2</sup>REQUIMTE, Faculdade de Farmácia, Univ. do Porto, Portugal; <sup>3</sup>Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain.

### ABSTRACT

**Background:** Antibiotic (AB) overuse in animals, food chain, and trade seem to contribute to the spread of antibiotic resistant (AR) bacteria outside hospitals. Data about AR occurrence among food animals is scarce and limited to specific countries. **Objectives:** To evaluate the occurrence of AR *Enterobacteriaceae* in Portuguese piggeries. **Methods:** We analyzed 57 samples (fresh/dry faeces, nasal/hide, drinking/waste water, feed, air, powder, surfaces, xerume) from 5 Portuguese piggeries located in different regions (2006-07). After enrichment, samples were plated on MacConkey agar with/without AB. Isolates presumptively identified as *Enterobacteriaceae* by standard biochemical profiles were selected for further studies. AB susceptibility (22 ABs) was performed by standard CLSI methods. Presence of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL, conferring resistance to third-generation cephalosporins) was searched by double-disc synergy test. Genes encoding resistance to quinolones (*qnrA*, *qnrB*) were searched by PCR. **Results:** We identified 191 *Enterobacteriaceae*, the occurrence of resistant isolates being similar among piggeries. Isolates were commonly resistant to tetracyclines (84%), streptomycin (75%), sulfonamides (72%), and trimethoprim (70%), and also to chloramphenicol (25%), nalidixic acid (16%), other aminoglycosides (<12%) and ciprofloxacin (2%). Among  $\beta$ -lactams, resistance to cefotaxime was frequent (16%). ESBLs were detected among 14% of isolates (23 *E. coli*, 2 *Proteus vulgaris*, 1 *Salmonella muenchen*, 1 *Citrobacter freundii*), being consistently recovered from two piggeries. *qnrS* was found in one ESBL-producing *E. coli*, *qnrA*, *qnrB* and *qepA* were absent among ESBL producers. **Conclusions:** *Enterobacteriaceae* resistant to ABs used in clinical practice are frequently recovered from Portuguese piggeries. The potential dissemination to humans highlights the need for public health efforts to implement surveillance, epidemiologic, environmental health, and policy-making components.

### MATERIAL AND METHODS

**Bacterial isolates.** We analyzed 57 samples from 5 intensive-production piggeries (Pg) located in the North (n=18, Pg A), Centre (n=28, Pg C and Pg E), and South (n=11, Pg B) regions of Portugal, recovered between April 2006 and December 2007. Different types of samples were analyzed: fresh/dry faeces, nasal/hide, drinking/waste water, feed, air, powder, surfaces, and xerume. After pre-enrichment in buffered peptone water for 18 h at 37°C, samples were plated (0.2 mL) on MacConkey agar with and without ceftazidime (1 mg/L), cefotaxime (1 mg/L), tetracyclines (6 mg/L) or sulfonamides (256 mg/L). Presumptive *Enterobacteriaceae* were selected for further studies and identified by using API ID32GN galleries (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

**Antimicrobial susceptibility testing to beta-lactam and non-beta-lactam antibiotics was determined by the standard disk diffusion method following CLSI guidelines (7). The antibiotics tested were the following: amoxicillin-clavulanic acid, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, ceftiofur, aztreonam, imipenem, ciprofloxacin, nalidixic acid, tetracyclines, chloramphenicol, sulfonamides, trimethoprim, streptomycin, spectinomycin, kanamycin, gentamicin, amikacin, tobramycin, apramycin, neomicin and netilmicin. All intermediate-susceptible isolates were considered as non-susceptible.**

**Expression of ESBL was screened by the standard double disk synergy test using Mueller-Hinton agar plates with and without cloxacillin (250 mg/L) (8,9).**

**Genes encoding resistance to quinolones, namely *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and the recently described *qepA* gene, were searched by PCR using primers and amplification conditions previously described (10, 11) (Table 1).**

### RESULTS

**Epidemiological background**

- A total of 191 *Enterobacteriaceae* representing different colony morphotypes and antibiotic susceptibility patterns were obtained from fresh/dry faeces (n=47), nasal/hide (n=10), drinking/waste water (n=68), feed (n=43), air (n=12), powder (n=3), surfaces (n=1), and xerume (n=4) samples.
- Resistance patterns to non-beta-lactam antibiotics among *Enterobacteriaceae* from different piggeries**
- Similar resistance patterns to non-beta-lactam antibiotics were observed among isolates recovered from all piggeries. Distribution of resistance patterns to non-beta-lactam antibiotics among *Enterobacteriaceae* from each piggery studied is shown in Figure 1.
- Isolates were mostly non-susceptible (intermediate or resistant) to tetracyclines (84%), streptomycin (75%), sulfonamides (72%), and trimethoprim (70%).
- Non-susceptibility patterns to chloramphenicol (25%), nalidixic acid (16%), other aminoglycosides (<12%) and ciprofloxacin (2%) were more rarely observed.
- Resistance patterns to beta-lactam antibiotics among *Enterobacteriaceae* from different piggeries**
- Resistance rates to beta-lactam antibiotics greatly varied among isolates from each piggery evaluated (Figure 2).
- The unique *Enterobacteriaceae* recovered from Pg A was susceptible to all beta-lactam antibiotics. Among Pg B and Pg C, isolates were mostly resistant to amoxicillin-clavulanic acid and ceftiofur (27% and 22% versus 21% and 18%, respectively), indicating a possible high occurrence of AmpC-producing *Enterobacteriaceae*.
- Resistance to cefotaxime was frequently observed in *Enterobacteriaceae* recovered from Pg E and Pg F (22%, 10/45 and 24%, 16/66, respectively).
- Overall, resistance to cefotaxime was the most frequently observed (16%, 30/191) when analysing resistance rates obtained for beta-lactams tested.
- Resistance to ceftiofur was very low (0.5%) and all isolates were susceptible to imipenem.
- Occurrence of ESBL phenotypes**
- ESBL expression was observed in 14% (27/191) of the isolates included in this study and identified as *E. coli* (n=23), *P. vulgaris* (n=2), *S. marcescens* (n=1), and *C. freundii* (n=1).
- ESBL-producing *Enterobacteriaceae* were consistently recovered from two piggeries, Pg E and Pg F, localized in the Centre and North regions of Portugal, respectively, and showed a clear spread in these piggeries' environment, being detected in different samples: faeces (n=9), hide (n=2), feed (n=8), drinking water (n=4) and wastewater (n=4) samples.
- The majority of the isolates presenting an ESBL phenotype were susceptible to ceftazidime and resistant to cefotaxime, suggesting the dissemination of CTX-M enzymes in Portuguese piggeries.
- Distribution of multidrug resistant *Enterobacteriaceae* among different piggeries' samples analysed**
- Multidrug resistant *Enterobacteriaceae* (resistance to 2 or more antibiotics tested) were frequently recovered from xerume (100%, 4/4), drinking/waste water (71%, 48/68), nasal/hide (100%, 10/10), powder (100%, 3/3), and fresh faeces (97%, 33/34) samples.
- Occurrence of genes coding for resistance to quinolones among ESBL-producing *Enterobacteriaceae***
- qnrS* was found in one ESBL-producing *E. coli* recovered from a feed sample from Piggery E.
- qnrA*, *qnrB*, and *qepA* were absent among all ESBL-producing *Enterobacteriaceae*.

### INTRODUCTION

Antibiotic overuse in animals could create an important reservoir of antimicrobial resistant bacteria and genes that can spread to humans through the food supply (1, 2).

Some antimicrobial agents used in veterinary and human medicine belong to the same antibiotic families and hence selective pressures exercised in food producing animals' environments might contribute for the selection and dissemination of similar resistance genes (3, 4).

To ensure future effectiveness of antimicrobials in human medicine, WHO is developing international consensus guidelines for reducing the use of critically important antimicrobials in food animals (1). Other control measures to reduce the exposure are also being proposed by EFSA (5).

In a previous survey performed in *Enterobacteriaceae* isolates between 1998 and 2004 from faeces of Portuguese swine, dissemination of genes and epidemic plasmids coding for antibiotic resistance (mainly beta-lactams, aminoglycosides, sulfonamides, trimethoprim and quinolones) were reported (6).

Regular data about antibiotic resistance occurrence among food animals and their production environment is scarce and limited to specific countries. Continuous surveillance in a bigger scale, comprising food-producing farms from diverse geographic areas, is imperative for better control of antibiotic resistance.

### OBJECTIVES

- To evaluate the occurrence of antibiotic resistant *Enterobacteriaceae* in Portuguese piggeries.
- To investigate the presence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) enzymes among *Enterobacteriaceae* recovered from Portuguese piggeries.
- To evaluate the occurrence of genes coding for resistance to quinolones among ESBL-producing *Enterobacteriaceae*.

### REFERENCES

1. Collignon P et al. Clin Infect Dis 2006; 43:1641-51.  
 2. Antonov Agapov 1991; 13:279-316.  
 3. Van den Bogaert AE et al. J Antimicrob Chemother 2001; 47:767-71.  
 4. Ganiayre G et al. J Antimicrob Chemother 2006; 58:1025-32.  
 5. WHO 2006; 10:1-10.  
 6. Machado E et al. J Antimicrob Chemother 2008; 62:1049-54.  
 7. CLSI 2007; 28:1-16.  
 8. Archer G et al. J Antimicrob Chemother 2000; 45:1049-54.  
 9. Archer G et al. J Antimicrob Chemother 2000; 45:1049-54.  
 10. Archer G et al. J Antimicrob Chemother 2000; 45:1049-54.  
 11. Archer G et al. J Antimicrob Chemother 2000; 45:1049-54.

### ACKNOWLEDGMENTS

The present work was supported by funds of REQUIMTE and Fundação Europeia Cultura Fernando Pessoa.

\*machado@ufp.edu.pt