

Ana Rita da Costa Tavares



**Caracterização da estrutura populacional de isolados de *Escherichia coli* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto

2014



Ana Rita da Costa Tavares



**Caracterização da estrutura populacional de isolados de *Escherichia coli* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto

2014

Ana Rita da Costa Tavares

**Caracterização da estrutura populacional de isolados de *Escherichia coli* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal**

Orientadora:

Professora Doutora Elisabete Machado

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho elaborado por:

---

(Ana Rita da Costa Tavares)

## SUMÁRIO

*Escherichia coli* é uma bactéria pertencente à numerosa família *Enterobacteriaceae*. Está normalmente associada a infeções do trato urinário, meningites do recém-nascido, infeções intestinais e septicemia.

*E. coli* constitui também uma das bactérias mais prevalentes na flora intestinal dos animais e do Homem, sendo por isso frequentemente usada como indicador da pressão seletiva causada pelo uso de antibióticos no Homem e nos animais, com especial ênfase em animais para consumo humano. Dados recolhidos na Europa demonstram que há uma elevada ocorrência de estirpes de *E.coli* consideradas comensais provenientes tanto do Homem como de animais resistentes a vários antibióticos.

Os isolados de *E.coli* pertencentes aos grupos filogenéticos A e B1 são tradicionalmente considerados comensais. Contudo, cada vez mais têm sido associados a infeções extraintestinais tal como acontece nos grupos de maior virulência B2 e D.

O presente trabalho tem como objetivo principal caracterizar a estrutura populacional de isolados de *E.coli* provenientes de suiniculturas portuguesas, avaliar a sua resistência a antibióticos frequentemente usados clinicamente e relacionar essas resistências com a virulência tipicamente associada aos grupos filogenéticos, pois ainda são escassos os estudos neste nicho. É também objetivo deste estudo contribuir para a melhoria de estratégias de prevenção e controlo da transmissão da resistência aos antibióticos ao Homem, quer pela cadeia alimentar, quer através do ambiente, diminuindo desta forma os riscos para a Saúde Pública.

Para isso, foram analisados 155 isolados bacterianos, provenientes de amostras de animais e do ambiente (águas, ar, rações, entre outras) de uma suinicultura Portuguesa de produção intensiva, e outra de produção extensiva. Depois de realizada a extração do DNA bacteriano nos isolados analisados, identificou-se a presença de *E. coli* por PCR. Para os isolados identificados *E. coli*, procedeu-se a um PCR *multiplex* para determinação do grupo filogenético, tendo os produtos de PCR sido analisados por electroforese em gel de agarose. Efetuou-se ainda a análise da suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de

*E. coli* através do método de difusão por discos, tendo sido testados antibióticos pertencentes a diferentes classes.

Dos 155 isolados bacterianos analisados foram identificados como sendo *E. coli* 103 isolados (66%). Foi ainda observado que os isolados provenientes das duas suiniculturas estudadas foram mais frequentemente resistentes aos antibióticos espectinomicina (100%), neomicina (95%) e estreptomomicina (85%).

De uma forma geral, foram registadas maiores percentagens de resistência na suinicultura de produção intensiva. O grupo filogenético A é predominante no total de isolados considerados resistentes. Embora em menos quantidade, o filogruppo D aparece associado a isolados de *E. coli* resistentes a quase todos os antibióticos analisados.

As suiniculturas portuguesas parecem assim ser potenciais reservatórios de bactérias virulentas e com resistências a antibióticos de uso clínico Humano e possivelmente de genes de resistência a antibióticos com elevada capacidade de dispersão.

O tema da resistência aos antimicrobianos é um assunto de elevada importância, contudo é uma área que ainda tem uma grande lacuna, sobretudo no papel dos animais na epidemiologia da resistência a antibióticos, sendo necessário realizar mais estudos para que seja possível implementar medidas eficazes no controlo de resistências a antibióticos.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is a bacteria part of the numerous family known as *Enterobacteriaceae*. It is normally associated with urinary tract infections, newborn meningitis intestinal infections and septicemia.

*E. coli* is also one of the most prolific bacteria both in men's and animal's intestinal flora, which is why it is frequently used as an indicator of the selective pressure caused by the use of antibiotics in men and animals, especially when it comes to the production of animals for human consume. Data gathered around Europe shows a high occurrence of *E.coli* commensal strains present in men and animals which are resistant to various antibiotics.

*E.coli* isolated belonging to phylogenetic groups A and B1 are traditionally considered to be commensal. Nevertheless, they have increasingly been associated with extra-intestinal infections, something common among the more virulent groups B2 and D.

The main objective of this study is to characterize the population structure of *E.coli* isolated obtained from Portuguese pig farms, evaluate their resistance to some of the most clinically used antibiotics and to relate those resistances with the virulence showed by the phylogenic groups, as there are very few studies on the matter. This study also intends to define strategies or enhance those already in place in order to help prevent the transmission of resistances to men, may it be through the food chain or the environment, ultimately decreasing public health's risks.

With that aim in mind, 155 bacteria isolated were analyzed using samples of animals and the environment (water, air, rations, among others) belonging to an intensive production Portuguese pig farm and another one of extensive production. After extracting bacterial DNA from the isolated, it was possible to identify the presence of *E. coli* by PCR. For the identified *E. coli* isolated it was done a PCR *multiplex* to determine the phylogenic group, including the analysis of every single PCR product by the way of agar gel electrophoresis. It was also conducted the susceptibility analysis of the *E. coli* isolated through the disc diffusion method (Kirby – Bauer method), with different classes antibiotics being tested.

Of the 155 bacterial isolated analyzed, 103 isolated (66%) were identified as being *E. coli*. Additionally, it was also observed that the isolated originating from the two studied pig farms were frequently more resistant to the spectinomycin antibiotic (100%), neomycin (95%) and streptomycin (85%).

In general, higher percentages of resistance were recorded in the intensive production pig farm. The phylogenetic group A is predominant in the total number of isolated considered to be resistant. Although in a lesser quantity, phylogenetic group B appears associated to *E. coli*. isolated resistant to almost all antibiotics tested.

Portuguese pig farms seem to be potential virulent bacteria repositories with resistance to human clinic antibiotics and possibly also repositories of antibiotic resistant genes with high capacity of dispersion.

The theme of antimicrobial resistance is a matter of huge importance but still an area with a lot to discover, mainly in the role played by animals in the epidemiology of antibiotic resistance. It is necessary to conduct more studies in order to make it possible to implement efficient measures in the control of antibiotic resistances.

## Agradecimentos

À Universidade Fernando Pessoa e respetivos professores pela excelente formação que me proporcionaram ao longo do curso.

À minha orientadora Professora Doutora Elisabete Machado pelo apoio, disponibilidade e conhecimentos transmitidos ao longo desta fase.

Aos meus pais pelo apoio, confiança e investimento depositados ao longo do todo o meu curso.

Ao meu namorado pelo companheirismo e apoio prestado que tornou possível chegar a esta ultima etapa no meu percurso académico.

À minha família e amigos por me terem acompanhado nos bons e maus momentos, tornando a conclusão do meu curso mais simples.

A todos, muito obrigado.

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1. <i>Escherichia coli</i></b> .....	1
<b>1.1. Características gerais</b> .....	1
<b>1.2. Virulência</b> .....	1
<b>1.3. Resistência</b> .....	4
<b>1.4. Estrutura populacional</b> .....	13
<b>2. Suinicultura em Portugal: produção intensiva e extensiva</b> .....	16
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	18
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
<b>1. Isolados bacterianos</b> .....	19
<b>2. Identificação de isolados de <i>E. coli</i> e determinação de grupos filogenéticos...</b>	19
<b>2.1 Extração do DNA bacteriano</b> .....	19
<b>2.2 Amplificação de ácidos nucleicos por PCR</b> .....	19
<b>2.3 Electroforese</b> .....	21
<b>3. Avaliação da suscetibilidade aos antibióticos</b> .....	21
<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
<b>1. Ocorrência e estrutura populacional de <i>E. coli</i></b> .....	22
<b>2. Resistência a antibióticos entre os isolados de <i>E. coli</i> analisados</b> .....	24
<b>V. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	29
<b>VI. BIBLIOGRAFIA</b> .....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Consumo de antibacterianos de uso sistémico na Europa, em 2011, expressos em DDD (Doses Diárias Definidas) por 1000 habitantes e por dia.....	5
<b>Figura 2</b> - Proporção isolados de <i>E. coli</i> resistentes a vários antibióticos em Portugal em 2012.....	6
<b>Figura 3</b> - Ocorrência de isolados de <i>E. coli</i> resistentes a fluoroquinolonas e o uso de fluoroquinolonas em ambulatório no mesmo país no ano de 2004.....	7
<b>Figura 4</b> - Antibióticos usados na produção animal no ambiente.....	12
<b>Figura 5</b> - Percentagem de resistência aos antibióticos em isolados de <i>E. coli</i> , provenientes da suinicultura E.....	24
<b>Figura 6</b> - Percentagem de resistência aos antibióticos em isolados de <i>E. coli</i> , provenientes da suinicultura D.....	25
<b>Figura 7</b> - Percentagem de resistência aos antibióticos em isolados de <i>E. coli</i> , provenientes das duas suiniculturas e respetiva associação com grupos filogenéticos .....	27

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - <i>Primers</i> e condições de PCR usados no estudo.....	20
<b>Tabela 2</b> - Número de isolados e respetiva distribuição por grupos filogenéticos para cada suinicultura analisada.....	22

## **Lista de abreviaturas**

Amc – Amoxicilina+Ácido Clavulânico

Ami – Amicacina

Apr – Apramicina

Atm – Aztreonamo

Can – Canamicina

Caz – Ceftazidima

Cip - Ciprofloxacina

Clo – Cloranfenicol

Ctx – Cefotaxima

DGV – Direção Geral de Veterinária

E. coli – *Escherichia coli*

ESBL –  $\beta$ -Lactamases de Espectro Alargado

Esp – Espectinomicina

Fep – Cefepime

Fox - Cefoxitima

Gta – Gentamicina

Ipm – Imipenemo

MLST – *Multilocus Sequence Typing*

Nal – Ácido Nalidíxico

Neo – Neomicina

Net – Netilmicina

PCR - Reação de Amplificação em Cadeia

PFGE – Electroforese em Gel de Campo Pulsado

r.p.m. – rotações por minuto

Smi – Estreptomicina

Sul - Sulfonamidas

TAE – Tris-Acetato-EDTA

Tet – Tetraciclina

Tig – Tigeciclina

Tmp – Trimetoprim

Tob – Tobramicina

## I. INTRODUÇÃO

### 1. *Escherichia coli*

#### 1.1. Características gerais

*Escherichia coli* é uma bactéria pertencente à numerosa família *Enterobacteriaceae*. É constituída por bacilos de Gram negativo, é uma bactéria não fastidiosa, pode ou não possuir cápsula, é móvel, anaeróbica facultativa e fermentadora da lactose. (Lukjancenکو *et al.*, 2010). É capaz de crescer a temperaturas elevadas (44°C) (Mims *et al.*, 2005).

O seu habitat natural é a flora intestinal normal do Homem e dos animais, podendo haver colonização na porção inferior da uretra e canal vaginal. A sua colonização dá-se por contacto e ingestão (fecal-oral). Pode ser também encontrada nos solos, plantas e águas, tendo uma distribuição ubiqüitária (Mims *et al.*, 2005).

*E. coli* engloba um número vasto de grupos e tipos serológicos, identificados através de anti-soros preparados contra os três antígenos (O, K e H) que ocorrem nesta espécie (Stenutz *et al.*, 2006).

*E. coli* está normalmente associada a infeções urinárias, meningite do recém-nascido, infeções intestinais e septicemia (Mims *et al.*, 2005).

#### 1.2. Virulência

Existem estirpes de *E. coli* que possuem fatores de virulência que lhes permitem causar infeções no trato intestinal ou em outros locais do organismo, principalmente no trato urinário (Mims *et al.*, 2005). Assim, embora seja uma bactéria comensal do trato intestinal, existem estirpes de *E. coli* que podem causar perturbações entéricas mundialmente conhecidas pelos acrónimos: EPEC, ETEC, EHEC, EIEC, EAEC e DAEC (Woolverton *et al.*, 2008).

As estirpes ETEC (*E. coli* enterotoxígenas) são bioserotipos de *E. coli* que produzem enterotoxinas termolábeis (LTI e LTII) e termoestáveis (STa e STb), sendo responsáveis pela patogénese da infeção entérica (Dubreuil, 2013). ETEC coloniza a superfície da

mucosa do intestino delgado e produz enterotoxinas, o que leva ao aumento de secreções intestinais. A colonização é mediada por uma ou mais fímbrias proteicas. A percentagem de ETEC em crianças com diarreia varia de 10 a 30%. Vários estudos sugerem que 20 a 60% dos viajantes oriundos de países desenvolvidos têm diarreia nos países onde infeções de ETEC são endémicas e 20 a 40% desses casos são realmente causados por ETEC, sendo por isto mais conhecida pela diarreia do viajante. Os serogrupos mais comuns de ETEC são: O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O78, O128, O148, O149, O159 e O173 (Stenutz *et al.*, 2006).

EIEC (*E. coli* enteroinvasiva) constituem uma forma patogénica de *E. coli* que pode casar disenteria. Esta estirpe penetra a mucosa intestinal, predominantemente aquela que reveste o intestino grosso, para causar inflamação e úlceras na mucosa que são características de disenteria. É caracterizada por fezes frequentes de pequeno volume com sangue e muco. No entanto, a maior parte das pessoas infetadas com EIEC apresentam diarreias aquosas que podem ou não ser seguidas de disenteria indistinguível da causada por outras estirpes de *E. coli* (por exemplo: EPEC e DAEC). O reservatório das estirpes EIEC é o próprio Homem e a infeção é adquirida pela ingestão de água e alimentos contaminados e ainda por contacto entre indivíduos. Os serogrupos mais comuns são: O28ac, O29, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, O159, O164 e O167 (Stenutz *et al.*, 2006).

A infeção causada pelas estirpes EPEC (*E. coli* enteropatogénicas) está normalmente associadas a crianças com idade inferior a 2 anos. EPEC causa principalmente diarreia aguda. No entanto, foram descritos muitos casos de diarreia persistente associados a esta infeção. Outros sintomas associados são a presença de vómitos e febres baixas (Stenutz *et al.*, 2006). Estas bactérias atuam através da adesão às microvilosidades da bordadura em escova do epitélio intestinal causando um tipo específico de dano celular chamado de “*attaching-effacing*” (AE). Estas lesões representam a destruição das microvilosidades permitindo a penetração das bactérias. A destruição das células leva à subsequente diarreia. As estirpes EPEC constituem uma importante causa de diarreia nas crianças residentes em países em desenvolvimento (Woolverton *et al.*, 2008). Os serogrupos mais comuns são: O18ac, O20, O25, O26, O44, O55, O86, O91, O111, O114, O119, O125ac, O126, O127, O128, O142 e O158 (Stenutz *et al.*, 2006).

As estirpes EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) são produtoras de toxinas parecidas com as toxinas Shiga (Stx-1 e Stx-2). EHEC também produzem, como descrito para EPEC, lesões do tipo AE, causando colites hemorrágicas com dores abdominais agudas e cólicas, seguidas de diarreias sanguinolentas. A maior parte dos pacientes recupera em 10 dias, contudo em certos indivíduos (principalmente crianças e idosos) a infecção pode originar situações como a síndrome urémico-hemolítico. Esta é uma doença caracterizada por haver falência renal, anemia hemolítica e trombocitopenia. *E. coli* O157:H7 é o serotipo de EHEC mais frequente (Woolverton *et al.*, 2008). Os serogrupos mais comuns são: O4, O5, O16, O26, O46, O48, O55, O91, O98, O111ab, O113, O117, O118, O119, O125, O126, O128, O145, O157 e O172 (Stenutz *et al.*, 2006).

A infecção causada pelas estirpes EAEC (*E. coli* enteroagrativa) ocorre através da adesão bacteriana a células epiteliais em regiões localizadas, formando aglomerados de bactérias (Woolverton *et al.*, 2008). Está normalmente associada a diarreias espontâneas em crianças e em indivíduos imunodeprimidos, como o caso de portadores do vírus da imunodeficiência humana. A sua forma de transmissão está principalmente associada à ingestão de alimentos contaminados com esta estirpe. Os genes que codificam a capacidade agregativa estão contidos em plasmídeos denominados de pAA (Okhuysen e Dupont, 2010). Os serogrupos identificados são: O3, O7, O15, O44, O77, O86, O111, O126 e O127 (Stenutz *et al.*, 2006).

As estirpes DAEC (*E. coli* de adesão difusa) aderem a toda a superfície das células epiteliais e normalmente causam doenças em crianças mal nutridas. Foi sugerido que as estirpes DAEC podem ter fatores de virulência ainda não definidos, contudo ainda são escassos os estudos realizados sobre esta estirpe (Stenutz *et al.*, 2006; Woolverton *et al.*, 2008).

*E. coli* é também o agente patogénico mais frequente de infecção urinária sendo responsável por causar 80-90% das infeções urinárias adquiridas na comunidade. (Ejrnaes, 2011).

A aderência ao urotélio compõe a primeira fase na patogénese da infecção urinária, podendo invadir o trato urinário baixo e/ou superior. A aderência bacteriana às superfícies mucosas depende essencialmente das fímbrias bacterianas. As fímbrias

perdominantes nas estirpes uropatogénicas de *E. coli* (UPEC) são as do tipo 1, fímbrias P e as adesinas X. Os genes que codificam as fímbrias de estirpes uropatogénicas são de origem cromossómica, enquanto que os genes que codificam as fímbrias nas estirpes enterotoxigénicas de *E. coli* são de origem plasmídica (Ferreira *et al.*, 2000). Os serogrupos associados às UPEC são os: O4, O6, O14, O22, O75 e O83 (Stenutz *et al.*, 2006).

Do ponto de vista da virulência, as estirpes de *E. coli* podem ainda ser classificadas, através de análises filogenéticas, em quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D) (Doumith *et al.*, 2012).

As estirpes virulentas a nível extraintestinal têm vindo tradicionalmente a ser descritas como pertencendo aos grupos filogenéticos B2 ou D. Os filogrupos A e B1 incluem frequentemente estirpes comensais. A determinação dos grupos filogenéticos é essencial para a prática biomédica, uma vez que é estabelecida uma relação entre o grupo filogenético e a sua virulência, servindo como uma ferramenta indispensável para uma rápida triagem (Doumith *et al.*, 2012). É também frequentemente usada em estudos de análise da estrutura de isolados de *E. coli*, em conjunto com dados de tipagem por PFGE (electroforese em gel de campo-pulsado) e MLST (tipagem de sequências multilocus) (Woodford *et al.*, 2011).

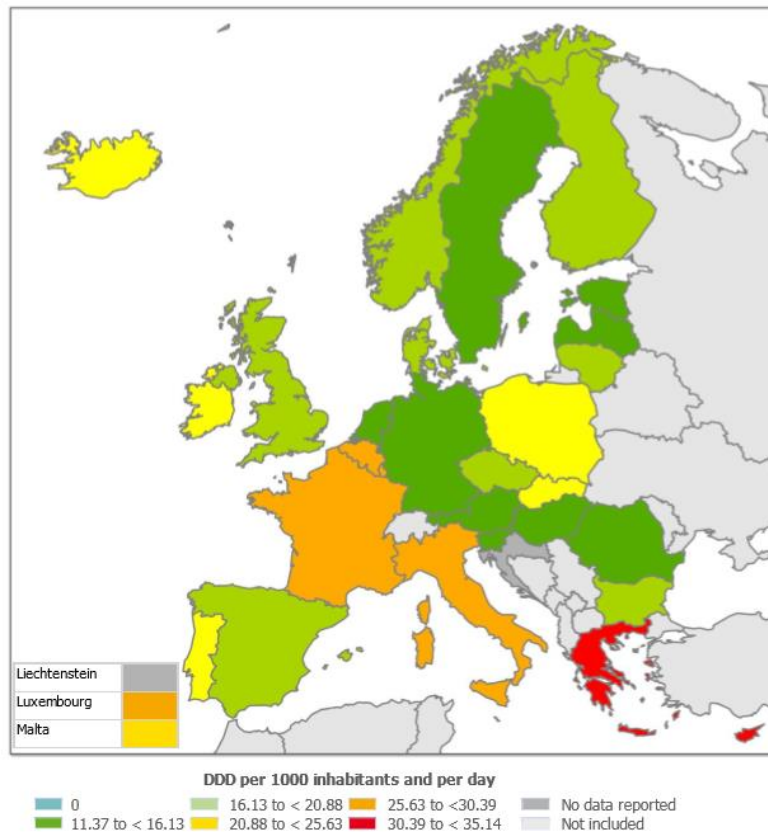
### **1.3. Resistência**

As doenças microbianas foram na era pré-antibiótica a principal causa de morte no Homem. A descoberta dos antibióticos foi decisiva para o controlo das doenças bacterianas levando ao decréscimo da morbilidade e da mortalidade causada por essas infeções. Posto isto, os antibióticos são considerados os fármacos mais importantes do século XX (Sousa, 2006).

O uso excessivo e inadequado de antibióticos, em países desenvolvidos e em desenvolvimento, levou ao aparecimento de novos problemas considerados hoje em dia de Saúde Pública, nomeadamente a emergência de doenças causadas por bactérias tradicionais, mas multirresistentes aos antibióticos mais usados. Este uso indisciplinado

de antibióticos, tanto a nível da medicina humana como da medicina veterinária incluindo o uso na agropecuária, despoletou o aparecimento e ainda a disseminação (às vezes epidémica e/ou pandémica) de clones bacterianos multirresistentes aos antibióticos (Sousa, 2006).

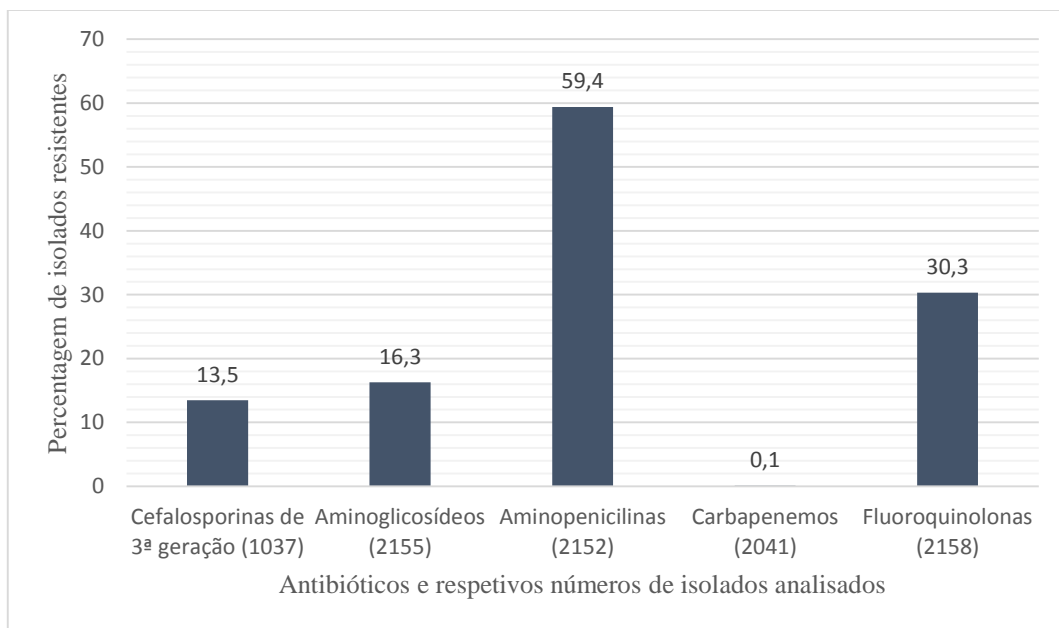
Na Europa, entre os anos 2010 e 2011, o consumo de antibióticos diminuiu em sete países, nomeadamente na: Áustria, Alemanha, Grécia, Hungria, Islândia, Luxemburgo e Portugal. Contudo, no mesmo período de tempo, o consumo de antibióticos aumentou ligeiramente em quatro países (Países Baixos, Eslovénia, Suécia e Reino Unido) (ECDC, 2011). Na Figura 1, é possível observar o consumo de antibióticos em quase toda a Europa no ano de 2011.



**Figura 1** - Consumo de antibacterianos de uso sistémico na Europa, em 2011, expressos em DDD (Doses Diárias Definidas) por 1000 habitantes e por dia (adaptado de ECDC, 2011).

Em Portugal, a tendência decrescente de consumo de antibióticos é notória, apesar das assimetrias de consumo registadas segundo dados das diferentes ARS (Administrações Regionais de Saúde), verificando-se um menor consumo na zona de Lisboa e Vale do

Tejo e um maior consumo na zona do Alentejo, no ano de 2012 (DGS, 2013). Devido ao consumo de antibióticos ainda ser tão elevado, apesar do seu decréscimo, são consequências disso o aparecimento de inúmeras resistências a variadas classe de antibióticos. Na Figura 2 é possível observar a taxa de isolados de *E. coli* resistentes a vários grupos de antibióticos analisados em Portugal no ano de 2012.

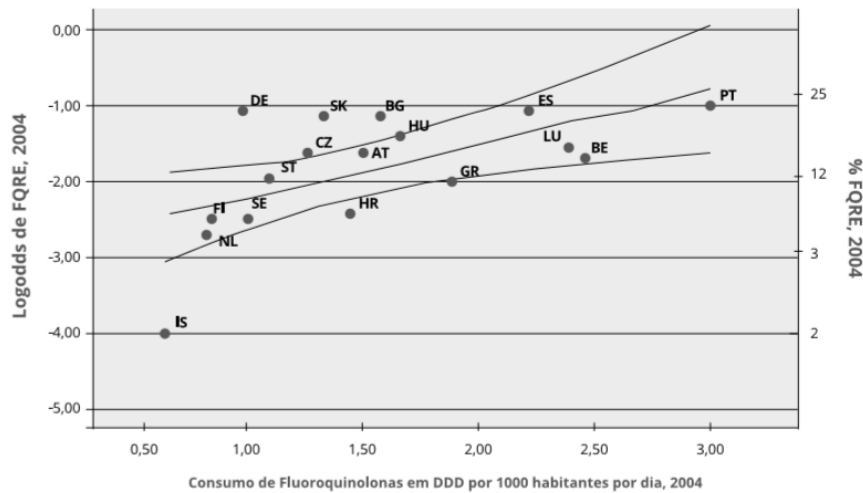


**Figura 2** - Proporção isolados de *E. coli* resistentes a vários antibióticos em Portugal em 2012 (adaptado de ECDC, 2012).

A crescente taxa de resistência dos microrganismos, aliada ao decréscimo do desenvolvimento e síntese de novas classes de antimicrobianos conduz a que o antibiótico esteja em risco de perda de eficácia, em menos de cem anos após a sua descoberta com a penicilina e depois de ter contribuído para um aumento significativo da esperança média de vida (DGS, 2013).

Atualmente é sabido que existe uma correlação entre o excessivo consumo de uma classe de antimicrobianos e o maior desenvolvimento de resistências a essa mesma classe, levando isto muitas vezes, à opção por esquema de terapêutica antibiótica de mais largo espetro, para garantir que haja sucesso no tratamento, aumentando, no entanto, a pressão antibiótica e a probabilidade de desenvolvimento de mais resistências (DGS, 2013). É

exemplificativo desta correlação entre o consumo de antibióticos e aparecimento de resistências a ocorrência de *E. coli* resistente a fluoroquinolonas e o uso das mesmas em ambulatório, como demonstra a Figura 3.



**Figura 3** – Ocorrência de isolados de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas e o uso de fluoroquinolonas em ambulatório no mesmo país no ano de 2004 (adaptado de DGS, 2013).

### 1.3.1. Mecanismos de resistência

As resistências a antibióticos pode ser de origem natural ou adquirida. Existem grupos de bactérias que possuem resistência natural a vários antibióticos. É exemplo deste tipo de resistência o caso da vancomicina não ter atividade contra bactérias de Gram negativo, uma vez que, o fato de estas moléculas terem um elevado peso molecular, impede a sua difusão através dos canais de porina presentes na membrana exterior da sua parede celular (Sousa, 2006).

Contudo, as resistências bacterianas aos antibióticos mais comuns são as de origem adquirida por mutação ou então aquisição de elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposões, sequências de inserção, integroes e cassetes genéticas de resistência na células bacterianas) a partir de outra bactéria. A resistência adquirida por mutação pode ocorrer espontaneamente no DNA cromossômico ou plasmídico, ou por transposição de fragmentos de DNA. Se uma dada mutação provocar uma resistência a um antibiótico,

quando usado esse mesmo antibiótico irá haver promoção da seleção do mutante (Sousa, 2006).

Uma estirpe bacteriana bem-sucedida é um veículo extremamente efetivo para a disseminação de elementos, como os plasmídeos, transposões ou integrões, por pelo menos duas razões: todos os elementos de resistência hospedados são transmitidos verticalmente, em virtude da disseminação da estirpe e o aumento da sua prevalência; uma estirpe bem-sucedida possui ainda múltiplas oportunidades para agir como dador e transferir os seus elementos de resistência horizontalmente para outras estirpes, espécies ou géneros (Woodford *et al.*, 2011).

### **1.3.2. Resistência em *E. coli* de origem animal**

No setor de produção animal, os antibióticos podem ser usados com a finalidade de combater infeções bacterianas, como promotores de crescimento animal ou em casos de profilaxia e/ou metafilaxia. Contudo, a utilização de antibióticos como promotores de crescimento foi proibida na Comunidade Europeia a partir de 1 de Janeiro de 2006 (EC, 2008).

Os animais de produção intensiva são frequentemente mantidos em grupo. Embora tal resulte conveniente para a gestão prática da produção, no caso em que surge uma doença, todo o grupo pode ficar em risco, havendo uma elevada possibilidade de a doença infetar a maioria ou mesmo todos os animais do grupo a partir do momento em que um animal mostre sinais de infeção. Torna-se imprescindível nestas situações expor o grupo todo a uma dada medicação. Esta prática clínica é designada “metafilaxia”. Já o tratamento profilático é feito em intervalos identificáveis e previsíveis, ao longo do ciclo de vida do animal, ao aparecimento de infeções bacterianas, como por exemplo, problemas respiratórios depois do reagrupamento, colibacilose no período pós desmame, entre outros (OMV, 2010).

Os antibióticos mais usados em veterinária em Portugal pertencem à classe das tetraciclina, seguindo-se a classe das penicilinas (DGV, 2010). Segundo a DGV (Direção-Geral de Veterinária), analisando apenas os medicamentos veterinários para uma espécie-alvo é possível constatar que para as aves a substância ativa mais usada é a enrofloxacina (classe das quinolonas), para os bovinos a cloxacilina (classe dos  $\beta$ -

lactâmicos), para os suínos a amoxicilina (classe dos  $\beta$ -lactâmicos), para os coelhos a sulfaquinoxalina (classe das sulfonamidas) e para os cavalos a benzilpenicilina (classe dos  $\beta$ -lactâmicos). Nos animais de companhia a substância ativa de maior consumo é a amoxicilina (DGV, 2010).

Dos medicamentos veterinários antimicrobianos objeto do relatório e estudo pela DGV, os que são destinados a suínos contribuem para 85,31% da quantidade de substâncias ativas antimicrobianas disponibilizadas em 2010 para fins veterinários, quando se tem apenas em conta os medicamentos para uma única espécie. Juntamente com as aves constituem mais de 97% dos antibióticos disponibilizados para utilização veterinária (DGV, 2010).

Um estudo desenvolvido em Portugal descreve a presença de integrões e de vários genes de resistência (como codificadores de  $\beta$ -lactamases de largo espectro) em amostras identificadas como sendo *Enterobacteriaceae*, provenientes de frangos e suínos (Machado *et al.*, 2008). Os resultados deste estudo mostraram que vários isolados produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado eram resistentes a antibióticos usados na produção animal intensiva. Foi possível ainda, concluir que as resistências estavam associadas a estirpes de *E. coli* comensais de origem animal. Foi possível aferir que os animais, como as aves e suínos, podem ser potenciais reservatórios de bactérias e genes de resistência a antibióticos (Machado *et al.*, 2008).

É sabido que as bactérias resistentes a antibióticos selecionadas em animais podem contaminar a carne advinda desses mesmos animais. Essa mesma contaminação também pode diminuir quando os animais deixam de ter a exposição aos antibióticos em questão (Phillips *et al.*, 2004).

Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), o uso de antibióticos em animais de consumo humano pode afetar a saúde humana através de resíduos do fármaco no alimento e particularmente através da seleção de bactérias resistentes nos animais de consumo alimentar. As consequências desta seleção incluem o aumento do risco de transmissão de agentes patogénicos ou comensais resistentes aos antibióticos através da cadeia alimentar, carne mal passada, carne contaminada com material intestinal durante o abate, do contacto direto com os animais, ou da água contaminada, com consequente transferência

de genes resistentes da flora bacteriana do animal para a flora bacteriana humana (WHO, 2001).

Existem outras fontes potenciais de *E. coli* resistentes a antibióticos, para além dos animais de produção intensiva e extensiva. Os próprios humanos, bem como outros animais podem ser fonte de bactérias resistentes (Phillips *et al.*, 2004). As bactérias comensais e patogénicas (incluindo estirpes resistentes) podem chegar ao ambiente através dos esgotos. Por sua vez, os animais selvagens, especialmente roedores, pássaros (sobretudo gaivotas), podem adquirir as bactérias resistentes e transmiti-los através dos seus excrementos para terrenos de pastoreio ou para alimentos de animais de produção para consumo humano (Phillips *et al.*, 2004). Os vegetais podem também ser contaminados pelas águas dos esgotos, principalmente em países em que as fezes humanas são utilizadas como fertilizantes. Ainda mais, os antibióticos são muito utilizados para prevenir doenças nas plantas, como é o exemplo das tetraciclina e aminoglicosídeos que são usados para proteger árvores de fruto de doenças como a “fogo bacteriano”. A piscicultura é também uma área que envolve o uso de antibióticos (Phillips *et al.*, 2004).

Os animais portadores de bactérias resistentes são também um perigo para aqueles que trabalham com eles diretamente, uma vez que, essas resistências podem ser transferidas por contacto direto. São exemplos disto, casos descritos na Holanda, de agricultores e animais de produção (perús) que demonstraram em análises feitas às fezes bactérias semelhantes (*Enterococcus faecium*) resistentes (Phillips *et al.*, 2004).

A flexibilidade e adaptabilidade da bactéria *E. coli* a ambientes constantemente em mudança permitem que esta adquira um grande número de mecanismos de resistência a antibióticos. As estirpes de *E. coli* comensais residentes no intestino são repetidamente desafiadas por pressões antimicrobianas durante o tempo de vida do hospedeiro. Consequentemente, as estirpes comensais adquirem os respetivos genes de resistência e/ou desenvolvem mutantes resistentes de maneira a conseguirem sobreviver e manter a homeostasia microbiana no intestino. Assim, *E. coli* comensal é considerada como um indicador de carga antimicrobiana nos seus hospedeiros (Szmolka e Nagy, 2013).

Semelhante a outros membros da família *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, pode optar de entre de um vasto leque de mecanismos para se afastar de efeitos simultâneos de vários agentes

antimicrobianos. Certas estruturas proteicas, que podem mediar simultaneamente o efluxo de uma ampla gama de antibióticos para as células, ou causar uma diminuição da permeabilidade das membranas, são mecanismos de resistência cromossomais já conhecidos que provocam multirresistências em diferentes estirpes de *E. coli* (Szmolka e Nagy, 2013).

Num estudo realizado por Szmolka e Nagy (2013), foi selecionado um grupo de estirpes de *E. coli* de origem suína, bovina e aviária, representativas de uma amostra diversificada de fontes de animais saudáveis e doentes. Observou-se que, independentemente da origem do hospedeiro, genes que codificam para resistência estavam abundantemente presentes, conferindo simultaneamente resistência a três ou mais antibióticos importantes, incluindo aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactâmicos, sulfonamidas e tetraciclina, indicando a persistência de um “padrão comum” de multirresistência. Esta situação observou-se também em estudos de vários países Europeus, mas foram ainda registadas resistências à ampicilina, doxiciclina, tetraciclina, sulfametoxazol e trimetropim em produções de aves e suínos na China (Szmolka e Nagy, 2013).

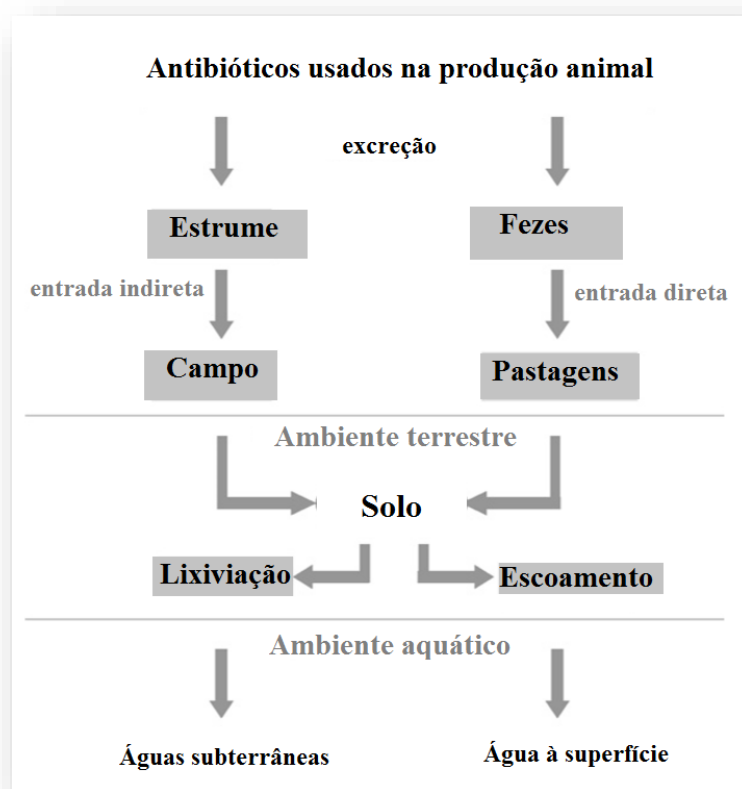
Animais de estimação, especialmente cães e gatos, começaram a ter uma atenção maior só apenas nos últimos dez anos. A maior parte dos estudos nestes nichos têm sido feitos em bactérias de Gram positivo (Szmolka e Nagy, 2013). Contudo, já começam a aparecer alguns estudos feitos em resistências de *E. coli* comensal obtida a partir de animais de estimação, humanos e do espaço que ambos coabitam. Constatou-se que as estirpes de *E. coli* comensais apresentavam padrões de resistência antimicrobiana comuns que resultaram do contacto direto e contaminação cruzada entre todas as espécies coabitantes incluindo os humanos (Szmolka e Nagy, 2013).

Assim sendo, a flora comensal pode ser considerada como fonte rica de estirpes de *E. coli* resistentes a antibióticos (Szmolka e Nagy, 2013). Por outro lado, **a resistência a antibióticos em *E. coli* comensal pode ser uma vantagem** ao ajudar a manter o equilíbrio microbiológico/fisiológico do intestino durante e depois dos tratamentos com antibióticos (Szmolka e Nagy, 2013).

Os antibióticos não são completamente eliminados no organismo animal. As taxas de excreção dependem da substância, do modo de aplicação, da espécie animal que a está a

excretar e o tempo que o demora a fazer. Constatou-se que para a classe de antibióticos tetraciclina e sulfonamidas as taxas de excreção variam entre os 40-90%. Já outras substâncias como a amoxicilina têm uma taxa de apenas 10-20% de eliminação (Kemper, 2007).

A Figura 4 representa de forma esquemática possíveis vias de exposição ambiental às substâncias dos antibióticos que são excretados pelos animais de produção (Kemper, 2007).



**Figura 4** – Antibióticos usados na produção animal no ambiente (adaptado de Kemper, 2007).

A identificação de vários surtos causados por diferentes estirpes de *E. coli* em países como os Estados Unidos da América, Inglaterra (Londres), Dinamarca (Copenhaga) e no Canadá, sugerem que possivelmente carne e outros tipos de comida, podem ter um papel importante na disseminação de estirpes de *E. coli* intimamente relacionadas. Evidências demonstraram que a comida pode ser um reservatório de *E. coli*, nomeadamente: 1) surtos de estirpes de *E. coli*, numa comunidade, provocaram infeções urinárias não complicadas e infeções severas; 2) determinou-se que estas estirpes epidémicas partilham padrões de suscetibilidade a antibióticos e genótipos também encontrados em isolados de carne para

consumo humano; 3) houve uma associação epidemiológica entre o consumo de carne e o aparecimento de *E. coli* resistentes a antibióticos provocando o aparecimento de infeções (Vincent *et al.*, 2010).

Estirpes de *E. coli* responsáveis por infeções extraintestinais em aves, em concreto colibaciloses, são conhecidas como estirpes APEC (estirpes *E. coli* patogénicas aviárias) são consideradas um grupo heterogéneo de bactérias com um largo espetro de características de virulência (Cunha *et al.*, 2014). Um estudo feito sobre a resistência a antibióticos de *E. coli* isolada de perús com aerossaculite (doença respiratória das aves) demonstrou uma prevalência elevada de estirpes de *E. coli* do grupo filogenético B2 possuindo genes de virulência, como são exemplos o *ibeA* e o *neuS* (Cunha *et al.*, 2014). Este estudo torna relevante e alerta para a possibilidade de estas aves (perús) agirem como reservatórios de bactérias potencialmente virulentas que colocam em perigo a Saúde Pública (Cunha *et al.*, 2014).

Preocupações com a prevalência da resistência a antibióticos estão a crescer a nível mundial, parecendo poderem estar associadas com o uso indiscriminado de antibióticos em produção animal (Cunha *et al.*, 2014).

#### **1.4. Estrutura populacional**

De entre os métodos mais utilizados para a genotipagem de bactérias destaca-se o método de tipagem designado de *Multilocus Sequence Typing* (MLST, por analisar por sequenciação sete genes *housekeeping* da espécie), electroforese em gel de campo pulsado (PFGE), a análise do polimorfismo de fragmentos amplificados (AFLP), entre outros (Woodford *et al.*, 2011). O MLST é um método que se baseia na sequenciação de sete genes de manutenção (“*housekeeping*”) da espécie para obter uma análise filogenética, identificar o organismo e fazer tipagem. O PFGE permite uma separação de fragmentos muito maiores de DNA do que aqueles que são separados na eletroforese comum permitindo uma tipagem de uma grande variedade de espécies bacterianas por análise de todo o seu genoma. O MLST possui a vantagem de ser um método definitivo que permite que isolados provindos de qualquer local geográfico sejam tipados e

comparados. É contudo um método dispendioso e como tal são usados como alternativa métodos mais baratos como o caso do PFGE (Woodford *et al.*, 2011).

Tem havido um aumento generalizado da prevalência de isolados que são resistentes a oximino-cefalosporinas por produção de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBL), principalmente enzimas do tipo CTX-M (Woodford *et al.*, 2011). O tipo de CTX-M que parece ser mais prevalente a nível mundial é a CTX-M-15. Como consequência deste aumento, o interesse pelo estudo da biologia de estirpes de *E. coli* patogénicas extraintestinais multirresistente aumentou exponencialmente. A utilização do MLST para caracterizar as estirpes produtoras de CTX-M-15 ESBL levou ao reconhecimento de um clone internacionalmente disseminado e designado de B2-O25:H4-ST131 (Woodford *et al.*, 2011). O ST131 é assim uma linhagem de *E. coli* uropatogénica virulenta do grupo filogenético B2. Num estudo feito no Reino Unido, a maior parte dos isolados ST131 produziam CTX-M-15, contudo alguns produziam a enzima CTX-M-3 e outros adquiriram adicionalmente uma enzima do tipo AmpC plasmídica designada de CMY (Woodford *et al.*, 2011). Isto ilustra o fato de que membros de clones individuais generalizados podem ser associados a diferentes genes de resistência e podem mostrar diferentes perfis de suscetibilidade. Em hospitais japoneses o clone O25:H4-ST131 foi um dos dois clones dominantes entre isolados de *E. coli* produtores de ESBL, os quais produziam CTX-M-14, CTX-M-2 ou CTX-M-35 em vez da habitual CTX-M-15. O outro clone dominante foi o O86:H18-ST38 produtor de enzimas CTX-M-14 ou CTX-M-9 (Woodford *et al.*, 2011).

As linhagens de *E. coli* do grupo filogenético D têm também sido associadas a multirresistência e incluem clones como ST69, ST405 e O15:K52:H1 (Woodford *et al.*, 2011). O ST405 está cada vez mais a ser descrito globalmente como estando associado à produção de CTX-M-15. Tanto o ST131 como o ST405 são altamente virulentos. Além das linhagens dos filogrupos B2 e D alguns clones de *E. coli* pertencentes aos grupos filogenéticos A e B1 estão cada vez mais a ser relacionados com resistência a antibióticos e começam também a ser descritos também em infeções mais graves, como bacteriémias, em vez de serem estirpes comensais, como eram tradicionalmente conhecidas (Woodford *et al.*, 2011).

Alguns clones de *E. coli* multirresistentes (por exemplo, ST131, ST69, ST23) têm sido isolados de fontes não humanas incluindo animais de estimação e de produção, águas de rios e alimentos, sendo indicativo de uma vasta distribuição e complexidade de vias de transmissão. Embora *E. coli* tenha emergido como espécie maioritariamente produtora de ESBLs do tipo CTX-M, é menos frequentemente associada à produção de carbapenemases do que a espécie *Klebsiella pneumoniae* (Woodford *et al.*, 2011).

Num estudo realizado em 1329 isolados de *E. coli*, provenientes de várias regiões da Alemanha, tanto de origem animal (populações de pecuária e animais de estimação) como origem humana, foi demonstrado que claramente existem algumas semelhanças entre propriedades de genes e bactérias nos isolados de diferentes populações. Os genes ESBL *bla*CTX-M-1 e *bla*CTX-M-15 em combinação com o grupo filogenético B2 ou *bla*CTX-M-15 em combinação com resistências à gentamicina, cloranfenicol e sulfametaxazol/trimetropim foram bastante comuns entre as populações. As percentagens de resistência aos antibióticos foram as seguintes: gentamicina com 34.1%, cloranfenicol com 46% e sulfametaxazol/trimetropim com 76.7% (Valentin *et al.*, 2014).

A disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL entre alimentos e/ou produtos de origem animal aumentaram as preocupações sobre a sua possível transmissão ao Homem através da cadeia alimentar. TEM-52, SHV-12, e CTX-M-1 CTX-M-32 são as ESBLs mais comuns provenientes de animais para consumo humano (Rodrigues *et al.*, 2013). Neste âmbito, foi realizado um estudo que teve como objetivo caracterizar suínos e respetivo ambiente como reservatórios de clones e/ou plasmídeos contendo genes *bla*TEM-52 ou *bla*CTX-M (Rodrigues *et al.*, 2013). Foram usados métodos padrão para a análise de clones (PFGE, MLST) e de plasmídeos (S1-PFGE, tipagem de replicões, pMLST, RFLP). Concluiu-se que a disseminação de *bla*TEM-52 e de *bla*CTX-M-1/-32 foi maioritariamente associada a plasmídeos epidémicos (IncII/ST3 e IncN/ST1, respetivamente) e a clones previamente identificados em humanos e outros hospedeiros animais em diferentes países da União Europeia, destacando uma possível distribuição ao longo da cadeia alimentar (Rodrigues *et al.*, 2013).

## **2. Suinicultura em Portugal: produção intensiva e extensiva**

A atividade da suinicultura tem sido sempre caracterizada por duas realidades: por um lado, o elevado número de explorações com um reduzido número de animais, principalmente para consumo (e autoconsumo) nas zonas rurais (explorações familiares); por outro, uma atividade empresarial muito desenvolvida (explorações industriais) (Decreto-Lei n.º 339/99 de 25 de Agosto do Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 1999).

As explorações industriais produtoras de porcos para abate e de reprodutores podem ser classificadas em (Decreto-Lei n.º 339/99 de 25 de Agosto do Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 1999):

- Regime intensivo — explorações que numa área coberta ou ao ar livre não utilizam o pastoreio em qualquer das fases do processo produtivo;
- Regime semi-intensivo — explorações que numa área coberta ou ao ar livre utilizam o pastoreio numa ou mais fases do seu processo produtivo;
- Regime extensivo — explorações que utilizam o pastoreio em todas as fases do seu processo produtivo.

É importante salientar que a produção de carne de suíno em Portugal duplicou entre os períodos 1980-1984 e 2002-2006, aumentando o seu peso relativo no total de carnes para consumo humano, de 38,3% para 44,0%, devendo-se isto sobretudo ao seu baixo preço e ao fato da produção de carne de bovino ter sido muito afetada pela crise da BSE (Encefalopatia Espongiforme Bovina) na União Europeia (INE, 2007).

A concentração da produção de suínos aumentou expressivamente, com explorações a deterem 86% do efetivo em 2005 (INE, 2007). O número de explorações com porcas reprodutoras seguiu a mesma tendência de evolução. Com a diminuição do número de explorações e o aumento do efetivo verificou-se, entre 1987 e 2005, um grande acréscimo da dimensão média do efetivo suíno. Este aumento de dimensão média e a concentração da produção em grandes explorações permitiram melhorar de forma significativa a produtividade de suínos. Segundo os registos de 2005, a região do Ribatejo é a que

compreende o maior número de explorações de suínos, seguindo-se a região da Beira Litoral e o Alentejo (INE, 2007).

Mais recentemente (2012) observou-se um decréscimo do número de suínos no mercado nacional devido à continuação do seu envio para abate em Espanha, o que provocou uma oferta inferior à procura, com o conseqüente impacto nos preços que aumentaram em 2012 (INE, 2013). Houve também uma redução do número de porcas reprodutoras nacionais, que contribuiu também para uma menor oferta de animais para abate no mesmo ano. O aumento do preço dos alimentos para animais não permitiu que o rendimento obtido pelos suinicultores tivesse refletido integralmente o aumento significativo registado no preço dos suínos em 2012. Apesar disto, em termos da estrutura de consumo das carnes, a carne de suíno continua a ser mais consumida em Portugal (42,9 kg/habitante em 2012) (INE, 2013).

Posto isto, as suiniculturas Portuguesas são um nicho de potencial interesse para estudar a hipótese de haver transmissão ao Homem pela cadeia alimentar de certos clones de bactérias comensais de animais que adquiriram mecanismos de resistência a antibióticos clinicamente relevantes, visto que são vários os estudos já feitos que apontam nesse sentido.

## II. OBJETIVOS

Em Portugal, a resistência aos agentes antimicrobianos é um assunto importante, atual e de elevada preocupação. Contudo, quer considerando a medicina humana, quer considerando a medicina veterinária, a situação global da resistência aos antibióticos em Portugal é ainda pouco conhecida. Como tal, estudar uma das bactérias mais prevalentes na flora intestinal dos animais e humanos, *E. coli*, pode ser usado como indicador da pressão seletiva causada pelo uso de antibióticos na produção de animais para consumo humano e a partir daí fazer uma correlação para a elevada possibilidade de através da cadeia alimentar haver uma transmissão de resistência aos antibióticos para o Homem.

Neste contexto, o trabalho que aqui se apresenta sobre a caracterização da estrutura populacional de isolados de *E. coli* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva em Portugal, tem um potencial interesse do ponto de vista da Saúde Pública.

Assim, são objetivos deste trabalho caracterizar a estrutura populacional de isolados de *E.coli* provenientes de suiniculturas Portuguesas, avaliar a sua resistência a antibióticos frequentemente usados clinicamente e relacionar essa resistência com o potencial de virulência apresentado pelos grupos filogenéticos encontrados entre a população analisada, pois ainda são escassos os estudos neste nicho. Os resultados obtidos neste estudo poderão contribuir para a definição e/ou melhoria de estratégias de prevenção da transmissão da resistência aos antibióticos ao Homem, quer pela cadeia alimentar, quer através do ambiente, diminuindo desta forma os riscos para a Saúde Pública.

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **1. Isolados bacterianos**

Neste trabalho foram analisados 155 isolados bacterianos, provenientes de amostras de animais e do ambiente (águas, ar, rações, entre outras) de uma suinicultura Portuguesa de produção intensiva (correspondendo a 115 dos isolados totais), denominada de suinicultura E, e outra de produção extensiva (correspondendo a 40 dos isolados totais), denominada de suinicultura D.

#### **2. Identificação de isolados de *E. coli* e determinação de grupos filogenéticos**

##### **2.1 Extração do DNA bacteriano**

Para a identificação e determinação de filogrupos de *E. coli* por técnicas de biologia molecular foi necessário proceder à extração do DNA bacteriano, tendo sido iniciado este processo com a descongelação de isolados bacterianos que posteriormente foram semeados em meio de CLED (37°C, 18 horas). Seguidamente, foram recolhidas 4 colónias de bactérias do meio de cultura e colocadas em 300 µL de água ultra-pura estéril. Depois de devidamente homogeneizada, esta suspensão bacteriana foi submetida a um processo de fervura em banho de água durante 15 minutos, para provocar a lise bacteriana. Passados os 15 minutos, efetuou-se uma centrifugação a 14000 r.p.m., durante 5 minutos, com a finalidade de separar o DNA contido no sobrenadante. Este foi congelado a -20°C para ser utilizado em estudos posteriores.

##### **2.2 Amplificação de ácidos nucleicos por PCR**

Identificou-se a presença de *E. coli* por PCR (Reação de Amplificação em Cadeia) e para os isolados identificados como *E. coli* procedeu-se a um PCR *multiplex* para determinação do seu grupo filogenético. As condições reacionais e de amplificação, bem como a sequência nucleotídica dos *primers* utilizados, encontram-se descritos na Tabela 1. As reações de PCR foram efetuadas nos termocicladores MyCycler™ (Biorad, Hércules, EUA) e iCycler™ (Hércules, EUA).

**Tabela 1** - *Primers* e condições de PCR usados no estudo.

Objetivo	Primer	Sequência (5' → 3')	Tamanho (bp)	Concentração dos reagentes <sup>a</sup>	Condições amplificação	Referência
Identificação de <i>E. coli</i>	ECO-1	GACCTCGGTTTAGTTCACAGA	585	Tampão da enzima 1X (Green GoTaq <sup>®</sup> Flexi Buffer, Promega, USA); 1,5 mM de MgCl <sub>2</sub> ; 0,2 mM de dNTP's; 0,2 μM de cada <i>primer</i> ; 1 Unidade de DNA polimerase (GoTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase, Promega, USA).	1 ciclo a 94°C de 10 min; 35 ciclos a 94°C de 35 seg, a 59°C de 35 seg e a 72°C de 35 seg; 1 ciclo a 72°C de 10 min.	(Wang <i>et al.</i> , 1996)
	ECO-2	CACACGCTGACGCTGACCA				
Determinação do filogruppo de <i>E. coli</i>	ChuA.1	GACGAACCA ACGGTCAGGAT	279	Tampão da enzima 1X (Green GoTaq <sup>®</sup> Flexi Buffer, Promega, USA); 1,5 mM de MgCl <sub>2</sub> ; 0,2 mM de dNTP's; 0,2 μM de cada <i>primer</i> ; 1 Unidade de DNA polimerase (GoTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase, Promega, USA).	1 ciclo a 94°C de 10 min; 35 ciclos a 94°C de 45 seg, a 57°C de 45 seg e a 72°C de 1 min; 1 ciclo a 72°C de 10 min.	(Clermont <i>et al.</i> , 2000)
	ChuA.2	TGCCGCCAGTACC AAAGACA	211			
	YjaA.1	TGAAGTGTCAGGAGACGCT G				
	YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC				
	TspE4C2.1	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152			
	TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG				

<sup>a</sup>As reações foram efetuadas num volume final de 25μL, tendo sido adicionado 2μL de DNA a cada reação. Em todas as reações de PCR foram usados controlos positivos e negativos.

### 2.3 Electroforese

Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose contendo um composto com afinidade para o DNA e que emite fluorescência (Midori Green, 0,1 µL/mL; GRISP®, Porto, Portugal) e utilizando as seguintes condições: agarose a 1,5%, 90V, 30 minutos, tampão TAE 1X (identificação de *E. coli*) ou agarose a 2,5%, 100V, 50 minutos, tampão TAE 1X (determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli*). Os produtos amplificados foram visualizados sob luz UV em transiluminador conectado ao sistema de aquisição de imagem *Molecular Imager ChemiDoc<sup>XRS</sup>* (Milão, Itália), que conjuntamente com o programa *Quantity One version 4.6.1 Build 055* (Bio-Rad, Hércules, EUA) permitiu obter e guardar as imagens dos resultados das electroforeses. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com o marcador de peso molecular Hyperladder IV (Bioline, Uppsala, UK).

### 3. Avaliação da suscetibilidade aos antibióticos

Para os isolados identificados como *E. coli* foram realizados antibiogramas através do método de difusão por discos (método de Kirby – Bauer). Assim, a densidade do inóculo bacteriano foi ajustada a uma turvação equivalente a 0,5 unidades MacFarland procedendo-se depois à sua sementeira em meio de cultura Mueller – Hinton posterior colocação de discos contendo os diferentes antibióticos diferentes testados, seguindo as normas do CLSI (CLSI, 2010): gentamicina (10µg), tobramicina (10µg), amicacina (30µg), espectinomicina (10µg), ácido nalidíxico (30µg), tetraciclina (30µg), cloranfenicol (30µg), neomicina (30µg), netilmicina (30µg), apramicina (15µg), tigeciclina (15µg), canamicina (30µg), amoxicilina e ácido clavulânico (20µg), cefotaxima (5µg), ceftazidima (10µg), cefepime (30µg), aztreonamo (30µg), cefoxitina (30µg), imipenemo (10 µg), estreptomina (10 µg), trimetoprim (5µg), ciprofloxacina (5µg), sulfonamidas (300µg). Após uma incubação de 16-18 horas a 37°C, os halos de inibição de crescimento bacteriano à volta dos discos foram avaliados e interpretados segundo os critérios do CLSI (CLSI, 2010), exceto para o caso da tigeciclina e apramicina, em que foram usados os critérios de interpretação do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2013). Na análise dos resultados consideraram-se como não suscetíveis isolados com comportamento de resistência (R) e de resistência intermédia (I).

#### IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 1. Ocorrência e estrutura populacional de *E. coli*

Dos 155 isolados obtidos das duas suiniculturas estudadas foram identificados como sendo *E. coli* 103 isolados (66%), correspondendo 73% (84/115) dos isolados da suinicultura E (produção intensiva) e 48% (19/40) dos isolados da suinicultura D (produção extensiva).

Relativamente à estrutura populacional dos isolados identificados como *E. coli*, os mesmos foram classificados como pertencendo ao grupo filogenético A (69%, 71/103), B1 (9%, 9/103), B2 (7%, 7/103) ou D (15%, 15/103), tendo um isolado apresentado um resultado inconclusivo. Na Tabela 2 é apresentada a distribuição dos isolados analisados em cada suinicultura pelos diferentes grupos filogenéticos.

**Tabela 2** - Número de isolados e respetiva distribuição por grupos filogenéticos para cada suinicultura analisada

Grupo Filogenético	% (n.º isolados)		
	Suinicultura E	Suinicultura D	Total
A	74 (62)	47 (9)	69 (71)
B1	6 (5)	21 (4)	9 (9)
B2	8 (7)	0	7 (7)
D	11 (9)	32 (6)	15 (15)

**Os isolados de *E. coli* foram identificados como pertencendo maioritariamente ao grupo filogenético A (69%),** sendo este tradicionalmente considerado como comensal. Este resultado está em conformidade com o esperado pois é um filogruppo que está normalmente presente em maiores quantidades na flora normal dos animais e humanos. O grupo filogenético D (15%) apesar de apresentar uma baixa ocorrência, foi o segundo mais frequente, não correspondendo ao esperado, uma vez que corresponde a um filogruppo tradicionalmente considerado como incluindo estirpes comensais (Woodford *et*

al., 2011). Por outro lado, o grupo filogenético B2 (7%) apenas foi encontrado na suinicultura E, fato este de elevada relevância, pois há o risco de transmissão ao homem destas estirpes B2 que costumam ser mais virulentas, podendo estar envolvidas em infecções no Homem (caso haja a transmissão animal homem), sendo mais preocupante a transmissão de uma *E. coli* do filogrupo B2 do que uma *E. coli* do filogrupo A). A possibilidade de transmissão da estirpe numa suinicultura de produção intensiva, em que os animais estão confinados a locais com áreas restritas, aumenta de forma exponencial.

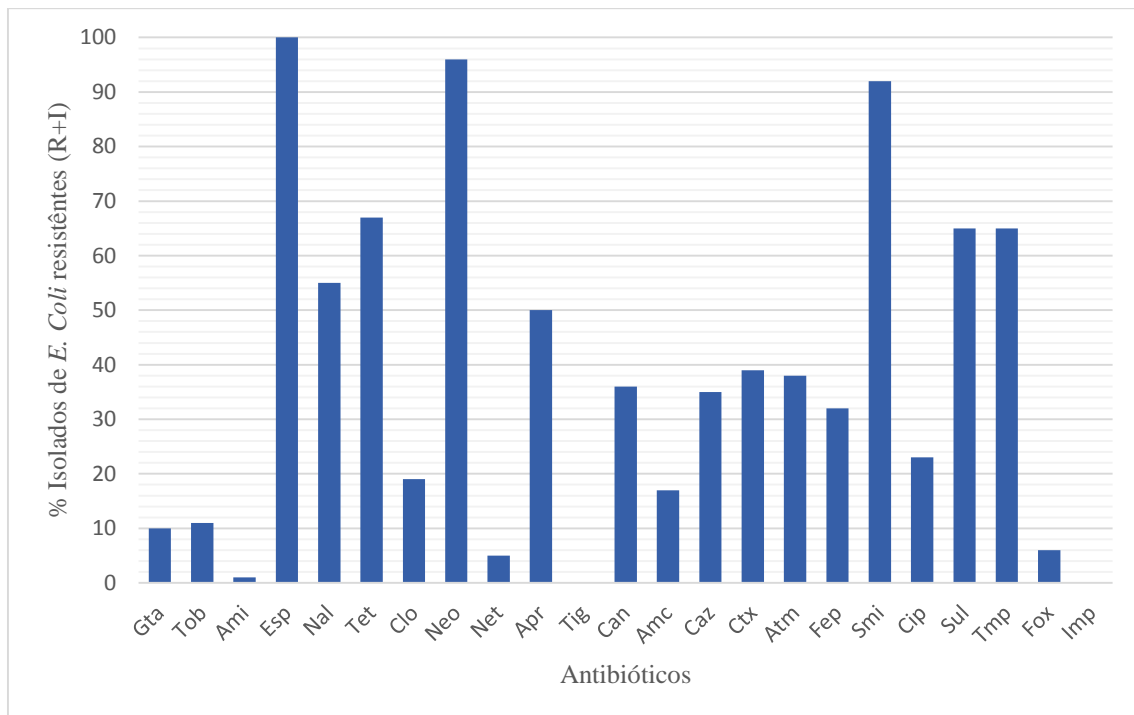
Para além disso, o tratamento profilático nas produções intensivas é feito com uma regularidade muito maior, pois quando um animal adoece todos os outros que estão na mesma área são tratados profilaticamente, aumentando ainda mais a possibilidade de adquirirem e desenvolverem resistências em estirpes que por si só já têm associadas características virulentas. O filogrupo B1 (9%), caracterizado como sendo comensal, apresenta uma baixa ocorrência nas duas suiniculturas, sendo no entanto um pouco maior na suinicultura de produção extensiva.

Num estudo realizado na Alemanha em 1329 isolados de *E. coli* de origem animal (n=585 em isolados de galinhas, suínos e gado, n=110 em isolados de cães e cavalos) e humanos saudáveis (n=635), verificou-se que 40,2% (n=534) dos isolados pertenciam ao filogrupo A, 22,6% (n=301), sendo o filogrupo predominante (Valentin *et al.*, 2014). Isto comprova a tendência percentual dos filogrupos caracterizados como comensais ser mais elevada do que a dos filogrupos associados a características virulentas. Assim sendo, os resultados obtidos neste estudo correspondem aos previstos pois o filogrupo mais frequente é o A.

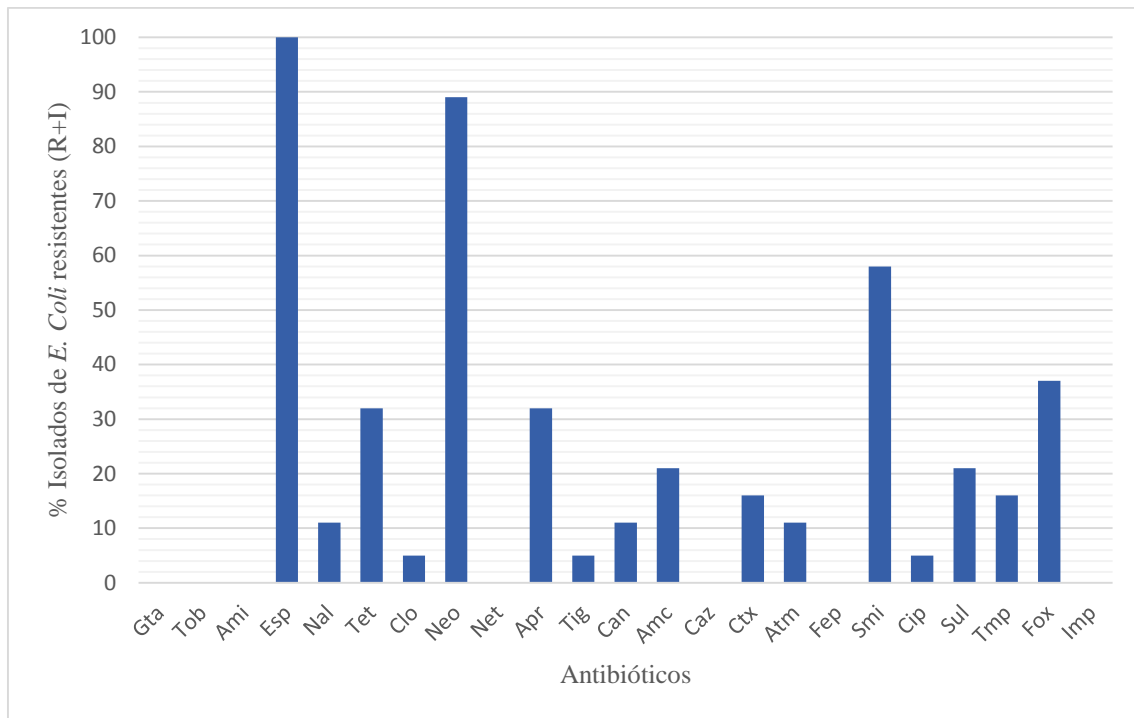
Posteriormente aos estudos realizados, que permitiram fazer uma análise preliminar da estrutura populacional dos isolados de *E. coli* incluídos neste trabalho, deveriam ter sido aplicadas metodologias mais específicas de tipagem, como MLST. No entanto, a tipagem bacteriana por MLST envolve a amplificação e sequenciação de sete genes, pelo que, por razões de limitação de tempo e financiamento, estes estudos não foram feitos durante o período em que decorreu este trabalho de investigação. Em vez da técnica MLST, poder-se-ia optar por fazer a tipagem por PFGE (electroforese em gel de campo pulsado), mas as limitações seriam as mesmas, acrescentando ainda a necessidade de equipamento específico.

## 2. Resistência a antibióticos entre os isolados de *E. coli* analisados

Os isolados provenientes das duas suiniculturas estudadas (E e D) apresentaram a maior taxa de resistência ao antibiótico espectinomicina seguido da neomicina e estreptomicina. Nas Figuras 5 e 6 é possível observar esquematicamente a distribuição das taxas de resistências frente aos diversos antibióticos avaliados em isolados provenientes de ambas as suiniculturas.



**Figura 5-** Percentagem de resistência aos antibióticos em isolados de *E. coli*, provenientes da suinicultura E. Gta, Gentamicina; Clo, Cloranfenicol; Caz, Ceftazidina; Cip, Ciprofloxacina; Tob, Tobramicina; Neo, Neomicina; Ctx, Cefotaxima; Sul, Sulfonamidas; Ami, Amicacina; Net, Netilmicina; Atm, Aztreonamo; Tmp, Trimetoprim; Esp, Espectinomicina; Apr, Apramicina; Fep, Cefepime; Fox, Cefoxitima; Nal, Ácido Nalidíxico; Tig, Tigeciclina; Smi, Estreptomicina; Ipm, Imipenemo; Tet, Tetraciclina; Can, Canamicina; Amc, Amoxicilina+Ácido Clavulânico.



**Figura 6-** Percentagem de resistência aos antibióticos em isolados de *E. coli*, provenientes da suinicultura D. Gta, Gentamicina; Clo, Cloranfenicol; Caz, Ceftazidina; Cip, Ciprofloxacina; Tob, Tobramicina; Neo, Neomicina; Ctx, Cefotaxima; Sul, Sulfonamidas; Ami, Amicacina; Net, Netilmicina; Atm, Aztreonamo; Tmp, Trimetoprim; Esp, Espectinomicina; Apr, Apramicina; Fep, Cefepime; Fox, Cefoxitima; Nal, Ácido Nalidíxico; Tig, Tigeciclina; Smi, Estreptomicina; Ipm, Imipenemo; Tet, Tetraciclina; Can, Canamicina; Amc, Amoxicilina+Ácido Clavulânico.

Observando as Figuras 5 e 6 verificou-se que em ambas as suiniculturas estudadas, 100% dos isolados apresentam resistência à espectinomicina. Comparando os valores obtidos com os do relatório nacional de monitorização do consumo de antimicrobianos em Portugal (2010) disponibilizado pela DGV, é possível constatar que, apesar da espectinomicina ser um antibiótico usado em suínos, é um dos menos usados, não correspondendo os resultados obtidos ao esperado. As bactérias foram também frequentemente resistentes à neomicina (95%) e à estreptomicina (85%), tanto na suinicultura E (96%, n=81/84 e 92%, n=77/84, respetivamente) como na suinicultura D (89%, n=17/19 e 58%, n=11/19, respetivamente).

Por outro lado, a resistência dos isolados de *E. coli* a outros aminoglicosídeos foi menos frequentemente observada, na suinicultura E: [gentamicina (10%, n=8/84), tobramicina (11%, n=9/84), amicacina (1%, n=1/84) e netilmicina (5%, n=4/84)], já para a canamicina e a apramicina apresentam respetivamente os seguintes valores: 36% (n=30/84) e 50% (n=42/84) para a suinicultura E, 11% (n=2/19) e 32% (n=6/19) para a suinicultura D. A

percentagem de isolados resistentes à tigeciclina foi baixa (5%) e limitada à suinicultura D, e para o imipenemo não foi detetado nenhum isolado resistente, o que poderá dever-se ao fato de serem antibióticos utilizados em ambiente hospitalar.

A taxa de isolados de *E. coli* resistentes às sulfonamidas e trimetoprim foi igual na suinicultura E (65%, n=55/84). Na suinicultura D os valores foram muito próximos (21%, n=4/19 e 16%, n=3/19, respetivamente).

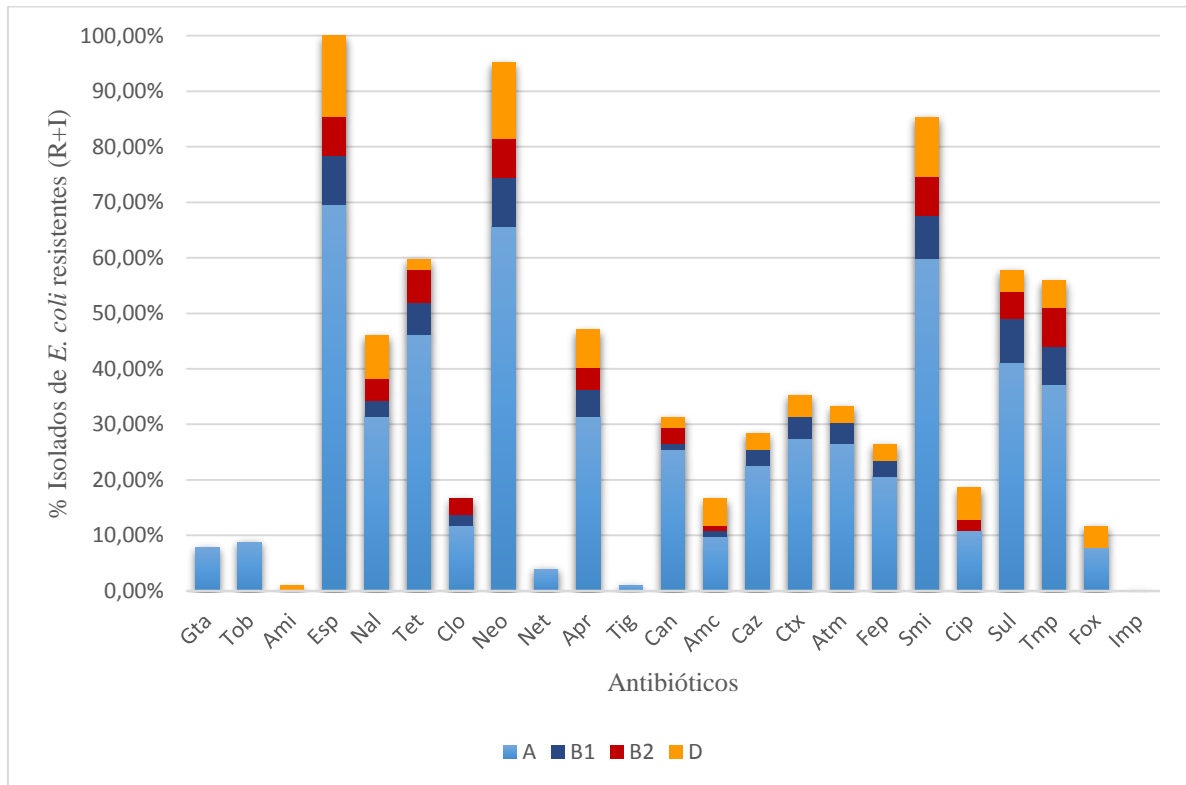
Os  $\beta$ -lactâmicos foram uma classe de antibióticos para os quais de uma forma geral os isolados de *E. coli* estudados apresentaram resistências consideráveis, sendo sempre maiores na suinicultura de produção intensiva. Segundo a DGV a amoxicilina é um dos antibióticos mais usados nas suiniculturas Portuguesas, podendo isto explicar, ainda que não sejam muito significativas, as percentagens de *E. coli* resistentes a este antibiótico (17% na suinicultura E e 21% na suinicultura D) a este antibiótico. Para explicar as percentagens de isolados resistentes antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de largo espectro (aztreonamo com 38% para a suinicultura E e 11% para a D, cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração nomeadamente: ceftazidima 35% e 0%, cefotaxima 39% e 16%, cefpime 32% e 0% e cefoxitina 6% e 37% para as suiniculturas E e D respetivamente) levanta-se a possibilidade de haver produção de ESBLs. Assim sendo, através deste estudo pode-se considerar que os isolados de *E. coli* estudados que apresentaram resistências aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de largo espectro poderaão ser potenciais portadores de genes *bla*<sub>TEM-52</sub> ou *bla*<sub>CTX-M-1/-32</sub> mas para comprovar isto, teriam de ser feitos testes de duplo sinergismo. Observou-se a mesma tendência para o ácido nalidíxico, ciprofloxacina tetraciclina e cloranfenicol.

Estes resultados são concordantes com resultados obtidos em estudos Europeus feitos num grupo de estirpes de *E. coli* de origem suína, bovina e aviária, os quais indicaram a persistência de um “padrão comum” de multirresistências, nomeadamente às seguintes classes de antibióticos: aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactâmicos, sulfonamidas e tetraciclinas (Szmolka e Nagy, 2013).

De uma forma geral, foram registadas maiores percentagens de resistência aos antibióticos na suinicultura E, de produção intensiva, do que na suinicultura D, de produção extensiva. Isto pode justificar-se pelo fato de nas suiniculturas intensivas se usar

inevitavelmente uma maior quantidade de antibióticos e dos animais estarem confinados a locais mais pequenos, o que contribui para o aumento da possibilidade de haver uma maior seleção de bactérias resistentes aos antibióticos e de estas se dispersarem mais rápida e facilmente.

Para além disto, é importante analisar as percentagens de isolados de *E. coli* resistentes aos antibióticos, provenientes das duas suiniculturas, e a respetiva associação com grupos filogenéticos particulares, de forma a conseguir avaliar o grau de virulência dos isolados resistentes analisados (Figura 7).



**Figura 7-** Percentagem de resistência aos antibióticos em isolados de *E. coli*, provenientes das duas suiniculturas e respetiva associação com grupos filogenéticos. Gta, Gentamicina; Clo, Cloranfenicol; Caz, Ceftazidina; Cip, Ciprofloxacina; Tob, Tobramicina; Neo, Neomicina; Ctx, Cefotaxima; Sul, Sulfonamidas; Ami, Amicacina; Net, Netilmicina; Atm, Aztreonamo; Tmp, Trimetoprim; Esp, Espectinomomicina; Apr, Apramicina; Fep, Cefepime; Fox, Cefoxitima; Nal, Ácido Nalidíxico; Tig, Tigeciclina; Smi, Estreptomicina; Ipm, Imipenemo; Tet, Tetraciclina; Can, Canamicina; Amc, Amoxicilina+Ácido Clavulânico.

Observando a Figura 7 é possível constatar que o grupo filogenético A é predominante no total de isolados considerados resistentes. Embora em menos quantidade, o filogruppo D aparece associado a isolados de *E. coli* resistentes a quase todos os antibióticos analisados, à exceção da gentamicina, tobramicina, cloranfenicol, tigeciclina e imipenemo. Tendo em conta estes resultados torna-se evidente que existe um número considerável de isolados de *E. coli* resistentes do filogruppo D sendo este associado a características de virulência.

Embora neste estudo a quantidade encontrada de isolados do filogruppo D resistentes a antibióticos seja baixa, isto pode-se tornar preocupante pois trata-se de animais que estão confinados a áreas restritas, potenciando assim uma possível disseminação destas estirpes virulentas e resistentes.

Segundo Woodford *et al.* alguns clones de *E. coli* multirresistentes, como o ST131 pertencente a uma linhagem de *E. coli* uropatogénica virulenta do grupo filogenético B2, têm sido isolados de fontes não humanas incluindo animais de produção (Woodford *et al.*, 2011). Posto isto, é possível verificar no estudo realizado a presença, apesar de em baixas percentagens, do grupo filogenético B2 associado a isolados de *E. coli* resistentes a quase todos os antibióticos analisados, podendo levantar a suspeita da presença, nesses mesmos isolados, do clone multirresistente e virulento ST131 com uma potencial produção de CTX-M-15. Contudo, estudos futuros teriam de ser feitos para confirmar que a presença do clone e a enzima ctx-m15.

## V. CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho pretendeu caracterizar a estrutura populacional de isolados de *Escherichia coli* provenientes de suiniculturas Portuguesas, tendo sido observado transversalmente a todo o estudo elevadas percentagens de resistência a antibióticos.

Os isolados de *E. coli* foram identificados como pertencendo maioritariamente ao grupo filogenético A (69%), seguido do filogruppo D (15%), este último associado a características de virulência. Embora neste estudo a quantidade de isolados resistentes e pertencentes ao filogruppo D seja baixa, isto pode-se tornar preocupante, pois tratam-se de animais que estão confinados a áreas restritas (produção intensiva) e que são de consumo humano, potenciando assim uma possível disseminação de bactérias com características de virulência e resistência entre os animais e potencial transmissão ao Homem.

Foi possível concluir ainda que as percentagens de *E. coli* resistente a antibióticos, tanto na suinicultura de produção intensiva como na de produção extensiva de suínos foram consideráveis.

As suiniculturas Portuguesas são potenciais reservatórios de *E. coli* resistentes a múltiplos antibióticos de uso clínico Humano e possivelmente de genes de resistência a antibióticos com elevada capacidade de dispersão. Assim sendo, a melhor estratégia para o combate às resistências a antibióticos passa por adotar a política de usar antibióticos estritamente quando é necessário evitando a automedicação, restringir a sua utilização na pecuária e exigir um cumprimento rigoroso em situações profiláticas, impedir a sua eliminação para o ambiente em geral e controlar a sua dispensa para animais de estimação.

São crescentes as iniciativas tanto da União Europeia, como a nível mundial, para tentar reduzir o excessivo consumo de antibióticos na medicina humana e na medicina veterinária. Esta é uma área onde ainda existem grandes lacunas sendo necessário realizar mais estudos para que seja possível implementar medidas eficazes de controlo da disseminação de bactérias com características de virulência e resistência a antibióticos, de forma a assegurar a Saúde Pública

## VI. BIBLIOGRAFIA

Clermont, O., Bonacorsi, S. e Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Journals.ASM.org*, 66, pp. 4555-4558.

CLSI. (2010). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth Informational Supplement*. CLSI document M100-S20. CLSI, Wayne, PA.

Cunha, M. P., *et al.* (2014). Virulence Profiles, Phylogenetic Background, and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Turkeys with Airsacculitis. *ScientificWorldJournal*, 2014, pp. 289024.

Decreto-Lei n.º 339/99 de 25 de Agosto do Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. *Diário da República: I Série A, N.º 198 (1999)*. [em linha]. Disponível em <<https://dre.pt/application/dir/pdf1s/1999/08/198A00/57265730.pdf>>. [Consultado em 8.09.2014].

DGS. (2013). Portugal - Controlo da Infecção e Resistência aos Antimicrobianos em números - 2013. [em linha]. Disponível em <<http://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/portugal-controlo-da-infecao-e-resistencia-aos-antimicrobianos-em-numeros-2013.aspx>>. [Consultado em 16.09.2014].

DGV. (2010). Relatório nacional de monitorização do consumo de antimicrobianos Portugal. [em linha]. Disponível em <<http://www.apifarma.pt/Documentos%20ENews/DGV%20-%20Relat%C3%B3rio%20Anual%20Consumo%20Antimicrobianos.pdf>>. [Consultado em 10.09.2014].

Doumith, M., *et al.* (2012). Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J Clin Microbiol*, 50, pp. 3108-10.

Dubreuil, J. D. (2013). Antibacterial and antidiarrheal activities of plant products against enterotoxinogenic *Escherichia coli*. *Toxins (Basel)*, 5, pp. 2009-41.

EC. (2008). Relatório da comissão ao conselho e ao parlamento europeu sobre a utilização de coccidiostáticos e histomonostáticos como aditivos destinados à alimentação animal. [em linha]. Disponível em <<http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/docs/Report-Cocccs-233-2008-PT.pdf>>. [Consultado em 15.09.2014].

ECDC. (2012). Antimicrobial resistance interactive database. [em linha]. Disponível em <[http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/database/Pages/database.aspx](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx)>. [Consultado em 16.09.2014].

ECDC. (2011). Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2011. [em linha]. Disponível em <<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/antimicrobial-consumption-europe-surveillance-2011.pdf>>. [Consultado em 16.09.2014].

Ejrnaes, K. (2011). Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull*, 58, pp. B4187.

EUCAST. (2013). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. [em linha]. Disponível em <[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_3.1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf)>. [Consultado em 16.09.2014].

Ferreira, W. e Sousa, J. (2000). *Microbiologia*. Porto, Edição Lidel, Vol. 2.

INE. (2013). Estatísticas Agrícolas - 2012. [em linha]. Disponível em <[http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOE\\_Spub\\_boui=153380933&PUBLICACOESmodo=2](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOE_Spub_boui=153380933&PUBLICACOESmodo=2)>. [Consultado em 20.09.2014].

INE. (2007). Portugal Agrícola 1980-2006. [em linha]. Disponível em <[http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOE\\_Spub\\_boui=7479564&PUBLICACOESmodo=2](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOE_Spub_boui=7479564&PUBLICACOESmodo=2)>. [Consultado em 18.09.2014].

Kemper, N. (2007). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *ecological indicators* , 8, pp.1-13.

Lukjancenko, O., Wassenaar, T. M. e Ussery, D. W. (2010). Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb Ecol*, 60, pp. 708-20.

Machado, E., *et al.* (2008). Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum {beta}-lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J Antimicrob Chemother*, 62, pp. 296-302.

Mims, C., *et al.* (2005). *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 3<sup>a</sup> Edição.

Okhuysen, P. C. e Dupont, H. L. (2010). Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. *J Infect Dis*, 202, pp. 503-5.

OMV. (2010). PEURMA - Quadro de boas práticas para uso de antimicrobianos em animais destinados a consumo humano na União Europeia. [em linha]. Disponível em <<http://www.omv.pt/omv-apifarma/peurna/>>. [Consultado em 16.09.2014].

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. *J Antimicrob Chemother*, 53, pp. 28-52.

Rodrigues, C., *et al.* (2013). IncI1/ST3 and IncN/ST1 plasmids drive the spread of blaTEM-52 and blaCTX-M-1/-32 in diverse *Escherichia coli* clones from different piggeries. *J Antimicrob Chemother*, 68, pp. 2245-8.

Sousa, J. (2006). *Manual de antibióticos antibacterianos*. Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa, 2<sup>a</sup> Edição.

Stenutz, R., Weintraub, A. e Widmalm, G. (2006). The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev*, 30, pp. 382-403.

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

Valentin, L., *et al.* (2014). Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: An approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *Int J Med Microbiol*, pp.

Vincent, C., *et al.* (2010). Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerg Infect Dis*, 16, pp. 88-95.

Wang, R. F., Cao, W. W. e Cerniglia, C. E. (1996). PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl Environ Microbiol*, 62, pp. 1242-7.

WHO. (2001). WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. [em linha]. Disponível em <[http://www.who.int/drugresistance/WHO\\_Global\\_Strategy\\_English.pdf](http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_English.pdf)>. [Consultado em 16.09.2014].

Woodford, N., Turton, J. F. e Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 35, pp. 736-55.

Woolverton, C., *et al.* (2008). *Microbiology*. Nova Iorque, Editora McGraw-Hill, 7<sup>a</sup> Edição.