

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

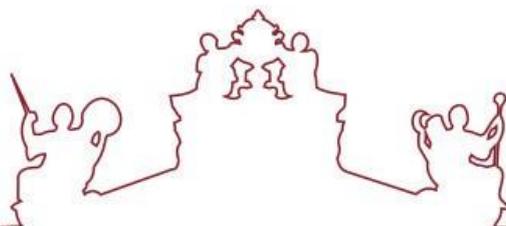
Dissertação

**Perfis de resistência a antibióticos em isolados de
Escherichia coli de frangos do campo e de avicultura
industrial**

Mariana Sofia Rebola Ferreira

Orientador(es) | Ana Filomena Romeira de Jesus Amaro
Elsa Leclerc Duarte
Maria de Lurdes Tavares Clemente

Évora 2022



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

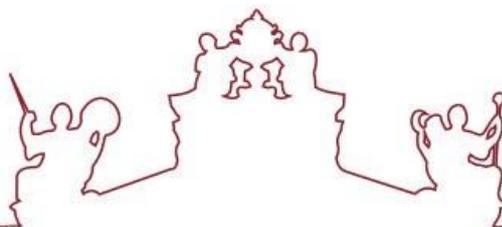
Dissertação

**Perfis de resistência a antibióticos em isolados de
Escherichia coli de frangos do campo e de avicultura
industrial**

Mariana Sofia Rebola Ferreira

Orientador(es) | Ana Filomena Romeira de Jesus Amaro
Elsa Leclerc Duarte
Maria de Lurdes Tavares Clemente

Évora 2022



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | M. J. Lança (Universidade de Évora)

Vogais | Ana Filomena Romeira de Jesus Amaro (INIAV - Instituto Nacional de Agrária e Veterinária) (Orientador)

Maria Manuela Oliveira (Universidade de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária) (Arguente)

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer às minhas orientadoras do INIAV, à doutora Ana Amaro e à doutora Lurdes Clemente, por serem um exemplo para mim, pela paciência para me transmitirem os conhecimentos técnicos e científicos fundamentais, e pela tolerância principalmente nos momentos mais complicados. Um agradecimento também à doutora Célia por todo o apoio e disponibilidade para me ajudar a ultrapassar os obstáculos que foram surgindo. À Cristina, à Alice, à doutora Patricia e a toda a equipa do laboratório por me terem recebido tão bem.

Gostaria de agradecer também à minha orientadora da Universidade de Évora, a professora Elsa Leclerc pela sua dedicação e por ser uma inspiração.

Um agradecimento especial a toda a minha família, principalmente aos meus pais por me darem esta oportunidade, por todo o apoio que me prestaram durante toda a minha vida, e no meu percurso académico.

A todos os meus colegas e amigos que estiveram presentes durante estes seis anos e que me marcaram de alguma forma, em especial à Maria, à Beatriz, à Ana Beatriz e à Matilde, pelo companheirismo e amizade nesta fase da minha vida; sem vocês tudo seria mais difícil.

Ao Francisco pela paciência, pela força, pela generosidade e por estar sempre ao meu lado.

A este trabalho estão associadas as seguintes comunicações em congressos científicos:

M. Ferreira, C. Leão, T. Albuquerque, L. Clemente, A. Amaro. “Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from broilers raised under intensive and semi-intensive production systems”. 3rd International Conference of the College of Veterinary Microbiology (ICECVM). 16-17 de Outubro, 2021. (E-poster)

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi realizado no INIAV, no Laboratório de Bacteriologia e Micologia no âmbito do Projeto PTDC/CVT-CVT/28469/2017 – CIAinVET financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

Resumo

A administração de antibióticos em animais de produção, constitui um fator de risco para a promoção de bactérias resistentes.

As produções intensiva e semi-intensiva de frangos implicam intervenções veterinárias distintas, incluindo o uso de antimicrobianos. Este estudo teve como objetivo comparar os perfis fenotípicos e genotípicos de susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *Escherichia coli* de ambos os sistemas produtivos.

Os isolados de *E. coli* de amostras cecais de frangos foram testados quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos através da técnica de microdiluição em caldo. A caracterização molecular dos mecanismos de resistência adquiridos a β -lactâmicos e à colistina, bem como a detecção de integrons de classe I, II e III foi realizada por mPCR.

Este trabalho destaca as diferenças na susceptibilidade aos antibióticos de isolados de ambos os tipos de produção. Há ainda um longo caminho a percorrer de modo a diminuir o consumo de antimicrobianos e os níveis de resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: resistência, antibióticos, frango, *Escherichia coli*, genómica

Abstract

Antibiotic resistance profiles in *Escherichia coli* isolates from free range broilers and industrial broilers

The use of antibiotics in animal production is a risk factor for promoting resistant bacteria. The intensive and semi-intensive poultry production systems imply different veterinary interventions, including antimicrobials usage. This study aimed to compare the antimicrobial susceptibility phenotypic profiles of *Escherichia coli* isolated from both systems, to characterize the resistance mechanisms to β -lactams and polymyxins, and to identify mobile genetic elements such as integrons.

E. coli strains isolated from broiler caecal samples were tested for antimicrobial susceptibility through the broth microdilution technique. Molecular characterization of the acquired resistance mechanisms to β -lactams and colistin was performed by PCR; detection of class I, II, and III integrons was also carried out.

This work highlights the differences in antibiotic susceptibility of the isolates from both types of production. Nevertheless, there is still a long way to decrease the consumption of antimicrobials and antimicrobial resistance levels.

Keywords: resistance, antibiotics, broilers, *Escherichia coli*, genomics

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
Índice de figuras	x
Índice de tabelas	xi
Lista de abreviaturas e siglas	xii
Capítulo I- Introdução	1
1. Situação atual da resistência aos antibióticos	1
2. Principais grupos e mecanismos de ação dos antibióticos de importância crítica.....	3
2.1. β -lactâmicos	4
2.2. Polimixinas.....	4
2.3 Macrólidos	6
2.4 Quinolonas e Fluoroquinolonas	6
3. Resistência intrínseca e adquirida	7
3.1. Mecanismos de resistência antimicrobiana.....	8
4. Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos.....	11
5. Mecanismos de resistência às Polimixinas	14
6. Elementos genéticos móveis e transmissão horizontal de genes.....	16
7. Utilização de antibióticos em medicina veterinária e produção animal.....	20
8. Maneio e utilização de antibióticos na produção avícola de frangos (<i>Gallus gallus</i>).....	23
9. Controlo e prevenção da resistência antimicrobiana na Europa e em Portugal	25
Capítulo II- Objetivos	29
Capítulo III – Material e métodos	30
1. Amostras biológicas e estirpes bacterianas	30
2. Determinação da susceptibilidade antimicrobiana pela técnica da microdiluição..	32
3. Extração de ADN e quantificação	35
4. Identificação de determinantes de resistência por reação de polimerase em cadeia (PCR).....	36
4.1- Detecção dos genes <i>bla</i>	36
4.2 Detecção dos genes <i>mcr</i>	37
4.3 Detecção dos integrões da classe I, classe II e classe III.....	37
4.4 Eletroforese dos produtos amplificados	38
5. Identificação de variantes dos genes <i>bla</i> por sequenciação de Sanger	38
6. Sequenciação do Genoma Completo (WGS) de três isolados.....	39

7. Análise estatística	40
Capítulo IV - Resultados e discussão	41
1. Caracterização fenotípica da resistência antimicrobiana	41
2. Caracterização genotípica dos isolados	53
3. Elementos genéticos móveis	60
4. Caracterização genómica dos isolados submetidos a Sequenciação do Genoma Completo (WGS)	61
Bibliografia	69
Anexo	91

Índice de figuras

Figura 1- Mecanismos de resistência antimicrobiana.....	8
Figura 2- Representação esquemática da classificação das β -lactamases	14
Figura 3- Transferência horizontal de genes entre bactérias por conjugação.....	17
Figura 4- Processo de aquisição de cassetes genéticas pelos integrões.....	18
Figura 5- Importância de uma abordagem Uma Só Saúde na temática da RAM	28
Figura 6- Número de isolados por tipo de produção	30
Figura 7-Número de isolados de <i>E.coli</i> comensal e CTXr (presumíveis produtoras de enzimas ESBL e/ou AmpC) de frango do campo estudados nos anos 2014, 2018 e 2020	32
Figura 8- Número de isolados de <i>E.coli</i> comensal e CTXr (presumíveis produtoras de enzimas ESBL e/ou AmpC) de frango industrial estudados nos anos 2014, 2018 e 2020	32
Figura 9- Distribuição e concentrações dos antibióticos na microplaca EUVSEC.....	33
Figura 10- Distribuição e concentrações dos antibióticos na microplaca EUVSEC2....	34
Figura 11-Frequência de estirpes de <i>E. coli</i> comensal com suscetibilidade reduzida aos antibióticos	42
Figura 12- Frequência de estirpes CTXr (presumíveis produtoras de enzimas ESBL e/ou AmpC) com suscetibilidade reduzida aos antibióticos.....	42
Figura 13-Proporção dos fenótipos presumíveis produtores de β -lactamases de espectro alargado (ESBL) e/ou β -lactamases AmpC em estirpes de <i>E.coli</i> CTXr (presumíveis produtoras de enzimas ESBL e/ou AmpC) isoladas de frangos de produção semi-intensiva e intensiva.....	48
Figura 14- Distribuição dos genes <i>bla</i> nas estirpes de <i>E. coli</i> com fenótipo ESBL e/ou AmpC isoladas de frangos de produção intensiva e semi-intensiva.....	53
Figura 15- Distribuição dos genes que codificam β -lactamases nos isolados de <i>E.coli</i> produtores de enzimas ESBL e PMA β nos sistemas de produção de frangos de carne em regime intensivo e semi-intensivo	57
Figura 16- Distribuição dos integrões nas estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de animais produzidos em sistemas de produção intensiva e produção semi-intensiva.....	61

Índice de tabelas

Tabela 1 - Critérios de atribuição de fenótipo ESBL, AmpC e Carbapenemase.....	35
Tabela 2- Valores de CIM ₅₀ (mg/L) e CIM ₉₀ (mg/L) e a frequência de suscetibilidade reduzida (%SR) de <i>E. coli</i> comensais e <i>E. coli</i> presumíveis produtoras de enzimas ESBL e/ou AmpC (CTXr) em isolados de <i>E. coli</i> de frangos de produção intensiva (frangos industriais) e semi-intensiva (frangos do campo).....	43
Tabela 3- Prevalência dos padrões de multirresistência observados nas estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de frangos do campo (n=42) e frangos industriais (n=77).....	51
Tabela 4- Caracterização genotípica das estirpes de <i>E. coli</i> resistentes às cefalosporinas de 3ª geração, isoladas de frangos produzidos em regime semi-intensivo (n=17).....	54
Tabela 5- Caracterização genotípica das estirpes de <i>E. coli</i> resistentes às cefalosporinas de 3ª geração, isoladas de frangos produzidos em regime intensivo (n=42).....	55
Tabela 6— Características do genoma das estirpes MDR de <i>E. coli</i> seleccionadas para Sequenciação do Genoma Completo (WGS).	62
Tabela suplementar 1- <i>Primers</i> e programas de amplificação utilizados na detecção dos genes <i>bla</i> que codificam as β -lactamases ESBL e AmpC plasmídicas, dos genes plasmídicos codificadores de resistência à colistina, e dos EGMs através de PCR multiplex.....	89
Tabela suplementar 2- Condições de eletroforese em gel de agarose para os produtos amplificados.....	92
Tabela suplementar 3- <i>Primers</i> e programa utilizado na purificação dos produtos amplificados para sequenciação.....	93

Lista de abreviaturas e siglas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

APA – Associação Portuguesa do Ambiente

bla -genes de resistência aos β -lactâmicos que codificam β -lactamases

bp – pares de bases (base paires)

CE- Comissão Europeia

CIA - Antibióticos de importância crítica (Critically important antibiotics)

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CMY - β -lactamase que hidrolisa cefamicinas

CTX-M - β -lactamase que hidrolisa cefalosporinas de terceira geração identificada pela 1ª vez em Munique

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DGS – Direção Geral da Saúde

dNTP- desoxinucleotídeo trifosfatado

DTU – Universidade Técnica da Dinamarca (Danmarks Tekniske Universitet)

ECCOF - Valores de corte epidemiológicos (Epidemiological cut-off values)

ECDC –Centro Europeu para a Prevenção e Controlo de Doenças (European Centre for Disease Prevention and Control)

EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (European Food Safety Authority)

EGM - Elemento genético móvel

EMA – Agência Europeia do Medicamento (European Medicines Agency)

ESAC - β -lactamases AmpC de espectro alargado

ESBL- β -lactamases de espectro alargado

ESVAC – Vigilância Europeia do Consumo Veterinário de Antimicrobianos (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption)

EUCAST - Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

EURL-AR - Laboratório Europeu de Referência para a Resistência Antimicrobiana

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

GES - β -lactamase de espectro alargado isolada pela primeira vez na Guiana Francesa

IMI - β -lactamase que hidrolisa o Imipenem

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MAC - Agar MacConkey

mcr - genes de resistência à colistina mediados por plasmídeos

MDR – Multirresistentes

MHA – Agar Mueller-Hinton

MHC - Caldo Mueller-Hinton

mPCR - multiplex Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase – variedade multiplex)

NDM -Metallo- β -lactamase identificada pela 1ª vez em New Delhi

NMC - not-metallo-enzyme carbapenemase

OIE – Organização Mundial para a Saúde Animal

Omp - Porinas da membrana celular externa

OMS- Organização Mundial de Saúde

ORF – *Open Reading Frames*

OXA - β -lactamase que hidrolisa a oxacilina

PBPs - *penicillin-binding proteins* (Proteínas de ligação à penicilina)

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PMA β - β -lactamases do tipo AmpC mediadas por plasmídeos

PMQR – Resistência às quinolonas mediada por plasmídeos

PVRAM – Plano de Vigilância da Resistência Antimicrobiana

QepA – bomba de efluxo de extrusão a quinolonas

qnr - genes de resistência às (fluoro)(quinolonas) (ciprofloxacina)

RAM – Resistência Antimicrobiana

SHV - Sulphydryl Reagent Variable β -lactamase

SME – carbapenemase isolada em *Serratia marcescens* resistentes aos β -lactâmicos

TBE - Tris Borato-EDTA

TE - Tris-EDTA

TEM - β -lactamase isolada pela 1ª vez de uma paciente com o nome Temoniera

THG – Transferência Horizontal de Genes

TSA - Tryptose Soy Agar

TSI - Triple Sugar Iron Agar

TVG – Transferência Vertical de Genes

UE – União Europeia

VIM - Metallo- β -lactamase identificada pela primeira vez em Verona

WGS - Sequenciação Completa do Genoma (Whole Genome Sequencing)

Capítulo I- Introdução

1. Situação atual da resistência aos antibióticos

Os antibióticos são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, com a capacidade de matar (bactericidas) ou inibir o crescimento e multiplicação (bacteriostáticos) de bactérias que provocam infecções em humanos, animais e plantas (ECDC, 2020b).

O termo antibiótico teoricamente só se refere a compostos naturais de origem microbiana (Mohr, 2016). Contudo, este termo é muitas vezes utilizado como sinónimo de qualquer agente antimicrobiano, quer seja de origem natural ou sintética (Mohr, 2016; Lermineaux & Cameron, 2019). Um agente antimicrobiano que atua especificamente em bactérias é denominado de agente antibacteriano (WHO, 2011). Neste estudo o uso do termo antibiótico é utilizado para referências a qualquer agente antibacteriano utilizado para tratar infecções em humanos e animais, quer tenha origem natural, sintética ou semi-sintética.

A resistência antimicrobiana (RAM) refere-se à capacidade de os microrganismos resistirem aos tratamentos com antimicrobianos (WHO, 2011; EFSA, 2020). Considera-se que uma estirpe bacteriana é resistente a determinado antibiótico quando esse antibiótico deixa de matar ou inibir a sua multiplicação, podendo outras estirpes da mesma espécie ser suscetíveis (OIE, 2007; ECDC, 2020a).

A RAM é um fenómeno que ocorre naturalmente nos microbiomas, quando os microrganismos são expostos à acção dos antimicrobianos. A luta contínua travada pelos microrganismos pelo seu espaço ecológico, possibilita aqueles que possuem algum mecanismo de resistência que sejam selecionados, permitindo a sua sobrevivência, multiplicação e consequente dispersão pelas comunidades microbianas (ECDC, 2020a). A RAM é um exemplo clássico do princípio de evolução de Darwin, em que sobrevive a espécie que melhor se adapta ao meio (WHO, 2011). As bactérias são microrganismos incrivelmente resilientes e que têm uma grande capacidade de adaptação quando surgem alterações no ambiente, tal como a presença de antibióticos (WHO, 2011), pelo que o uso excessivo e inapropriado destes medicamentos acelera a emergência e disseminação de bactérias resistentes (ECDC, 2020b).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considerou a RAM, uma das três ameaças mais preocupantes do século XXI (WHO, 2020). Por ano morrem cerca de 33000 pessoas na Europa com infecções não tratáveis devido à ocorrência de estirpes bacterianas

patogénicas multiresistentes; estima-se que em 2050 serão cerca de 10 milhões de mortes em todo o mundo, principalmente provocadas por bactérias de Gram negativo, nomeadamente da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Moraxellaceae* (CE, 2017; Amador *et al.*, 2019; Impey *et al.*, 2020). O número de mortes anual que se verifica atualmente no Espaço Económico Europeu corresponde à soma do número de mortes por SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), Gripe e Tuberculose (ECDC, 2020b), e estima-se que dentro de 30 anos irá superar as mortes por cancro (Lerminiaux & Cameron, 2019).

A descoberta, comercialização e administração de compostos antimicrobianos de forma rotineira para tratar infeções revolucionou a medicina moderna e alterou o paradigma terapêutico (Blair *et al.*, 2015). Assim, a situação atual da RAM é um problema grave e uma ameaça à saúde pública a nível mundial (Roth *et al.*, 2018), com o aparecimento cada vez mais frequente de estirpes bacterianas multiresistentes (resistentes a três ou mais classes de antibióticos) (Magiorakos *et al.*, 2012). Sem antibióticos eficazes, poderemos voltar a uma “era pré-antibióticos” (Lammie & Hughes., 2016), em que o transplante de órgãos, a quimioterapia, os cuidados intensivos e outros procedimentos cirúrgicos podem não ser possíveis em alguns pacientes, devido ao elevado risco de infeção (WHO, 2015; Munita & Arias, 2016). A acrescentar a estes factos, sabe-se ainda que os pacientes com infeções causadas por bactérias multiresistentes requerem mais cuidados, sendo por vezes necessário recorrer a antibióticos alternativos muitas vezes mais caros e com efeitos secundários mais severos (WHO/FAO/OIE, 2016; ECDC, 2020b).

O uso responsável e ponderado destes fármacos pode ajudar a abrandar o aparecimento de bactérias resistentes, e assim manter a sua eficácia para que possam ser utilizados pelas futuras gerações (ECDC, 2020b).

As bactérias resistentes possuem grande capacidade de colonização e de prosperar em qualquer ambiente, afectando não só os seres humanos, mas também os animais domésticos e de produção, a vida selvagem, e contaminando os solos, os cursos de água e os alimentos, de origem vegetal e animal (WHO, 2015). A globalização, com o aumento da velocidade e do volume de viagens intercontinentais (Lammie & Hughes, 2016), cria novas oportunidades para que estas se disseminem rapidamente, através da movimentação de pessoas, do contacto interindividual, e comércio de animais vivos e alimentos (DGS/DGAV/APA, 2019). Desta forma as bactérias conseguem partilhar mais

facilmente o seu material genético, criando novas estirpes resistentes a um ritmo muito elevado (DGS/DGAV/APA, 2019).

É muito importante entender que para controlar este problema que põe em risco a saúde da população humana e animal, é necessário reduzir o consumo desregrado de antibióticos, quer em humanos, quer em animais produtores de alimentos que entrem na cadeia alimentar, e que são potenciais transmissores de estirpes resistentes (Ray *et al.*, 2017). É de salientar que, até cerca de 90% das doses destes fármacos ingeridas pelos animais podem ser excretadas pela urina ou fezes, apenas parcialmente metabolizadas (Mahedi *et al.*, 2018; Amador *et al.*, 2019), contribuindo para a formação de reservatórios de resíduos de antibióticos no meio ambiente, de bactérias comensais como *Escherichia coli* resistentes, e genes de resistência aos antibióticos (Amador *et al.*, 2019).

Visto que a RAM não conhece barreiras ecológicas, setoriais e geográficas, a emergência deste problema num setor ou país, afeta outros setores e outros países (WHO/FAO/OIE, 2016; DGS/DGAV/APA, 2019). Todos os intervenientes nesta problemática têm um papel na preservação da eficácia dos antibióticos, desde as autoridades nacionais, veterinários, médicos, pacientes e produtores (OIE 2016). A prevenção e contenção da resistência aos antimicrobianos requer uma análise dos fatores de risco que potenciam o desenvolvimento e dispersão desta resistência (WHO/FAO/OIE, 2016).

2. Principais grupos e mecanismos de ação dos antibióticos de importância crítica

Nem todos os antibióticos atuam contra todas as bactérias (Magnusson *et al.*, 2019), e um antibiótico pode ser eficaz contra uma ou múltiplas espécies de bactérias. Existem mais de 15 classes de antibióticos, de acordo com a sua estrutura química e modo como atuam nos microrganismos (ECDC, 2020a); por isso, antibióticos que pertencem à mesma classe estão sujeitos aos mesmos mecanismos de resistência (OIE, 2007).

A EMA (Agência Europeia do Medicamento) em 2019 estabeleceu quatro categorias de antibióticos de uso veterinário (de A a D), com base nos critérios da OMS e da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (EMA, 2020). Esta categorização ajuda a entender quais são atualmente os antimicrobianos cujos consumos representam um maior risco para a população humana, e de que forma se deve fazer o controlo do seu consumo, para diminuir o impacto que a utilização destes antibióticos em animais tem, quer para a saúde humana, quer para a saúde animal (OIE, 2007).

Os antibióticos de importância crítica para medicina humana (CIA, *Critical Important Antibiotics*) incluem aqueles que cumprem dois critérios: 1- são a única, ou uma das únicas alternativas para o tratamento de infecções bacterianas graves em pessoas; 2- são antibacterianos utilizados para tratar infecções causadas por bactérias que podem ser transmitidas a humanos através de fontes não humanas, ou para tratar infecções causadas por bactérias que têm a capacidade de adquirir genes de resistência através de fontes não humanas (WHO, 2019). Dentro da categoria de “antibióticos de importância crítica”, encontram-se os “de máxima prioridade”, que são aqueles utilizados com maior frequência em medicina humana, e os que são utilizados para tratar infecções em humanos, para os quais existem bastantes evidências científicas da possível transmissão de bactérias resistentes ou genes de resistência através de fontes não humanas (WHO, 2019). Atualmente estes incluem as quinolonas, as cefalosporinas de terceira, quarta e quinta geração, os macrólidos e as polimixinas (WHO, 2020).

2.1 β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são a classe de antibióticos mais utilizada em todo o mundo, desde a descoberta da benzilpenicilina na década de 1920. São bem tolerados pelos pacientes, possuem um baixo custo e uma elevada eficácia, sendo por isso bastante prescritos em medicina humana e medicina veterinária (Bush & Bradford, 2016).

São agentes bactericidas cujo mecanismo de ação passa pela interrupção da síntese da parede celular bacteriana (Fisher & Mobashery, 2020), através de uma ligação covalente às *penicilin-binding proteins* (PBPs), que são enzimas essenciais na síntese de peptidoglicano, quer nas bactérias de Gram positivo, quer nas bactérias de Gram negativo (Sawa *et al.*, 2020)

Cada espécie bacteriana possui um conjunto específico de PBPs e, portanto, a especificidade da ligação varia de acordo com a espécie da bactéria e a classe de β -lactâmico utilizada, sendo que a morte celular ocorre como resultado da inibição de um ou mais tipos de PBPs (Bush & Bradford, 2016; Sawa *et al.*, 2020).

2.2. Polimixinas

As polimixinas possuem um espectro antibacteriano estreito actuando principalmente contra bactérias de Gram negativo, tais como a *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Salmonella* spp. que fazem parte da família *Enterobacteriaceae* (Poirel & Nordmann,

2017) e, também, contra *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (Apostolakos & Piccirillo, 2018).

O seu alvo é a membrana celular externa, onde deslocam de forma competitiva os catiões divalentes dos lípidos da membrana, ligando-se ao lípido A (Apostolakos & Piccirillo, 2018), e provocando a destabilização dos lipopolissacáridos (LPS) (Impey *et al.*, 2020), com o consequente aumento da permeabilidade da membrana bacteriana. Assim, ocorre o extravasamento do conteúdo citoplasmático, provocando a morte celular (Poirel & Nordmann, 2017) tendo, portanto, um efeito bactericida (Apostolakos & Piccirillo, 2018; Liu & Liu, 2018).

A polimixina com maior importância em medicina veterinária é a colistina (polimixina E), utilizada desde a década de 50 para a prevenção e tratamento de infeções gastrointestinais provocadas por *E. coli* nos animais de produção (EMA, 2016a). Foi anteriormente usada como promotor de crescimento (Liu & Liu, 2018), e continua a ser usada de forma metafilática (Apostolakos & Piccirillo, 2018), principalmente em suínos (Caniaux *et al.*, 2016). É considerada pela OIE um antimicrobiano de alta importância devido à sua utilização no controlo de infeções entéricas provocadas por bactérias de Gram negativo (OIE, 2015).

A colistina foi utilizada até aos anos 70 em medicina humana, mas foi gradualmente substituída por antibióticos menos tóxicos e mais eficazes, como as quinolonas e os β -lactâmicos (Apostolakos & Piccirillo, 2018; Liu & Liu, 2018). Contudo, devido ao aumento da prevalência de bactérias de Gram negativo multirresistentes, a sua administração por via sistémica é cada vez mais admitida como opção terapêutica de último recurso, visto que é atualmente um dos únicos antibióticos eficazes contra as bactérias produtoras de carbapenemases (Poirel & Nordmann, 2017; Apostolakos & Piccirillo, 2018; Impey *et al.*, 2020).

O relatório da DGAV sobre o consumo nacional de antimicrobianos em animais indica que a colistina foi o quarto antibiótico mais consumido em medicina veterinária, com 10,96 toneladas, em 2017 (DGAV, 2017). Os produtos veterinários com colistina são principalmente administrados em tratamentos de grupo, oralmente, na alimentação ou na água de bebida, principalmente em suínos e aves (Apostolakos & Piccirillo, 2018). A nível nacional não é feita a notificação detalhada do consumo para cada espécie animal, pelo que os dados disponíveis se encontram agregados.

2.3 Macrólidos

Os agentes desta classe de antibióticos são considerados de largo espectro, e com efeito bacteriostático, apesar de em doses elevadas poderem ter ação bactericida (Arsic *et al.*, 2018).

Têm como alvo a subunidade 50S do ribossoma bacteriano, levando à inibição da síntese proteica. Quando se ligam ao ribossoma, estes antibióticos impedem a tradução do mRNA, ao impedir a adição de aminoácidos pelo tRNA à cadeia de péptidos (Arsic *et al.*, 2018).

Desde a introdução da espiramicina na prática veterinária na década de 1960, uma série de macrólidos têm sido utilizados no controlo e tratamentos de infeções principalmente em animais de produção (Gomes *et al.*, 2017). Apesar de serem utilizados essencialmente para tratar infeções provocadas por bactérias de Gram positivo, alguns macrólidos, designadamente a azitromicina, utilizada em humanos, demonstrou ser eficaz contra *Enterobacteriaceae* (Gomes *et al.*, 2017). A tulatromicina, espiramicina, tilosina, e tilmicosina são alguns exemplos de antibióticos desta classe utilizados em medicina veterinária. Em Portugal os antibióticos desta classe são os mais frequentemente administrados em aves (Costa 2019, comunicação pessoal), principalmente a tilosina e tiamulina para o tratamento de infeções por *Clostridium perfringens* e *Mycoplasma* sp.

2.4 Quinolonas e Fluoroquinolonas

Contrariamente ao que aconteceu com outros antibióticos, os agentes pertencentes à classe das quinolonas não foram isolados a partir de organismos vivos, mas foram sintetizados quimicamente (Emmerson & Jones, 2003). O seu desenvolvimento iniciou-se com a descoberta acidental do ácido nalidixico em 1962, que é um subproduto da síntese de cloroquina, um composto antimalárico (Aldred, 2014).

Têm um efeito bactericida, ao inibir duas enzimas muito importantes na replicação e transcrição do ADN bacteriano, a ADN girase e a topoisomerase IV (Ray *et al.* 2017). Ao atuarem nestas enzimas, que são responsáveis por manter a integridade da hélice de ADN superenrolado, não permitem a multiplicação bacteriana, provocando quebras na molécula de ADN, conduzindo à morte bacteriana (Andriole, 2005; Aldred, 2014).

A ADN girase é constituída por duas sub-unidades, dois monómeros A e dois monómeros B, codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB*, e a topoisomerase IV possui as sub-unidades A e B, codificadas pelos genes *parC* e *parE* (Aldred, 2014).

Na década de 80 surgiram as fluoroquinolonas contendo um átomo de fluor, que lhes confere atividade contra bactérias de Gram positivo como *Staphylococcus* spp, e um anel de piperazina que aumenta o espectro de ação contra bactérias de Gram negativo incluindo *Pseudomonas aeruginosa* (Andriole, 2005).

Apesar de serem reconhecidas internacionalmente como fazendo parte dos “antimicrobianos de importância crítica de máxima prioridade”, as fluoroquinolonas continuam a ser extensivamente utilizadas em medicina humana e medicina veterinária (Rusch *et al*, 2019). Dentro deste grupo existem alguns antibióticos, tais como a enrofloxacin e marbofloxacin, que são de uso exclusivo para medicina veterinária e outros, como a ciprofloxacina, utilizada em medicina humana (Rusch *et al*, 2019) e animais de companhia.

3. Resistência intrínseca e adquirida

Algumas bactérias são naturalmente resistentes a certas substâncias (resistência intrínseca), ou seja, possuem mecanismos inatos contra determinados compostos incluindo antimicrobianos, como resultado da evolução (Ray *et al.*, 2017). Assim, o problema surge quando as bactérias que normalmente são suscetíveis a determinado antibiótico se tornam resistentes devido a modificações genéticas (resistência adquirida) (WHO, 2015; ECDC, 2020a). A resistência adquirida está diretamente relacionada com o modo como os antibióticos são utilizados, visto que estes fármacos, especialmente os de largo espectro, exercem uma pressão seletiva geradora de resistências, eliminando as bactérias suscetíveis e favorecendo a proliferação das resistentes (DGS/DGAV/APA, 2019). De uma perspectiva evolutiva, as bactérias possuem duas estratégias a nível genético para se adaptarem a um meio onde existam moléculas de substâncias inibidoras que possam comprometer a sua existência: ou sofrem mutações genéticas, ou adquirem ADN que codifica determinantes de resistência através da troca de elementos genéticos móveis (EGMs) (Dimopoulos *et al.*, 2016; Ray *et al.*, 2017; Lerminiaux & Cameron, 2019). Perante tal cenário, a informação genética é transmitida à descendência através da transferência vertical de genes (TVG), mas nas situações em que existem EGMs responsáveis pela aquisição de determinantes de resistência, esta é não só transmitida à descendência, mas pode ser transmitida entre bactérias da mesma espécie e, também, entre bactérias de espécies diferentes, pela transferência horizontal de genes (THG) (Chang *et al.*, 2014; Lerminiaux & Cameron, 2019).

Sendo o tempo de geração para a maioria das bactérias muito curto, a transmissão de elementos genéticos que codificam resistência p.e. para antibióticos entre bactérias é muito rápida. Assim, e num meio submetido a pressão antibiótica, a população bacteriana resistente rapidamente se sobrepõe, proliferando em detrimento das restantes populações bacterianas suscetíveis (Lerminiaux & Cameron, 2019).

Por outro lado, as bactérias podem manter a resistência a determinados antibióticos por longos períodos de tempo, mesmo na ausência de exposição aos fármacos, persistindo assim níveis elevados de resistência a antibióticos que por vezes já nem são utilizados (WHO, 2011; Lerminiaux & Cameron, 2019). A acrescentar a este facto, por vezes os genes de resistência e virulência podem ser transferidos simultaneamente, levando ao aparecimento de microrganismos não só bastante resistentes, mas também patogénicos e virulentos, as chamadas superbactérias (Lerminiaux & Cameron, 2019).

É de salientar que um gene de resistência pode conferir resistência a dois ou mais antibióticos pertencentes à mesma classe, o que se designa de resistência cruzada. Os genes que conferem resistência a diferentes classes de antibióticos encontram-se muitas vezes localizados próximos nos EGMs podendo ser transferidos simultaneamente, o que se designa de co-resistência (WHO, 2011). Assim, a utilização de um tipo de antibiótico pode resultar na resistência não só a esse fármaco em específico, mas também a outros da mesma classe (seleção cruzada), ou de outras classes (co-seleção) (WHO, 2011).

3.1. Mecanismos de resistência antimicrobiana

Existem quatro mecanismos principais responsáveis pela resistência antimicrobiana (Figura 1):

3.1.1. Diminuição da permeabilidade da membrana celular

A membrana celular funciona como barreira à entrada de determinados fármacos, incluindo os antimicrobianos, impedindo-os de exercer a sua ação já que a maioria necessita de entrar na célula para conseguir atingir o seu alvo (Impey *et al.*, 2020). Alguns antibióticos hidrofílicos como os β -lactâmicos, tetraciclinas e algumas fluoroquinolonas, têm a capacidade de atravessar a membrana celular através de porinas, que são canais de difusão (Munita & Arias, 2016). Existem porinas que só permitem o transporte de solutos específicos, mas a maioria permite a passagem de antibióticos de várias classes (Impey *et al.*, 2020). A resistência aos antibióticos pode ser resultado da diminuição do número de porinas codificadas no genoma bacteriano, controlando a expressão de alguns tipos de

porinas, ou através da alteração estrutural destas proteínas tornando-as mais seletivas. (Impey *et al.*, 2020). Alterações na permeabilidade normalmente resultam em níveis baixos de resistência, e muitas vezes estão associadas a outros mecanismos de resistência, como o aumento da expressão das bombas de efluxo (Li *et al.* 2015). Entre as porinas melhor caracterizadas estão as OmpF e OmpC produzidas por *E. coli* (Li *et al.* 2015).

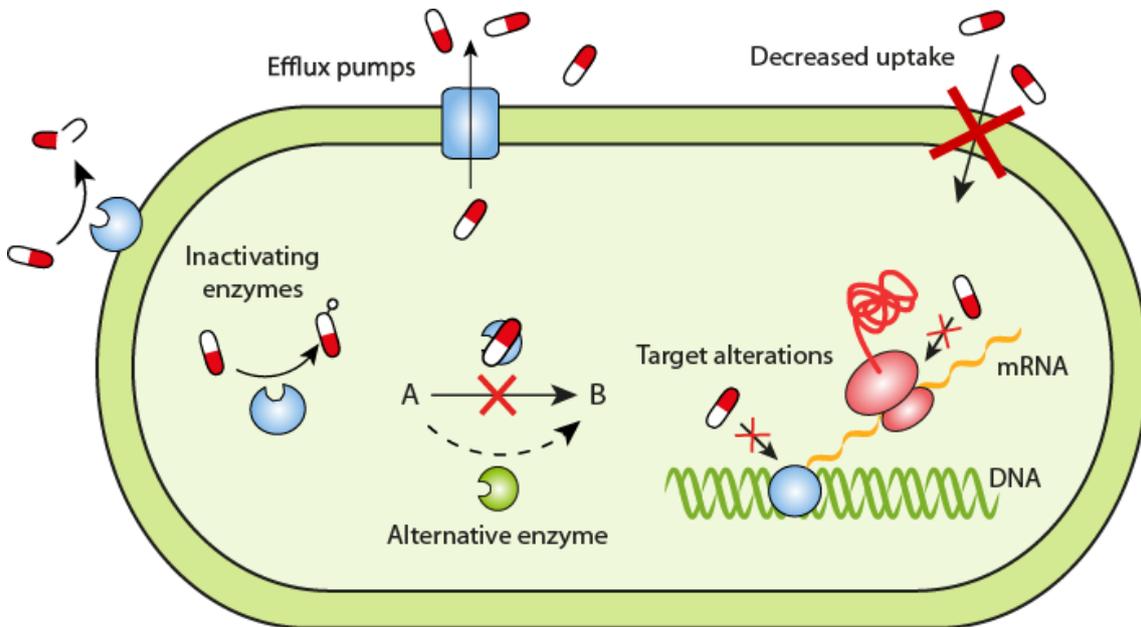


Figura 1- Mecanismos de resistência antimicrobiana

(Retirada de <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/resistance-mechanisms-in-bacteria/>)

3.1.2. Bombas de efluxo

Estas proteínas encontram-se de forma ubiqüitária na membrana celular das bactérias (Li *et al.*, 2015) e são responsáveis pela extrusão de vários solutos por transporte ativo, diminuindo a sua capacidade de ação, visto que não permanecem em concentração e tempo necessário no interior da célula bacteriana para exercer o efeito desejado (Ray *et al.* 2017). Este mecanismo de resistência é relevante no caso das tetraciclínas e das fluoroquinolonas (Ray *et al.* 2017).

Existem bombas de efluxo específicas para uma determinada classe de antibióticos, tal como QepA, responsável por diminuir a susceptibilidade às fluoroquinolonas (Li *et al.*, 2015). Existem igualmente outro tipo de bombas de efluxo com capacidade para expulsar

um número alargado de fármacos estruturalmente diferentes (Munita & Arias, 2016), tal como AcrAB-Tol, ou OqxAB-TolC (responsável por diminuir a suscetibilidade à ciprofloxacina e ao cloranfenicol), nas bactérias pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* (Li *et al.*, 2015; Impey *et al.*, 2020).

A regulação da expressão do número de bombas de efluxo pode ser o primeiro mecanismo de defesa e a primeira resposta das bactérias a um tratamento antimicrobiano, constituindo uma etapa essencial para o desenvolvimento de mutações genéticas que permitem desenvolver mecanismos de resistência mais específicos contra uma determinada classe de antibióticos (Impey *et al.*, 2020).

As cinco famílias de transportadores de bombas de efluxo são: ABC (*ATP-binding cassette transporters*), RND (*resistance-nodulation-cell division*), MF (*major facilitator*), SMR (*small multidrug resistance*) e MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) (Ray *et al.* 2017).

Os genes que codificam este tipo de resistência encontram-se muitas vezes em plasmídeos, o que favorece a sua disseminação entre espécies bacterianas (Li *et al.*, 2015).

3.1.3. Modificação ou inativação enzimática

O mecanismo de modificação enzimática envolve duas classes específicas de enzimas: um grupo que degrada o antibiótico, e outro que catalisa modificações químicas (Ray *et al.* 2017).

Algumas enzimas produzidas pelas células bacterianas têm a capacidade de catalizar reações bioquímicas de acetilação e fosforilação (nos aminoglicosídeos e cloranfenicol), ou adenilação (nos aminoglicosídeos). Outras enzimas, como é o caso das β -lactamases, destroem o anel β -lactâmico da molécula de antibiótico, tornando-o ineficaz e impedindo-o de se ligar às PBPs (Ray *et al.*, 2017).

3.1.4 Proteção ou alteração dos alvos

As bactérias desenvolveram ainda a capacidade de proteger os alvos, impedindo assim que as moléculas de antibiótico cheguem aos locais de ligação. Os determinantes genéticos que codificam este tipo de resistência já foram detetados em cromossomas, encontrando-se a maioria em EGMs. Um exemplo deste mecanismo ocorre em *E. coli* com resistência plasmídica às fluoroquinolonas, em que os alvos (enzimas ADN girase e

topoisomerase IV) são protegidos por proteínas Qnr, codificadas pelos genes de resistência *qnr* (Lerminiaux & Cameron, 2019).

De modo a diminuir a afinidade do antibiótico ao seu local de ligação, podem ainda surgir alterações genéticas que modificam a estrutura do próprio alvo, como acontece no caso da resistência às fluoroquinolonas em que se verificam mutações cromossômicas nas subunidades das enzimas ADN girase e topoisomerase IV, ou alterações estruturais nas PBPs que são responsáveis pela resistência às penicilinas (Ray *et al.* 2017).

Os fenótipos de resistência bacteriana podem ser resultado da presença de apenas um gene (por exemplo no caso das carbapenemases), mas muitas vezes resultam da conjugação de vários mecanismos de resistência, pelo que é importante o desenvolvimento de fármacos eficazes que tenham como objetivo atuar em diferentes alvos (Impey *et al.*, 2020)

4. Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos

O mecanismo de resistência predominante nesta classe de antibióticos, em bactérias de Gram negativo é a produção de β -lactamases (Ray *et al.* 2017), que degradam o anel β -lactâmico. Os genes que codificam estas enzimas designam-se por *bla*, e são seguidos pelo nome da enzima específica (ex: *bla*_{CTX-M-2}); podem estar localizados no cromossoma ou em EGMs no genoma acessório (plasmídeos) (Munita & Arias, 2016).

Existem dois esquemas de classificação que agrupam este grande número de enzimas. A classificação de Ambler, que separa as β -lactamases em quatro classes (A, B, C e D) com base na sua sequência de aminoácidos, e a classificação de Bush-Jacoby-Medeiros, que as classifica em três grupos com base na sua função bioquímica, especificidade de substrato e perfil inibitório (Munita & Arias, 2016; Sawa *et al.*, 2020). A classificação de Bush-Jacoby-Medeiros tem a vantagem de tentar estabelecer uma correlação entre cada grupo de enzimas e o fenótipo dos isolados clínicos (Bush & Jacoby, 2010) (Figura 2).

Ao grupo 1 pertencem as cefalosporinas da classe C (da classificação de Ambler), as designadas β -lactamases AmpC (Bush & Jacoby, 2010). Hidrolisam as cefalosporinas de terceira geração e cefamicinas como a cefoxitina, e não são inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam (Jacoby, 2009; Munita & Arias, 2016; Sawa *et al.*, 2020). Apesar de o cefepime não ser um bom substrato para as β -lactamases AmpC, quando esta enzima é expressa em grande quantidade a concentração inibitória mínima (CIM) do cefepime pode aumentar consideravelmente (Olsen *et al.*, 2014).

Muitas bactérias da família *Enterobacteriaceae* produzem naturalmente cefalosporinases AmpC codificadas no cromossoma (Haenni *et al.*, 2014; Sawa *et al.*, 2020), apesar de o gene *bla*_{AMPc} também poder estar localizado em plasmídeos (Olsen *et al.*, 2014; Munita & Arias, 2016). No caso de *E. coli*, esta enzima expressa-se normalmente em valores muito baixos devido à existência de um promotor fraco e um atenuador transcripcional que precede o gene *ampC* (Haenni *et al.*, 2014). No entanto, a sobreexpressão deste gene foi reportada em alguns isolados, e é atribuída a mutações espontâneas específicas na região que codifica este gene, dando origem às enzimas ESAC (β -lactamases AmpC de espectro alargado), as quais têm uma maior atividade contra a ceftazidima, como resultado de substituições, inserções ou deleções de aminoácidos (Haenni *et al.*, 2014). Os genes que codificam enzimas AmpC mediadas por plasmídeos derivam de cefalosporinases AmpC cromossómicas e englobam várias famílias, nomeadamente as CMY, ACT, DHA, FOX, MIR, ACC, LAT e MOX. A variante mais comum em *Enterobacteriaceae* de animais de produção e alimentos de origem animal é a CMY-2 (Pietsch *et al.*, 2018), apesar de serem menos comuns que as ESBL (β -lactamases de espectro alargado) na Europa (Bush & Jacoby, 2010).

Do grupo 2 fazem parte as enzimas das classes A e D e é o mais extenso (Bush & Jacoby, 2010). As enzimas pertencentes à classe A possuem um resíduo de serina e incluem uma grande variedade de proteínas com diferentes atividades catalíticas, como as penicilinases (SHV-1 e TEM-1, que só hidrolisam a penicilina), as ESBL (como as CTX-M) e algumas carbapenemases (Sawa *et al.*, 2020). As ESBLs têm a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de terceira e quarta geração (a sua principal característica), e monobactâmicos, mas não possuem ação contra cefamicinas e carbapenemos (Cantón *et al.*, 2012; Olsen *et al.*, 2014). As cefalosporinas de terceira e quarta geração fazem parte dos antimicrobianos mais utilizados em medicina humana, e algumas como o ceftiofur, são também extensamente utilizadas em animais de produção, o que constitui uma preocupação que este facto resulte no desenvolvimento de resistência em microrganismos veiculados pela cadeia alimentar (Hao *et al.*, 2016). Estas enzimas são susceptíveis a inibidores de β -lactamases como o ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (Cantón *et al.*, 2012). As três β -lactamases mais representativas da família das ESBL nas estirpes de *E. coli* que colonizam os animais e o homem são as TEM (identificadas pela primeira vez numa paciente de nome Temoniera), as SHV (*Sulfydryl reagent variable*) e as CTX-M (identificadas em Munique, e que são ativas contra a

cefotaxima) (Olsen *et al.*, 2014). As enzimas CTX-M surgiram através da mobilização e incorporação de genes cromossômicos *bla* provenientes de uma bactéria ambiental, a *Kluyvera* spp., em EGMs (Cantón *et al.*, 2012). Inicialmente os genes *bla*_{CTX-M} codificavam enzimas com efeito catalítico contra a cefotaxima, e não contra a ceftazidima. Devido à pressão seletiva contínua exercida pelo consumo de β-lactâmicos, alargou a capacidade de hidrólise nomeadamente da ceftazidima (Cantón *et al.*, 2012). As estirpes portadoras de enzimas da família CTX-M proliferaram rapidamente não só devido à presença dos genes *bla*_{CTX-M} em plasmídeos de grandes dimensões envolvendo a sequência de inserção *ISEcp1*, mas também devido à sua presença em clones bacterianos muito bem sucedidos (Cantón *et al.*, 2012). Os genes *bla*_{CTX-M} disseminaram-se muito rapidamente por todo o globo num fenómeno designado “pandemia CTX-M” (Cantón & Coque, 2006) e nas últimas décadas as estirpes que possuem estas enzimas, têm sido uma das principais causadoras de infeções em humanos (Olsen *et al.*, 2014). Existem cinco grupos destas enzimas (1, 2, 8, 9 e 25) que podem ser identificados por reações específicas da cadeia da polimerase (PCRs) (Cantón *et al.*, 2012).

As carbapenemases pertencentes a esta classe são de cinco famílias: três que estão codificadas tipicamente em cromossomas (IMI (Imipenem-hydrolyzing enzyme), SME (*Serratia marcescens* enzyme) e NMC (not-metallo-enzyme carbapenemase), e duas que se encontram em plasmídeos ou outros EGMs (KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) e GES (Guiana extended-spectrum). Tal como todas as enzimas da classe A, são inibidas pelo ácido clavulânico e o tazobactam, e hidrolisam o aztreonam mas não as cefamicinas (Munita & Arias, 2016).

Na classe D encontram-se as enzimas que se diferenciam das da classe A por serem capazes de hidrolisar a oxacilina, e por não serem inibidas pelo ácido clavulânico (Munita & Arias, 2016; Sawa *et al.*, 2020). Já foram descritas várias variantes destas enzimas OXA que por degradarem as cefalosporinas de terceira geração também são consideradas ESBL (Olsen *et al.*, 2014). Outras, hidrolisam também os carbapenemos (carbapenemases), que são os compostos β-lactâmicos de última geração disponíveis na prática clínica para tratamento de infeções hospitalares complicadas, constituindo a carbapenemase OXA-48 uma das mais disseminadas pelo globo e com maior importância clínica (Munita & Arias, 2016).

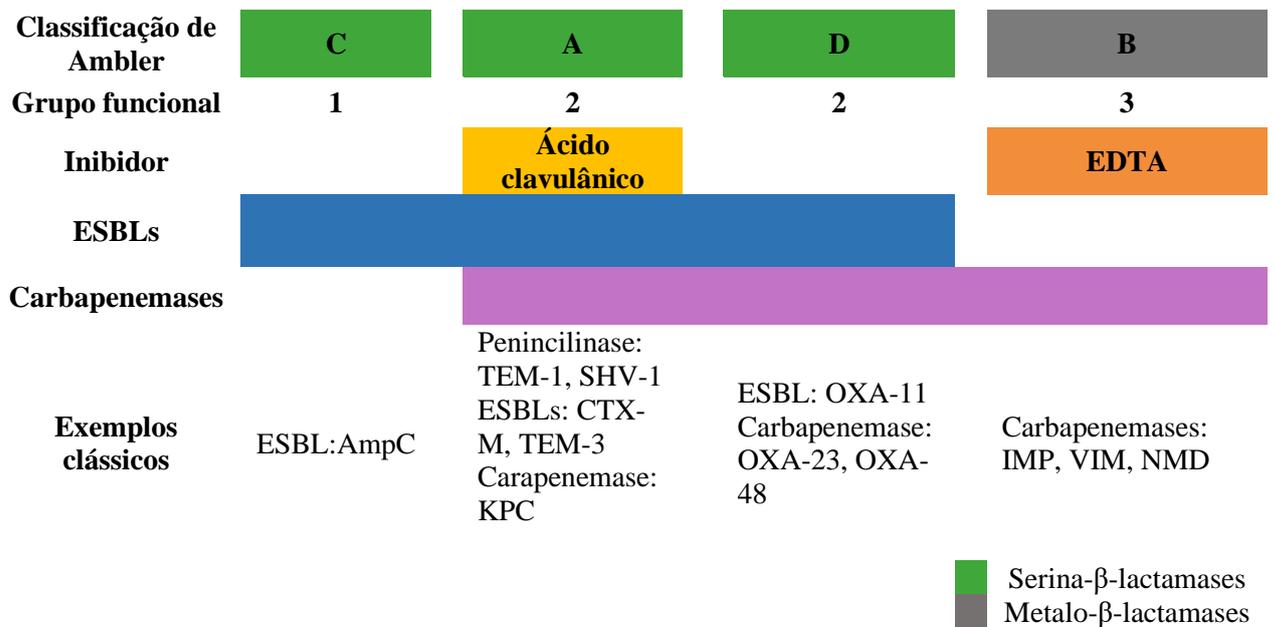


Figura 2- Representação esquemática da classificação das β-lactamases (Adaptada de Munita & Arias, 2016).

Do grupo 3 fazem parte as enzimas da classe B, conhecidas como metalo-β-lactamases, por utilizarem um íon de zinco como cofator, em vez do resíduo de serina (Ray *et al.* 2017). São inibidos por agentes quelantes como o EDTA e são ativas contra uma grande variedade de β-lactâmicos incluindo os carbapenemos (Ray *et al.* 2017; Sawa *et al.*, 2020). Não são inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam e hidrolisam cefamicinas mas não o aztreonam (Munita & Arias, 2016). As mais importantes desta classe são as carbapenemases das famílias IMP (*Imipenem-resistant metallo β-lactamases*), VIM (*Verona integron encoded metallo β-lactamases*), e NDM (*New Dehli metallo β-lactamase*) (Munita & Arias, 2016; Sawa *et al.*, 2020). Os genes que codificam as enzimas NDM normalmente também possuem outros determinantes de resistência que codificam outras carbapenemases, ESBL, e resistência às quinolonas, sendo por isso a sua presença normalmente acompanhada de fenótipos multirresistentes (MDR) (Munita & Arias, 2016).

As estirpes produtoras de ESBLs emergiram globalmente em animais de produção nas últimas décadas, aumentando a preocupação de transmissão de estirpes resistentes ao homem quer por contacto direto com os animais, e o ambiente em que se encontram (WHO, 2011), quer por contacto indireto através do consumo de alimentos de origem animal contaminados (Ceccarelli *et al.*, 2019).

5- Mecanismos de resistência às Polimixinas

As polimixinas foram recentemente movidas para a categoria de “Antimicrobianos de Importância Crítica de Alta Prioridade” pela OMS. Esta decisão foi tomada com base no

aumento da necessidade da sua utilização para tratar infeções humanas graves em várias regiões do mundo (EFSA, 2020), mas também devido à descoberta em 2015 dos genes *mcr* (mobile-colistin-resistance gene) identificados em EGMs, com uma elevada capacidade de disseminação entre estirpes bacterianas portadoras (Liu *et al.*, 2016).

Até 2015, os mecanismos de resistência conhecidos encontravam-se codificados no cromossoma, e estavam relacionados com a modulação de sistemas reguladores, que provocam alterações no lípido A (Liu & Liu, 2018). Contudo, nesse ano de 2015, foi descoberto o primeiro caso de resistência à colistina mediada por plasmídeos, e desde então mais de 50 países, incluindo Portugal, notificaram a presença de estirpes portadoras do gene *mcr* em várias espécies da família *Enterobacteriaceae* (Caniaux *et al.*, 2016; Liu & Liu, 2018). Este gene codifica a proteína MCR, uma transferase, que se pensa ter tido origem numa estirpe de *Paenibacillus polymyxa*, a qual possui resistência intrínseca a compostos presentes no ambiente (Caniaux *et al.*, 2016). Mais recentemente foram identificadas novas variantes do gene (*mcr-2* a *mcr-10*), sendo *mcr-1* o mais frequente em *E. coli* (Liu & Liu., 2018; Hussein *et al.*, 2021). Este gene já foi reportado em várias estirpes de bactérias de Gram negativo em animais e humanos, ultrapassando a barreira de espécie (Caniaux *et al.*, 2016).

Os dados epidemiológicos e o uso comum em animais, leva a comunidade científica a pensar que a resistência adquirida à colistina é transferida aos humanos pelos animais (Poirel & Nordmann, 2016). Existem vários factos que suportam esta hipótese, entre eles, a extensa utilização da colistina em medicina veterinária e produção animal, a qual condiciona a pressão seletiva, pelo que este gene se distribui largamente em animais; por outro lado, o gene *mcr* está geralmente associado à sequência de inserção ISAPLI, que foi identificada inicialmente em suínos. Além disso, as estirpes portadoras do gene *mcr-1* normalmente possuem também o gene *floR* que confere resistência ao florfenicol, um antibiótico utilizado exclusivamente em medicina veterinária (Liu & Liu, 2018).

A colistina tem sido largamente utilizada em medicina veterinária, principalmente em animais de produção, tais como suínos, frangos, e perus, expondo as bactérias da microbiota intestinal a uma grande pressão seletiva (Poirel *et al.*, 2018). Os dados de 26 países europeus indicam uma associação positiva entre o consumo de polimixinas nos animais produtores de alimentos e a resistência à colistina em microrganismos indicadores, nomeadamente *E. coli* (Liu & Liu, 2018).

Nos países Nórdicos da Europa a resistência à colistina e a prevalência dos genes *mcr* permanece muito baixa em aves, onde a colistina nunca foi utilizada regularmente na prática veterinária. Nos países do sul e França, a prevalência do gene *mcr-1* nas aves é mais elevada, principalmente nas estirpes provenientes de perus em relação às de frangos (Apostolakos & Piccirillo, 2018).

De salientar que, algumas estirpes isoladas de pacientes que não foram tratados com colistina possuem o gene *mcr*, pelo que se especula que a aquisição desta resistência possa ter resultado do contacto com animais portadores ou via alimentar, através da ingestão e/ou manipulação de alimentos, levando à colonização gastrointestinal assintomática (Caniaux *et al.*, 2016). Por outro lado, importa referir que os plasmídeos envolvidos na resistência à colistina já se estabeleceram em clones pandémicos de sucesso, tais como *E. coli* ST131, e por isso a dispersão do gene *mcr-1* poderá tornar-se global em estirpes patogénicas multiresistentes (García-Meniño *et al.*, 2018).

Por todos estes motivos, neste momento a utilização da colistina em medicina veterinária está reservada para infeções em que não existem outros antibióticos eficazes como opções para o seu tratamento (EMA, 2016b; EMA, 2020).

6. Elementos genéticos móveis e transmissão horizontal de genes

É através dos elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposões, e elementos genéticos mobilizáveis como os integrões que ocorre a THG (Babakhani & Oloomi, 2018; Mehdi *et al.*, 2018), facilitando a disseminação conjunta de determinantes de resistência a antimicrobianos de diferentes classes, e também de genes de virulência e resistência a biocidas (WHO/FAO/OIE, 2016).

As bactérias podem adquirir material genético através de três processos diferentes: a conjugação, transdução e transformação (Lerminiaux & Cameron, 2019). A conjugação é o método mais comum e eficiente de transferência de genes, implicando o contacto entre duas células bacterianas; ocorre em grande escala no sistema gastrointestinal dos seres vivos com a transmissão de plasmídeos (Lerminiaux & Cameron, 2019) (Figura 3). A transformação é o processo de captação de ADN exógeno do ambiente através da degradação/lise microbiana, e posterior incorporação em cassetes genéticas (Ray *et al.*, 2017). A transdução necessita de um vetor específico, normalmente vírus designados

bacteriófagos, que transportam os genes de resistência e os introduzem num hospedeiro bacteriano (Ray *et al.*, 2017).

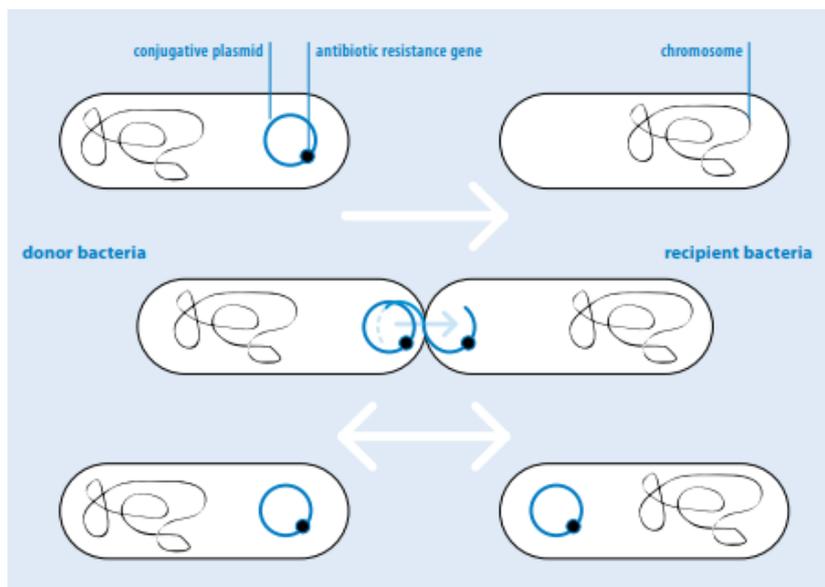


Figura 3. Transferência horizontal de genes entre bactérias por conjugação (Retirada de WHO, 2011).

As cassetes de genes são elementos de ADN compacto que normalmente tem uma estrutura simples, e são constituídas por uma única ORF (*Open Reading Frame*) e um local de recombinação, sendo reservatórios importantes de alterações genómicas (Gillings, 2014). É comum vários genes de resistência para diferentes classes de antibióticos serem transportados simultaneamente na mesma cassete genética, facilitando a sua transmissão e aquisição por bactérias susceptíveis, que se tornam assim multirresistentes (Lerminiaux & Cameron, 2019).

Os integrões são sistemas versáteis de aquisição de genes frequentemente encontrados em bactérias, incluindo *E. coli* presentes numa grande variedade de ambientes, como em solos de floresta, desertos, superfícies de plantas, e nos sedimentos dos oceanos (Gillings, 2014; Blaak *et al.*, 2015). Compreendem cassetes de genes que possuem características de recombinação, que permitem múltiplas trocas de genes num único evento (Ray *et al.* 2017). Constituem um mecanismo altamente eficiente de acumular genes de resistência (Ejaz *et al.*, 2021), pois são sistemas de recombinação de locais específicos, capazes de recrutar ORFs na forma de cassetes genéticas móveis (Munita & Arias, 2016). São um dos principais responsáveis pela evolução bacteriana, visto que permitem a adição de novos genes de resistência ao cromossoma bacteriano de forma simples, juntamente com

toda a maquinaria necessária para a sua expressão (Gillings, 2014). Apesar de não serem considerados elementos genéticos *per se*, a sua localização em plasmídeos e transposões permite a transmissão genética inter e intra espécies (Amador *et al.*, 2019).

A localização dos integrões nos cromossomas ou em EGMs é importante do ponto de vista funcional e também evolutivo, visto que a mobilidade dos EGMs permite a transmissão a outras espécies de bactérias, enquanto a localização nos cromossomas permite aumentar a complexidade genómica, e aumentar a diversidade fenotípica (Gillings, 2014). Os integrões móveis, que estão associados a EGMs, acumulam um grande número de genes de resistência e têm um papel fundamental na dispersão da RAM, principalmente em bactérias de Gram negativo. São cada vez mais abundantes, aumentando a possibilidade de interação com outras moléculas de ADN e geram novos e mais complexos EGMs que possuem determinantes de resistência a várias classes de antibióticos, desinfetantes e metais pesados (Gillings, 2014). Os integrões são responsáveis por aumentar a diversidade genética muito rapidamente em momentos de mudança e seleção natural, tornando-se inativos em períodos de estabilidade ambiental (Gillings, 2014).

A estrutura clássica de um integrão é formada por uma plataforma que inclui: um gene *intI*, que codifica uma integrase (IntI); um local de recombinação *attI*; um promotor; e uma casete de genes associada (*attC*) (Gillings, 2014; Sawa *et al.*, 2020) (Figura 4).

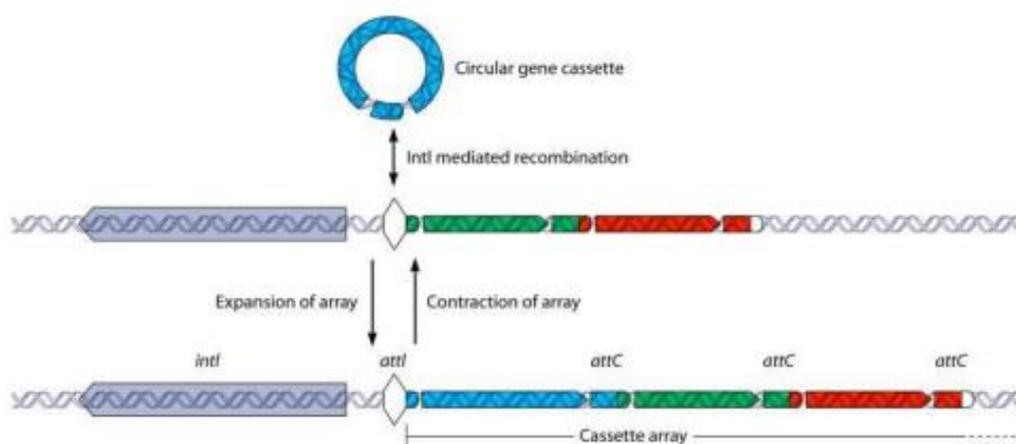


Figura 4 - Processo de aquisição de cassetes genéticos pelos integrões.
(Retirada de Akrami *et al.*, 2019)

Existem três classes de integrões associados à RAM em bactérias de Gram negativo. Estes são normalmente mobilizáveis, e as suas cassetes são de pequena dimensão (Gillings,

2014). Os da classe I são os mais prevalentes, estando associados a uma grande diversidade de cassetes genéticas, e encontram-se numa grande variedade de espécies. Disseminam-se rapidamente por conjugação, e encontram-se em cerca de 40% a 70% das bactérias de Gram negativo, isoladas de animais de produção e companhia, sendo que em *E. coli* comensal a sua prevalência chega a atingir os 80% (Gillings, 2014). Estas bactérias comensais podem depois transferir estes elementos genéticos a outras bactérias ambientais, comensais, zoonóticas e patogénicas (Gillings, 2014).

Os integrões da classe II e III não são tão prevalentes, mas têm também origem em bactérias ambientais, e possuem uma menor capacidade de aquisição e reorganização de cassetes genéticas.

Os transposões são um grupo de EGMs que podem codificar determinantes de resistência, e constituem os genes que “saltam” e que se encontram nos plasmídeos ou no cromossoma do hospedeiro (Frost *et al.* 2005). São sequências de ADN, que se podem mover dentro da mesma molécula no genoma, ou para outras moléculas de ADN (Babakhani & Oloomi, 2018)

Os plasmídeos são moléculas de ADN autónomas, extracromossómicas, que se replicam de forma independente, e capazes de se transmitir entre células (Rozwandowicz *et al.*, 2018; Lerminiaux & Cameron, 2019). A capacidade de os plasmídeos adquirirem novos genes através de EGMs, como sequências de inserção ou transposões, e a capacidade de se replicarem numa grande variedade de hospedeiros, torna-os vetores perfeitos para a disseminação de determinantes de resistência (Rozwandowicz *et al.*, 2018), e por isso representam um dos desafios mais difíceis no controlo da disseminação da RAM (Carattoli, 2013). Muitas vezes é possível identificar vários genes de resistência a diferentes classes de antibióticos no mesmo plasmídeo, o que confere uma vantagem seletiva às bactérias (Carattoli, 2013). Assim, são fundamentais para o que se designa de “capitalismo genético”, ou seja, à medida que aumenta o número de genes acessórios num destes EGMs, o potencial de ocorrência da seleção positiva da estirpe bacteriana que os hospeda, aumenta, pois a exposição a qualquer agente seletivo (antibiótico ou outro), confere vantagem a todo o ADN, selecionando todos os genes (Gillings, 2014).

A identificação molecular de um plasmídeo e o genótipo das estirpes permite avaliar se a disseminação de genes de resistência ocorreu devido à dispersão de plasmídeos epidémicos em diferentes hospedeiros, ou à dispersão de clones bacterianos que contêm

estes plasmídeos com genes de resistência (Rozwandowicz et al., 2018). Os que têm maior importância para a RAM são os IncF, IncI, IncA/C, IncL, IncN e IncH (Rozwandowicz et al., 2018). Na Europa as estirpes de *E. coli* produtoras de ESBLs que colonizam as principais espécies de animais de produção, possuem principalmente plasmídeos da família IncI. Alguns plasmídeos podem carregar uma grande variedade de genes de resistência, como é o caso dos IncF. Outros, demonstram uma forte correlação com genes específicos como os IncI que estão associados principalmente a genes de enzimas ESBL, os IncL/M com o gene *bla_{OXA-48}*, ou os IncK com os genes *bla_{CMY-2}* e *bla_{CTX-M-14}* (Rozwandowicz et al., 2018).

7. Utilização de antibióticos em medicina veterinária e produção animal

A utilização de antibióticos para a prevenção e tratamento de doenças em medicina veterinária e, principalmente, na produção animal, onde por vezes foram também utilizados como promotores de crescimento, permitiu obter animais mais saudáveis (OIE, 2016), mais produtivos (Hao et al., 2016), melhorar a segurança alimentar, e promover o crescimento económico (Magnusson et al., 2019). Contudo, o seu uso desadequado e excessivo contribuiu para o aparecimento de estirpes resistentes, comprometendo a saúde pública, saúde animal e segurança alimentar (WHO/FAO/OIE, 2016). Um exemplo do uso desadequado destes fármacos é demonstrado quando, em 2006, a União Europeia proibiu a utilização de antibióticos como promotores de crescimento, o que fazia esperar que ocorresse uma diminuição do consumo de antimicrobianos na Europa, mas pelo contrário o consumo aumentou devido ao seu crescente uso de forma profilática e metafática (Woolhouse et al., 2015).

A principal causa de resistência aos antibióticos em humanos continua a ser o seu uso inadequado em medicina humana (ECDC, 2020b). Todavia, os antibióticos utilizados para tratar e prevenir infeções bacterianas em animais pertencem aos mesmos grupos químicos que os utilizados em medicina humana (Hao et al., 2016), pelo que é fundamental otimizar o seu uso (DGS/DGAV/APA, 2019). A proibição total do uso de antimicrobianos nos animais de produção teria inevitavelmente repercussões na saúde e bem-estar animal, na produtividade e, conseqüentemente, no preço dos alimentos. Mas é possível reduzir o consumo mantendo os níveis de produtividade, e esta deve ser uma estratégia transversal a vários setores (WHO, 2011; Woolhouse et al., 2015).

O uso inapropriado e excessivo de antibióticos raramente permite melhorar a saúde animal, podendo contribuir para o agravamento de doenças já que as bactérias comensais e protetoras, que promovem uma barreira natural do sistema de defesa contra bactérias patogênicas, são eliminadas pelos antibióticos (Magnusson *et al.*, 2019). Os animais que são adequadamente alimentados e alojados, experienciam maiores níveis de bem-estar, e estão menos sujeitos a infecções, e por isso requerem menos tratamentos com estes fármacos (Magnusson *et al.*, 2019). Manter os animais saudáveis, permitirá aumentar a produtividade e conseqüentemente o lucro dos produtores, trazendo benefícios financeiros (Magnusson *et al.*, 2019).

Considerando a possível transmissão de estirpes resistentes entre os animais de produção e o homem (Obeng *et al.*, 2012), os principais grupos de risco por contacto direto e alta exposição à colonização bacteriana, são os médicos veterinários, trabalhadores dos matadouros, trabalhadores das explorações e agricultores.

Segundo a OMS/FAO, é previsível que o volume de antibióticos utilizados em animais de produção continue a aumentar devido à crescente demanda por alimentos de origem animal, produzidos maioritariamente em regimes intensivos, para alimentar uma população humana em constante crescimento (WHO, 2020). Assim, associar boas práticas de manejo e de bem-estar animal, programas de vacinação eficazes, e medidas apertadas de biossegurança na exploração (WHO, 2015; Mahedi *et al.*, 2018), em combinação com a utilização clínica racional dos antibióticos, é a chave de uma abordagem “Uma Só Saúde” no combate e controle da RAM (Magnusson *et al.*, 2019).

Nos animais de produção por vezes não é fácil tratar individualmente com doses terapêuticas apenas os animais que manifestem clinicamente uma infecção. Ainda assim, no caso das aves, os animais saudáveis só devem receber antibióticos de forma preventiva, quando uma doença já foi diagnosticada noutros animais do mesmo bando. No caso das aves, estes fármacos são administrados muitas vezes de forma profilática em doses sub-terapêuticas a todos os animais do mesmo bando, através da ração ou da água, de modo a evitar sobretudo as infecções respiratórias ou gastrointestinais, e diminuir os prejuízos na produção, principalmente nas fases iniciais da vida dos animais (WHO, 2011). É recomendado que os animais doentes sejam avaliados de modo a determinar qual o antibiótico mais eficaz para a infecção em causa, e deve ser evitada a utilização de

antibióticos classificados como sendo de “importância crítica de máxima prioridade” (WHO, 2020).

Para diminuir o consumo abusivo de antibióticos a EFSA determinou um conjunto de medidas que devem ser adotadas de modo a prevenir as situações em que é necessário a aplicação destas substâncias (EFSA, 2020). Primeiro é necessário “Reduzir”, com a definição de objetivos adaptados a cada país para diminuir a utilização de antibióticos considerados de importância crítica, e aumentar a responsabilidade dos veterinários (que devem tomar a decisão de prescrever antimicrobianos com base em visitas regulares às explorações, fazendo exames clínicos aos animais e requisitando testes laboratoriais). Passa também por “Substituir”, ou seja, considerar outras alternativas a estas substâncias que contribuam para melhorar a saúde animal (como os pré-bióticos, probióticos e bacteriófagos) (Mehdi *et al.*, 2018), e investir na investigação de novas alternativas aos antimicrobianos. Por último é importante “Repensar” o modo de produção animal, implementando modos de produção mais sustentáveis (CE, 2017), que melhorem o bem-estar e a qualidade de vida dos animais e prevenindo o aparecimento de doenças através da vacinação e boas práticas de manejo, e através da educação dos produtores e médicos veterinários para este problema (DGS/DGAV/APA, 2019; EFSA, 2020).

Nem todos os países são afetados por este problema da mesma maneira, existindo vários fatores que são responsáveis pelas diferentes taxas de resistência nos animais, tais como: o uso dos diferentes tipos de antibióticos em medicina veterinária, as doenças subjacentes ao seu uso, a qualidade dos cuidados veterinários, taxas de imunização nos animais de produção e companhia, e fatores sociais (ECDC, 2020b).

A ESVAC (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption) emite relatórios de monitorização do consumo de antibióticos dos países da UE, sendo que o mais recente é referente às tendências no período de 2010-2018 (EMA/ESVAC, 2020). A análise desta informação sobre o consumo de antimicrobianos, principalmente na produção animal, constitui uma ferramenta essencial para realizar uma análise de risco, e delinear uma estratégia que permita conter o desenvolvimento e propagação da resistência aos antimicrobianos (DGAV, 2017).

Em Portugal, as formulações farmacêuticas mais comercializadas em 2018 foram as pré-misturas medicamentosas, e as soluções orais (EMA/ESVAC, 2020), sendo que das 191,8 toneladas de antimicrobianos constituintes de Medicamentos Veterinários utilizados em

animais de produção, a maioria eram da classe das tetraciclina (34,1%), penicilinas (18,6%), macrólidos (14,5%), e polimixinas (6,8%) (EMA/ESVAC, 2020).

8. Maneio e utilização de antibióticos na produção avícola de frangos (*Gallus gallus*)

Nas últimas décadas, o consumo de carne de frango aumentou (Roth *et al.*, 2018), e vai continuar a aumentar, num mundo onde as necessidades de alimento são cada vez maiores para satisfazer uma população mundial em crescimento, e onde a carne de frango representa uma fonte de proteína de alta qualidade e que é produzida muito rapidamente (Pesciaroli *et al.*, 2020). As agências internacionais e os consumidores têm uma preocupação cada vez maior com a transmissão de bactérias resistentes através do consumo de carne de aves e, por isso, os produtores começaram a adotar sistemas de produção alternativos baseados no baixo consumo de antibióticos, tais como as produções orgânicas, ou livres de antibióticos (Pesciaroli *et al.*, 2020).

No nosso país a produção intensiva de frangos de carne caracteriza-se por ser realizada exclusivamente em pavilhões, onde a densidade animal é elevada (no máximo 33 Kg/m²) e os animais são expostos a iluminação artificial, com ciclos de luz de 24 horas com um mínimo de período de escuridão de seis horas (Decreto-Lei nº 79/2010 de 25 de junho). Os frangos são de linhagens de crescimento rápido, e a alimentação é constituída apenas por alimentos compostos completos, que fornecem todos os nutrientes e energia necessários de acordo com a idade e fase de produção dos animais, que são abatidos aos 42 dias de idade.

Os animais de produção semi-intensiva são de raças autóctones ou linhagens rústicas de crescimento mais lento e natural, e mais resistentes às variações climáticas. Os frangos permanecem dentro de pavilhões até às 6 semanas de idade, mas com acesso a parques exteriores com vegetação, onde são expostos à luz natural. A densidade animal máxima permitida no interior dos pavilhões é menor (25 Kg/m²) (Regulamento (CE) nº 543/2008 de 16 de junho), e existe uma maior preocupação com questões ambientais e de sustentabilidade, e com o bem-estar animal. A alimentação é composta no mínimo por 70% cereais, sem recurso a aditivos ou transgénicos, que é complementada com o que “picam do solo”. O abate destas aves ocorre por volta dos 81 dias de idade.

A criação intensiva de frangos, quer nos países desenvolvidos, quer nos países em desenvolvimento, é um dos modos de produção em que se utilizam mais antibióticos, e é

a espécie, além dos suínos, em que se prevê que os números relacionados com o consumo continuem a subir nos próximos anos (Magnusson *et al.*, 2019). Os antibióticos são normalmente administrados nos frangos apenas para o tratamento de doenças, ou para prevenção por administração metafilarica (Roth *et al.*, 2018), já que a sua utilização em baixas doses como promotores de crescimento é proibida na União Europeia desde 2006 (Hao *et al.*, 2016). Estes fármacos são essenciais no tratamento de infeções intestinais, como colibaciloses, enterites necróticas e outras doenças provocadas frequentemente por *Salmonella* sp., *E. coli* ou *Clostridium* spp, que representam enormes perdas económicas para a indústria (Löhren *et al.*, 2009; Roth *et al.*, 2018). As fluoroquinolonas, macrólidos e polimixinas estão aprovadas e são utilizadas por grande parte dos países da UE (Roth *et al.*, 2018), sendo a colistina, e a enrofloxacina (análogo da ciprofloxacina utilizada em medicina humana) os mais utilizados (Magnusson *et al.*, 2019).

A colibacilose é uma doença das aves causada por *E. coli* e é caracterizada pela elevada mortalidade, alta morbilidade, redução da produtividade e rejeição de carcaças, e, portanto, o seu tratamento num bando infetado é essencial para prevenir enormes perdas económicas (Niero *et al.*, 2018). Assim, a dispersão da RAM em *E. coli* tem implicação económica e na saúde pública animal, e também na saúde pública humana devido à possível transmissão de determinantes de resistência principalmente a antibióticos de importância crítica como, as cefalosporinas de terceira e quarta geração e fluoroquinolonas, através de plasmídeos conjugativos (Niero *et al.*, 2018).

A grande disseminação de *E. coli* produtoras de ESBLs, isoladas de amostras fecais de frangos saudáveis que entram na cadeia alimentar constitui um problema de segurança alimentar, e pode estar relacionada com o uso de outros agentes antibacterianos, como as tetraciclina, sulfonamidas, e fluoroquinolonas, que podem contribuir para a co-seleção destas bactérias ESBL pela transferência de genes de resistência nos seus elementos genéticos móveis (Costa *et al.*, 2009).

Atualmente encontram-se em estudo outras alternativas aos antibióticos que possam ser aplicadas em explorações de frangos, como os probióticos (bactérias benéficas encontradas em alguns alimentos), pré-bióticos (alimentos não digeríveis que ajudam as bactérias essenciais a crescer e multiplicarem-se), enzimas, ácidos orgânicos, e produtos

de exclusão competitiva (microbiota bacteriana intestinal que limita a colonização por algumas bactérias patogênicas) (WHO, 2011; Mehdi *et al.*, 2018).

9. Controlo e prevenção da resistência antimicrobiana na Europa e em Portugal

A vigilância da RAM em bactérias zoonóticas e comensais em diferentes animais produtores de alimentos que podem ser reservatórios, e nos alimentos, é um pré-requisito para entender o desenvolvimento e disseminação da resistência aos antibióticos, fornecendo dados relevantes para realizar avaliações de risco, implementar estratégias, e avaliar o sucesso dessas intervenções (WHO, 2011).

As organizações internacionais relacionadas com Saúde Pública, como a OIE, OMS, e FAO, em conjunto, já desenvolveram medidas para combater este flagelo a nível mundial com base em análises de risco (OIE, 2016; Hao *et al.*, 2016). Por se tratar de uma crise global, estas entidades definiram esta situação como preocupante, priorizando a implementação de planos de ação nacionais e multissetoriais para combater a RAM (DGS/DGAV/APA, 2019), de acordo com o conceito de “Uma Só Saúde” (OIE, 2016).

Para conseguir avaliar os efeitos das medidas tomadas para diminuir o uso de antimicrobianos e combater a RAM, a EFSA, conjuntamente com a ECDC e a EMA estabeleceram um conjunto indicadores, entre os quais está a avaliação da proporção de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de terceira geração e, relativamente ao consumo, o volume de vendas de antimicrobianos para medicina humana e veterinária (EFSA, 2020).

E. coli é uma das bactérias mais comuns do trato digestivo humano e animal (Costa *et al.*, 2009), que pertence à família das *Enterobacteriaceae* (ECDC, 2020a). Normalmente esta bactéria sendo comensal e ubiqüitária (Roth *et al.*, 2018), não é patogênica, mas por vezes pode provocar infeções graves em humanos (Haenni *et al.*, 2014), em que o tratamento administrado com antimicrobianos pode não ser eficaz (Costa *et al.*, 2009; ECDC, 2020a). Recentemente são cada vez mais, descritas infeções por *E. coli* que são resistentes a várias classes de antibióticos em simultâneo (Costa *et al.*, 2009), nomeadamente às fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira geração (ECDC, 2020a). É uma bactéria largamente aceite como microrganismo indicador de resistência aos antibióticos em populações de bactérias de Gram negativo (Roth *et al.*, 2018), pois está presente normalmente nas fezes (Manageiro *et al.*, 2017).

Monitorizar bactérias comensais como *E. coli*, permite fazer a comparação dos efeitos da pressão seletiva em populações relevantes, e é considerado útil como sistema de alerta para detetar a emergência de estirpes com resistência em animais de produção, bem como a possibilidade da sua disseminação através dos alimentos de origem animal (Manageiro *et al.*, 2017; Roth *et al.*, 2018).

Sendo *E. coli* o principal microrganismo patogénico oportunista nos frangos e podendo potencialmente ser transmitido aos humanos, as estirpes de *E. coli* produtoras de ESBLs representam um grande risco quer para a produção de frangos, quer para a saúde humana (Olsen *et al.*, 2014).

No que diz respeito à segurança alimentar, os legisladores necessitam de garantir a proteção dos consumidores, e estabelecer medidas de controlo de modo a diminuir os riscos (EFSA, 2020). Para isso, os cientistas e os avaliadores de risco devem investigar os fatores que contribuem para a RAM, ao longo da cadeia alimentar, de modo a fornecer dados científicos que sustentem as decisões políticas (EFSA, 2020). Apesar de se saber da sua importância, ainda não existe uma avaliação e uma abordagem suficientemente standartizada da utilização, e da resistência aos antibióticos nos diferentes programas de monitorização, pois não existe uma metodologia padronizada, o que torna a comparação entre alguns países e regiões muito difícil (Roth *et al.*, 2018).

É necessária uma abordagem integrada que tenha em conta os sistemas de produção animal locais, e envolva todos os intervenientes, desde os governantes até aos agricultores e consumidores (EFSA, 2020). Os dados dos programas de vigilância europeus de resistência aos antimicrobianos, mostram que os países escandinavos possuem baixas taxas de resistência, ao contrário dos países do Sul, existindo assim um gradiente crescente de Norte para Sul (ECDC, 2020a). Os países que registaram menores níveis de resistência correspondem também aos que têm uma menor utilização de antibióticos, e os que têm um maior consumo de antibióticos registaram níveis de resistência mais elevados (ECDC, 2020a).

Em Portugal, a resistência aos antibióticos é monitorizada desde 2008 nas bactérias do género *Campylobacter* e *Salmonella*, no âmbito do Plano Nacional de controlo de *Salmonella* e do Plano de Inspeção Geral dos Géneros Alimentícios. A Decisão 2013/652/EU, determina também a obrigatoriedade da vigilância em bactérias zoonóticas, como é o caso de *Salmonella* spp. e *Campylobacter jejuni*, de bactérias

comensais indicadoras como *E. coli*, e ainda de bactérias resistentes às cefalosporinas de terceira geração (principalmente *E. coli* produtoras de β -lactamases de espectro alargado). Esta Decisão preconiza ainda que esta vigilância ativa ocorra em amostras biológicas colhidas de animais ao abate (cecos de bovinos, suínos, frangos e perus), e de alimentos colhidos no retalho (carne de bovino, suíno e frango), no período entre 2014 e 2020 (CE, 2013).

É a DGAV (Direção Geral de Alimentação e Veterinária) que desenvolve e põe em ação o Plano de Vigilância aos Antimicrobianos em colaboração com o INIAV (Instituto Nacional de Alimentação e Veterinária) de modo a avaliar o risco de transmissão de bactérias resistentes entre os animais da cadeia alimentar e o homem, bem como a possibilidade de estes serem reservatórios destas estirpes (INIAV, 2020).

Ao abordar esta temática da resistência antimicrobiana, é imperativo recorrer ao conceito de “Uma Só Saúde”, ou seja, entender que a saúde humana, saúde animal e o ambiente estão interligados, a nível local, nacional e global (Lammie & Hughes, 2016; Magnusson *et al.*, 2019). As organizações internacionais necessitam de continuar a cooperar criando equipas multidisciplinares, para estabelecer programas de vigilância e monitorização eficazes, e detetar tendências em humanos e animais (Lammie & Hughes, 2016). De forma a encontrar estratégias inteligentes de controlo, é necessário ter em conta a utilização dos antibióticos nas várias áreas da medicina humana, medicina veterinária, na agricultura (EFSA, 2020), o seu impacto no ambiente, e continuar a investigar as bases moleculares envolvidas na emergência da resistência RAM (Hao *et al.*, 2016).

Uma abordagem “Uma Só Saúde” (Figura 5) permite aumentar a confiança, a transparência, a comunicação, e a colaboração entre os profissionais de saúde humana, animal e do ambiente, e partilhar conhecimentos sobre os programas de controlo da RAM (Lammie & Hughes, 2016).

Mais recentemente com o desenvolvimento das tecnologias genómicas e de sequenciação de nova geração, a capacidade de gerar informação sobre a sequência de nucleótidos de um genoma aumentou muito rapidamente e de forma mais económica (Angers *et al.*, 2017), o que associado aos sistemas de informação bioinformática apropriados permite identificar o resistoma, viroloma e plasmidoma dos microrganismos, permitindo uma caracterização genotípica completa (Bergšpica *et al.*, 2020).

Assim, a capacidade de prever o potencial genotípico de uma bactéria através da sequenciação do seu genoma e dos plasmídeos, é importante não só na previsão e combate à disseminação da RAM, como o aparecimento de prováveis surtos (Angers *et al.*, 2017). Ao contrário dos métodos fenotípicos que fornecem informação apenas sobre se as estirpes são suscetíveis ou resistentes a antibióticos selecionados, a sequenciação completa do genoma revela as bases moleculares dessa resistência. Esta informação pode ser útil nos planos de monitorização, auxiliando na compreensão dos eventos responsáveis pela aquisição de resistência, possuindo assim mais vantagens comparando com técnicas mais clássicas como a da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Angers *et al.*, 2017; Bergšpica *et al.*, 2020).

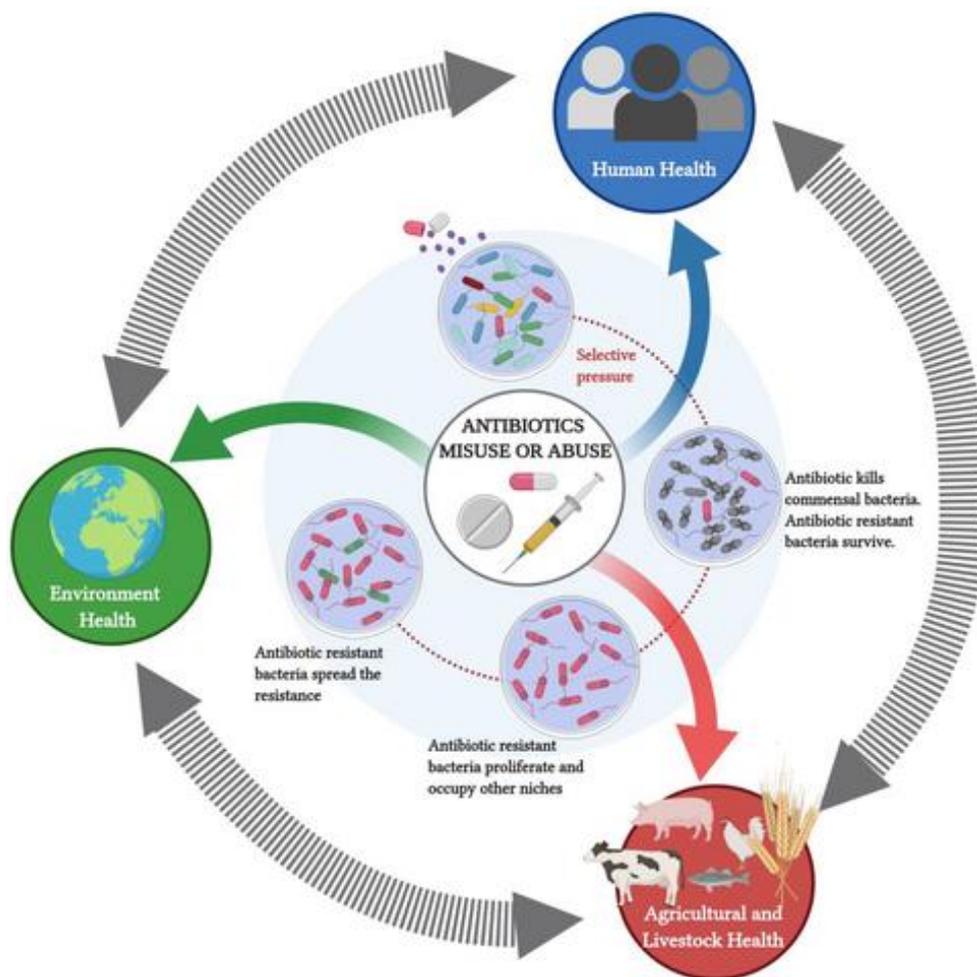


Figura 5 - Importância de uma abordagem Uma Só Saúde na temática da RAM (Retirada de Udaondo & Huertas, 2020)

Capítulo II- Objetivos

Os objetivos principais deste estudo passaram por:

- Caracterizar fenotipicamente e comparar os perfis de suscetibilidade de estirpes de *E. coli* isoladas de frangos criados em sistemas de avicultura semi-intensivos e intensivos, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e recorrendo a vários parâmetros como a CIM₅₀, CIM₉₀ e perfis de multirresistência;
- Caracterizar do ponto de vista molecular os mecanismos de resistência adquirida aos antibióticos β -lactâmicos por mPCR, com pesquisa de genes codificadores de resistência *bla* e identificação da variante do gene por sequenciação de Sanger;
- Identificar os mecanismos de resistência adquirida à colistina pela deteção dos genes *mcr* por mPCR;
- Detetar elementos genéticos móveis (EGMs), nomeadamente integrões das classes I, II, e III por mPCR
- Caracterizar genomicamente três estirpes de *E. coli* multirresistentes através da Sequenciação Completa do Genoma (WGS), e analisar os determinantes de resistência, serotipo, e os elementos genéticos móveis, entre os quais os plasmídeos, recorrendo a ferramentas de bioinformática.

Capítulo III – Material e métodos

1. Amostras biológicas e estirpes bacterianas

Este estudo foi realizado em estirpes de *E. coli* comensal e estirpes de *E. coli* presumíveis produtoras de ESBL e/ou AmpC, isoladas de cecos de frangos de carne ao abate, obtidas no âmbito do Programa de Vigilância da Resistência Antimicrobiana em Agentes Zoonóticos e Comensais (PVRAM), de acordo com a DC 2013/652EU, selecionadas de forma aleatória segundo as indicações da DGAV.

As amostras foram recolhidas pelos médicos veterinários inspetores sanitários em matadouros que abatem aves de explorações intensivas (frangos industriais) e aves de explorações semi-intensivas (frangos do campo), na região da Beira Interior, entre os meses de outubro e dezembro nos anos de 2014, 2018 e 2020. No que respeita aos frangos, cada amostra composta é constituída por cinco cecos de cinco animais selecionados aleatoriamente de cada bando (unidade epidemiológica), processados em conjunto. Tratou-se de um estudo epidemiológico, em que no total foram analisadas 193 estirpes, sendo 112 isoladas de animais de produção intensiva e 81 de animais de produção semi-intensiva (Figura 6).

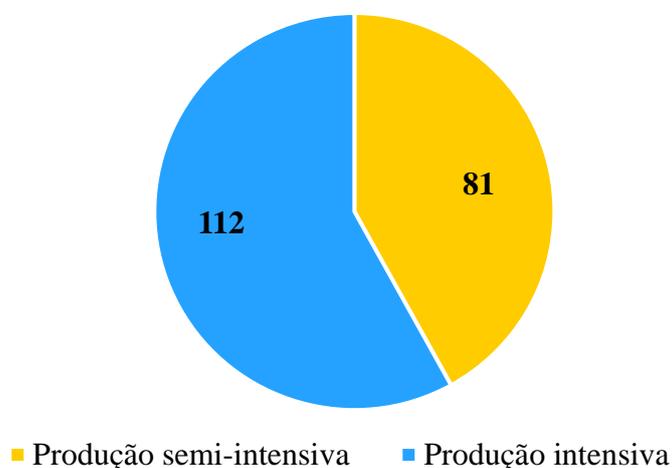


Figura 6- Número de isolados por tipo de produção

Após serem recolhidas, as amostras foram enviadas refrigeradas para o Laboratório de Bacteriologia e Micologia do INIAV, onde foram processadas seguindo os protocolos do Laboratório de Referência Europeu para a Resistência Antimicrobiana (EURL-AR, DTU – National Food Institute).

O procedimento para isolamento de *E. coli* produtoras de ESBL e/ ou AmpC descreve-se de forma resumida de seguida: i) primeiro procedeu-se à abertura asséptica da embalagem, e recolheu-se o conteúdo dos cecos para um frasco com o auxílio de pinças e tesouras esterilizadas. Pesou-se $1\text{g} \pm 0,1\text{g}$ de conteúdo cecal de cada amostra e colocou-se num tubo estéril com 9 mL de água peptonada (pré-enriquecimento), seguindo-se a incubação a 37°C durante 18-22h em atmosfera aeróbica. No dia seguinte procedeu-se à inoculação em meio de cultura seletivo de Agar MacConkey (MAC) suplementado com cefotaxima (1mg/L). Após incubação a 44°C por 18-24h em atmosfera aeróbica, observaram-se as placas, e as colónias lactofermentadoras ou fermentadoras tardias foram selecionadas e inoculadas no meio *Triple Sugar Iron Agar* (TSI). Após o período de incubação de 18-24h a 37°C, observou-se o tipo de crescimento e reação no meio, a qual se caracteriza em *E. coli* por produção de gás, cor amarela ao longo de todo o tubo e na rampa, e ausência da produção de H₂S. Posteriormente realizou-se a confirmação bioquímica no meio cromogénico ColiD (bioMérieux), que permite identificar as colónias de *E. coli*, que crescem com uma coloração púrpura por produzirem β-glucoronidase. Nos casos em que não foi possível confirmar *E. coli*, recorreu-se à identificação por API 32E. Após confirmação, as colónias de *E. coli* foram repicadas meio Triptose Soja Agar (TSA) e posteriormente transferidas para meio de conservação (Tryptose Soya Broth) com 15% de glicerol (um crioprotetor) e preservadas a -80°C.

Para o isolamento das estirpes de *E. coli* comensal, o procedimento é idêntico ao descrito à exceção do primeiro passo de pré-enriquecimento e inoculação em meio seletivo, sendo inoculadas diretamente em meio MAC sem inibidores.

É importante referir que, segundo a Decisão da Comissão 2013/652/EU de 12 de Novembro de 2013, no ano de 2014, a vigilância de *E. coli* produtora de ESBL e AmpC não era obrigatória, e por isso o INIAV não realizou a pesquisa de *E. coli* ESBL/AmpC em meio selectivo pelo que todas as estirpes utilizadas neste trabalho referentes ao ano de 2014 são comensais (Figura 7 e Figura 8).

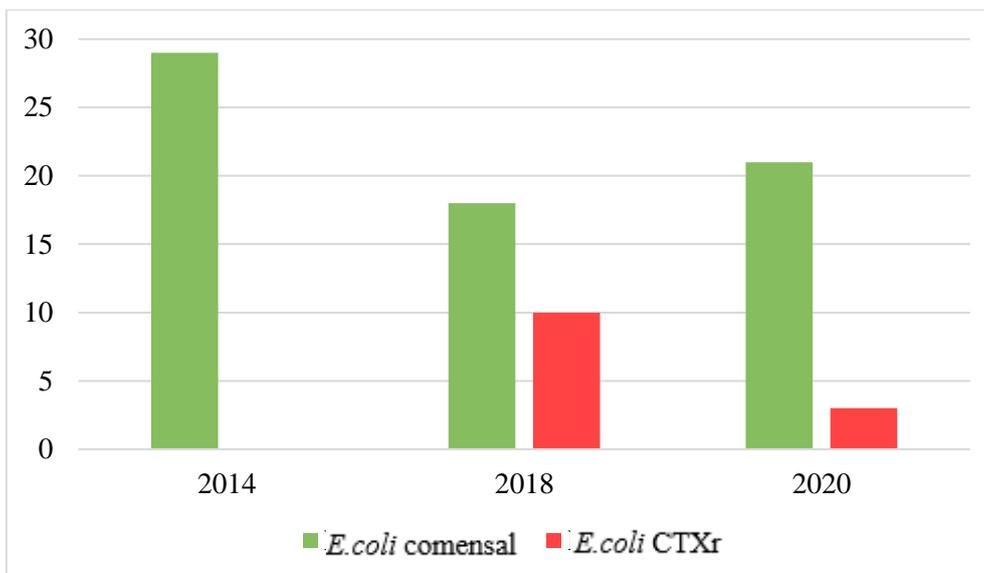


Figura 7 - Número de isolados de *E. coli* comensal e CTXr (presumíveis produtoras de enzimas ESBL e/ou AmpC) de frango do campo estudados nos anos 2014, 2018 e 2020

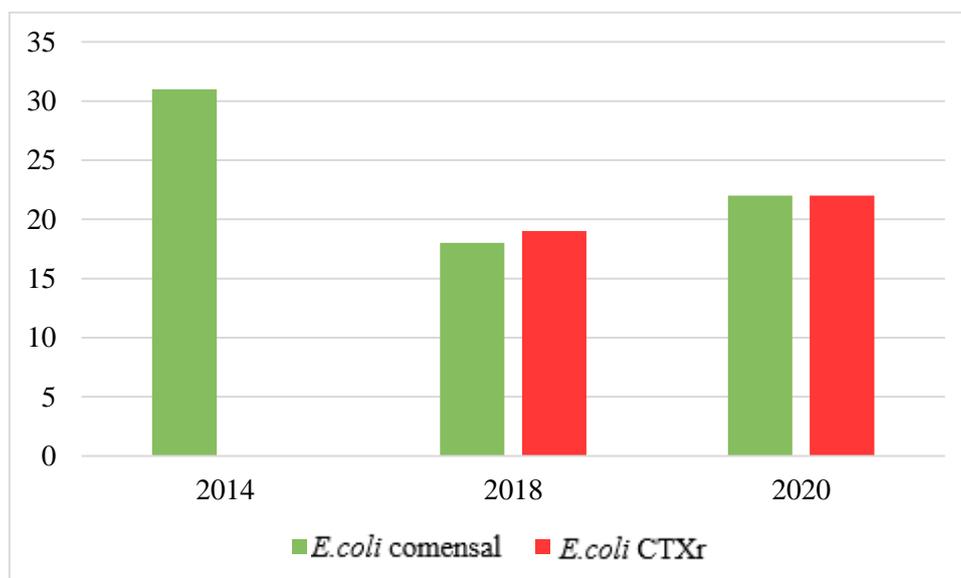


Figura 8- Número de isolados de *E. coli* comensal e CTXr (presumíveis produtoras de enzimas ESBL e/ou AmpC) de frango industrial estudados nos anos 2014, 2018 e 2020

2. Determinação da susceptibilidade antimicrobiana pela técnica da microdiluição

As estirpes de *E. coli* foram ensaiadas para avaliar a sua suscetibilidade aos antibióticos através da técnica da microdiluição em microplacas comerciais EUVSEC (Sensititre®, Trek Diagnostic Systems, UK) (Figura 9), pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cada antibiótico, ou seja, a mais baixa concentração capaz de inibir a multiplicação das bactérias. As estirpes que cresceram no meio seletivo suplementado com cefotaxima, e as estirpes comensais que demonstraram possuir resistência às

cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima e/ou ceftazidima), foram ensaiadas também na microplaca EUVSEC2 (Sensititre®, Trek Diagnostic Systems, UK) (Figura 10), que inclui antibióticos como a cefoxitina e cefepime, e permite avaliar se existe sinergia da cefotaxima e ceftazidima com o ácido clavulânico para poder determinar os fenótipos presumíveis de ESBL e AmpC. Esta é uma técnica harmonizada e padronizada na qual são utilizadas microplacas de 96 poços, revestidas por antibióticos liofilizados, em concentrações seriadas de base 2, aos quais se adicionam 50µL de caldo Mueller-Hinton with TES, (Thermo Scientific™), inoculado com a estirpe bacteriana a ser estudada.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SMX 1024	TMP 32	CIP 8	TET 64	MERO 16	AZI 64	NAL 128	CHL 128	TGC 8	COL 16	AMP 64	GEN 32
B	SMX 512	TMP 16	CIP 4	TET 32	MERO 8	AZI 32	NAL 64	CHL 64	TGC 4	COL 8	AMP 32	GEN 16
C	SMX 256	TMP 8	CIP 2	TET 16	MERO 4	AZI 16	NAL 32	CHL 32	TGC 2	COL 4	AMP 16	GEN 8
D	SMX 128	TMP 4	CIP 1	TET 8	MERO 2	AZI 8	NAL 16	CHL 16	TGC 1	COL 2	AMP 8	GEN 4
E	SMX 64	TMP 2	CIP 0.5	TET 4	MERO 1	AZI 4	NAL 8	CHL 8	TGC 0.5	COL 1	AMP 4	GEN 2
F	SMX 32	TMP 1	CIP 0.25	TET 2	MERO 0.5	AZI 2	NAL 4	FOT 1	TGC 0.25	TAZ 2	AMP 2	GEN 1
G	SMX 16	TMP 0.5	CIP 0.12	CIP 0.03	MERO 0.25	MERO 0.06	FOT 4	FOT 0.5	TAZ 8	TAZ 1	AMP 1	GEN 0.5
H	SMX 8	TMP 0.25	CIP 0.06	CIP 0.015	MERO 0.12	MERO 0.03	FOT 2	FOT 0.25	TAZ 4	TAZ 0.5	POS	POS

Figura 9- Distribuição e concentrações dos antibióticos na microplaca EUVSEC (Retirada de <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/brochures/Sensititre-Plate-Guide-Booklet-EN.pdf>)

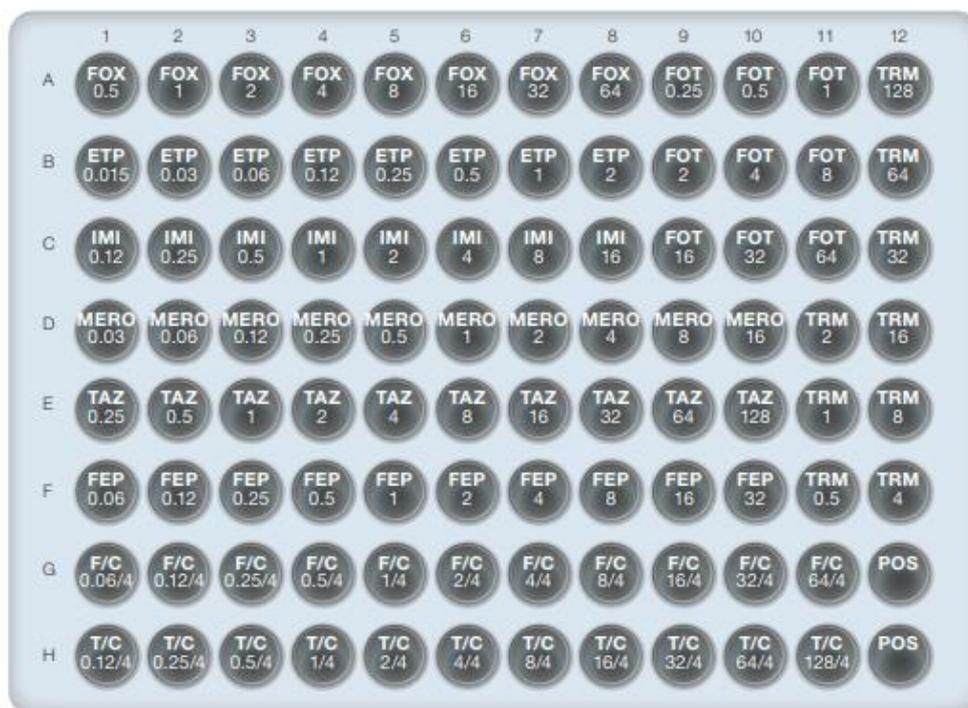


Figura 10- Distribuição e concentrações dos antibióticos na microplaca EUVSEC2 (Retirada de <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/brochures/Sensititre-Plate-Guide-Booklet-EN.pdf>)

O procedimento foi realizado da seguinte forma:

1. Inoculação das estirpes, anteriormente armazenadas a -80°C , em placas de Agar Mueller-Hinton (MHA) e incubação a 37°C durante 18-24h;
2. Transferência de duas ou três colônias para uma ampola com soluto fisiológico esterilizado de modo a preparar a suspensão bacteriana;
3. Ajuste da densidade ótica da suspensão a 0,5 ($\approx 10^8$ unidades formadoras de colônias/mL), na escala de MacFarland, recorrendo a um densitômetro (Densimat, BioMérieux, França);
4. Inoculação de $50\ \mu\text{L}$ da suspensão num tubo de caldo Mueller-Hinton com catiões ajustados (MHC with TES, Thermo Scientific™), e homogeneização no vortex;
5. Distribuição de $50\ \mu\text{L}$ do inóculo em cada poço da microplaca (EUVSEC e ou EUVSEC2) através de um dispensador automático (Sensititre AIM™, ThermoFisher Scientific), seguido de selagem das microplacas com película adesiva;
6. Realização do controlo de pureza de cada estirpe em placas de MHA;
7. Incubação das microplacas e das placas de MHA a 37°C durante 18-24h em atmosfera aeróbica.

Após incubação, realizou-se a leitura das microplacas com o auxílio de um leitor semi-automático (Sensititre Vizion™, ThermoFisher Scientific), de forma a determinar a CIM. A interpretação dos resultados obtidos fez-se seguindo os critérios epidemiológicos (ECOFFs) determinados pelo EUCAST (EUCAST, 2020). As estirpes são classificadas em:

- **Suscetível:** se o valor da CIM for inferior ou igual ao valor de ECOFF estabelecido pelo EUCAST;
- **Resistente:** se o valor da CIM for superior ao valor de ECOFF estabelecido pelo EUCAST.

Com os resultados obtidos na microplaca EUVSEC2, foi possível classificar fenotipicamente o tipo de β -lactamases, como sendo do tipo ESBL, AmpC e/ou Carbapenemases com base nos critérios da EFSA e EURL-AR (Tabela 1) (EFSA/ECDC, 2021).

Tabela 1 - Critérios de atribuição de fenótipo ESBL, AmpC e Carbapenemase.

<p>Fenótipo ESBL</p> <ul style="list-style-type: none"> - CIM da FOT ou TAZ > 1mg/L e - CIM do MERO \leq 0,12 mg/L e - CIM da FOX \leq 8 mg/L e -Existência de *sinergia: FOT/C e/ou TAZ/C 	<p>Fenótipo AmpC</p> <ul style="list-style-type: none"> - CIM da FOT ou TAZ > 1mg/L e - CIM do MERO \leq 0,12 mg/L e - CIM da FOX > 8 mg/L e - Ausência de *sinergia: FOT/C e/ou TAZ/C (não excluir a presença de ESBL)
<p>Fenótipo ESBL + AmpC</p> <ul style="list-style-type: none"> - CIM da FOT ou TAZ > 1mg/L e - CIM do MERO \leq 0,12 mg/L e - CIM da FOX > 8 mg/L e -Existência de *sinergia: FOT/C e/ou TAZ/C 	<p>Fenótipo Carbapenemase</p> <ul style="list-style-type: none"> - CIM do MERO > 0,12 mg/L e (não excluir a presença de ESBL e/ou AmpC)

FOT= Cefotaxima; TAZ= Ceftazidima; FOX=Cefoxitina; MERO= Meropenemo; C=ácido clavulânico;
 *Considera-se que existe sinergia quando a diferença entre as CIM da FOT e/ou da TAZ e as CIM das combinações destas com o ácido clavulânico (FOT/C e TAZ/C) é igual ou superior a 3 diluições de base 2.

3. Extração de ADN e quantificação

Para a realização das técnicas de PCR, procedeu-se à extração de ADN, a qual foi feita por fervura, de acordo com o seguinte procedimento:

1. Lavagem de uma ou duas colónias de cada estirpe em 750 µL de H₂O esterilizada num microtubo de 1,5 mL;
2. Centrifugação a 10000 rpm durante 5 minutos;
3. Resuspensão do sedimento em 100 µL de Tampão Tris-EDTA (TE);
4. Fervura num bloco seco de aquecimento a 98°C durante 10 minutos;
5. Centrifugação a 13000 rpm durante 5 minutos;
6. Transferência do sobrenadante contendo as moléculas de ADN para novo microtubo;
7. Conservação a -20°C.

Para a sequenciação completa do genoma (WGS), a extração de ADN foi feita através do kit *Pure Genomic DNA* (Invitrogen), seguindo o protocolo da lise celular de bactérias de Gram Negativo, de acordo com as instruções do fabricante. O período de incubação foi de 90 minutos a 55°C e o ADN foi eluído com 50 ml de tampão Tris-HCl de pH 8,5. A sequenciação do ADN foi realizada pela Novogene (Reino Unido), utilizando a técnica de sequenciação *Illumina HiSeq* (modo de sequenciação NovaSeq 6000 S2 PE150 XP).

Para avaliar a quantidade e a qualidade de ADN extraído nos dois métodos, foi utilizado um espectrofotómetro (NanoDrop® 2000 Thermo Scientific Alfacene) que permite medir a absorvância a 260, 280 e 230 nm para determinação da concentração de ADN e dos rácios 260/280 e 260/230 e analisar a pureza do ADN extraído.

4. Identificação de determinantes de resistência por reação de polimerase em cadeia (PCR)

4.1- Detecção dos genes *bla*

Para a caracterização molecular dos mecanismos de resistência aos β-lactâmicos, procedeu-se à realização de ensaios de reação de polimerase em cadeia na variante multiplex (mPCR) para a pesquisa dos genes *bla*_{CTX-M-Grupo} (*bla*_{CTX-M-Grupo1}, *bla*_{CTX-M-Grupo2}, *bla*_{CTX-M-Grupo9} e *bla*_{CTX-M-Grupo8/25}), *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} e *bla*_{PMAβ} (*bla*_{ACC}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX}, *bla*_{DHA}, *bla*_{CIT}, e *bla*_{EBC}). Foram ensaiados os isolados de *E. coli* de frangos do campo (n=17) e de frangos de produção industrial (n=42), que evidenciaram ser fenotipicamente resistentes a estes antibióticos, ou seja, que apresentavam um perfil ESBL e/ou AmpC.

Os *primers* e condições de amplificação utilizadas foram os descritos por Dallenne *et al.* 2010. A mistura de reação foi preparada para um volume final de 25 µl (Tabela

suplementar 1 do Anexo) contendo: H₂O estéril, tampão de reação 1x (Nzytech, Portugal), 2,5 mM de MgCl₂ (Nzytech), 0,4 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Nzytech), *Taq* ADN Polimerase (Nzytech) a 1U e 1-2µl de ADN.

As reações de amplificação processaram-se num termociclador (Biometra Tone, Analytik Jena), encontrando-se a descrição de cada programa e as sequências nucleotídicas na Tabela suplementar 1 do Anexo. Como controlos positivos para as reações de amplificação foram utilizados ADN de estirpes da coleção do Laboratório de Bacteriologia e Micologia do INIAV, e como controlo negativo foi utilizada H₂O estéril.

4.2 Detecção dos genes *mcr*

Para a deteção dos genes que codificam o mecanismo de resistência à colistina mediado por plasmídeos procedeu-se à realização de ensaios de reação de polimerase em cadeia na variante multiplex (mPCR) para a pesquisa dos genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* de acordo com o descrito por Rebelo *et al.*, 2018. A mistura de reação foi preparada para um volume de 25 µl (Tabela suplementar 1 do Anexo) com: H₂O estéril, tampão de reação 1x (Nzytech, Portugal), 2,0 mM MgCl₂ (Nzytech), 0,4 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Nzytech), mistura de *primers forward* e *reverse* na concentração indicada na Tabela suplementar 1 do Anexo, 1 U de *Taq* ADN Polimerase (Nzytech) e 2µl de ADN de cada isolado.

As reações de amplificação processaram-se num termociclador (Biometra Tone, Analytik Jena), e o perfil térmico e as sequências nucleotídicas encontram-se descritas na Tabela suplementar 1 do Anexo. Como controlos positivos para as reações de amplificação foram utilizados isolados fornecidos pelo Laboratório Comunitário de Referência aos Antibióticos (DTU, National Food Institute, Dinamarca), e como controlo negativo foi utilizada H₂O estéril.

4.3 Detecção dos integrões da classe I, classe II e classe III

A presença de genes que codificam as integrases *Int1*, *Int2* e *Int3* foi avaliada nos isolados dos dois sistemas de produção (n=193) utilizando os *primers* descritos por Kargar *et al.* (2014) e Machado *et al.* (2005). A mistura de reação foi preparada num volume de 25 µl contendo: H₂O estéril, tampão de reação 1x (Nzytech, Portugal), 2,0 mM MgCl₂ (Nzytech), 400 µM a dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Nzytech), 1U/25µl de *Taq* ADN Polimerase (Nzytech) 0,4µM de cada *primer forward* e *reverse*, e 1-2µl de ADN de cada isolado.

Em todas as reações de amplificação foram usados controlos positivos e como controlo negativo foi utilizada H₂O estéril. As sequências nucleotídicas dos *primers* e as condições de amplificação encontram-se descritas na Tabela suplementar 1 do Anexo.

4.4 Eletroforese dos produtos amplificados

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose de concentração variável, consoante o tamanho dos fragmentos, em tampão de Tris-Borato-EDTA (TBE), tal como descrito na Tabela suplementar 2 do Anexo. Como intercalador molecular utilizou-se RedSafe (iNtRON[®] Biotechnology) e como marcador de pesos moleculares utilizou-se ADN de 100 pares de bases (HyperLadder[™] 100bp Bioline) em cada corrida. Os produtos foram depois visualizados e fotografados num transiluminador ultravioleta (BioDoc-It Imaging System, BioRad).

5. Identificação de variantes dos genes *bla* por sequenciação de Sanger

Para determinar as variantes dos genes *bla* e as mutações no gene *AmpC* cromossómico foi realizada a sequenciação de Sanger dos produtos amplificados por PCR.

Na reação de preparação para a sequenciação foi utilizada uma polimerase com atividade *proofreading* que aumenta a precisão de síntese de ADN. A mistura de reação foi preparada para 25 µl, contendo H₂O estéril, 12,5 µl de *NZYProof 2x Colourless Master Mix*, (Nzytech, Portugal) *primers forward* e *reverse* específicos (Tabela suplementar 3 do Anexo), e 1-2µl de ADN. Para cada reação de amplificação foi utilizada H₂O estéril como controlo negativo.

As reações de amplificação processaram-se num termociclador (Biometra Tone, Analytik Jena), e um programa de amplificação específico para o protocolo com a *NZYProof 2x Colourless Master Mix* que se encontra descrito na Tabela suplementar 3 do Anexo.

Para a avaliar a qualidade e concentração dos fragmentos de ADN, os produtos de PCR para sequenciação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE. Como intercalador molecular utilizou-se 1 µl de RedSafe (Nzytech, Portugal) por cada 100 mL de TBE, e como marcador de pesos moleculares utilizou-se 5 µl da ADN *Hyperladder* de 100 pares de bases (bp) (Bioline). Adicionou-se 5 µl de cada produto de PCR com 1 µl de tampão *Loading Dye* (Bioline), e cada corrida ocorreu a 140 volts durante 45 minutos.

Os produtos amplificados foram purificados com ExoSAP-IT™ (Applied Biosystems™), num total de 16 µl de volume de reação para sequenciação com os *primers forward* e *reverse*, de acordo com as indicações do fabricante. A incubação ocorreu num termociclador Biometra Tone, (Analytik Jena, Germany) a 37°C durante 30 minutos, de forma a degradar os resíduos de nucleótidos e *primers*, seguindo-se a inativação da ExoSAP-IT a 80°C durante 15 minutos.

Para analisar os produtos amplificados em que era necessário confirmar a qualidade dos fragmentos de ADN realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE, juntando 5 µl dos produtos amplificados com 1 µl de tampão *Loading Dye* (Bioline), e 5 µl do marcador de peso molecular de 100 bp (Bioline).

Os produtos de PCR purificados foram então dispensados numa placa de 96 poços, adicionando 5 µl de cada produto amplificado a 5 µl de *primer forward* ou *reverse* específicos, e posteriormente enviados para *Eurofins Genomics*, Germany GmbH, de modo a proceder à sequenciação para identificação das variantes dos genes *bla*.

As sequências de ADN obtidas foram lidas no ChromasPro™ v2.1.8.0 (Technelysium Pty Ltd) e analisadas no Nucleotide BLAST e Protein BLAST do NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) (NCBI, 2021), no blastn do CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (CARD, 2021), e na ferramenta *ResFinder* 4.1 do CGE (Center for Genomic Epidemiology) (CGE, 2021), de forma a identificar as variantes.

6. Sequenciação do Genoma Completo (WGS) de três isolados

Selecionaram-se dois isolados de *E. coli* de frango do campo multirresistentes que apresentavam resistência fenotípica aos CIA (cefalosporinas de terceira geração, macrólidos e fluoroquinolonas), e um isolado de frango de produção industrial com resistência à colistina, para a realização da Sequenciação Completa do Genoma (WGS). Os resultados foram analisados recorrendo a ferramentas de bioinformática disponibilizadas pelo Centro de Epidemiologia Genómica (CGE, DTU, Denmark), nomeadamente: *KmerFinder* 3.2, para identificar a espécie bacteriana (Hasman *et al.*, 2014), MLST 2.0, para a determinação do *Multilocus Sequence Type* (Larsen *et al.*, 2012), *PlasmidFinder* 2.1, para identificação dos plasmídeos (Carattoli *et al.*, 2014), *ResFinder* 4.1, para identificação dos genes de resistência a antibióticos (Bortolaia *et al.*, 2020), e *SerotypeFinder* 2.0, para identificação do serotipo (Joensen *et al.*, 2015). Adicionalmente, o filogruppo foi identificado através da ferramenta *ClermonTyping* (Beghain *et al.*, 2018).

7. Análise estatística

Para avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre a produção intensiva e a produção semi-intensiva no que diz respeito às frequências de resistência aos antibióticos, utilizou-se o teste do Qui-Quadrado (χ^2), recorrendo ao programa *Rstudio* 1.4.

Capítulo IV - Resultados e discussão

1. Caracterização fenotípica da resistência antimicrobiana

1.1 Parâmetros de resistência aos antibióticos

Os valores referentes à frequência de suscetibilidade reduzida (SR), CIM₅₀ e CIM₉₀ de estirpes de *E. coli* comensais e presumíveis produtoras de ESBLs e/ou AmpC (CTXr) isoladas de frangos de carne, encontram-se descritos na Tabela 2. Os resultados mostram que as populações bacterianas presentes nos dois tipos de produção, intensiva e semi-intensiva, apresentam níveis elevados de resistência à ampicilina, quinolonas e fluoroquinolonas, tetraciclinas, sulfametoxazole e trimetoprim. Pelo contrário, a frequência de estirpes com suscetibilidade reduzida para a gentamicina e colistina é baixa, não se tendo registado estirpes resistentes à tigeciclina e carbapenemos (Figura 11 e Figura 12).

Em geral, os valores das frequências de susceptibilidade reduzida (SR), nos isolados comensais de frangos industriais, para os vários antibióticos testados, como a ampicilina (69%), cefotaxima e ceftazidima (1,4%), ácido nalidixico (85,9%), tetraciclinas (56,3%), sulfametoxazole (50,7%) e trimetoprim (46,5%) estão de acordo com outro estudo efectuado em aves em Portugal (Manageiro *et al.*, 2017) com excepção do valor da ciprofloxacina (81,7%) que é superior.

Nas estirpes de *E. coli* comensais de frangos do campo observam-se valores de SR elevados para alguns antibióticos como a ampicilina (64,7%), ácido nalidixico (69,1%), ciprofloxacina (73,5%), tetraciclinas (50%), e moderados para o sulfametoxazole (36,8%) e trimetoprim (27,9%). Para a cefotaxima e ceftazidima (5,9%), azitromicina (1,5%) e cloranfenicol (4,4%), os valores de SR observados são muito baixos, não tendo sido registado nenhum isolado com resistência à colistina (Figura 11). No que respeita à resistência antimicrobiana em aves de sistemas semi-intensivos, os estudos são muito escassos. Ainda assim, os resultados obtidos neste estudo no geral estão de acordo com um outro estudo que avalia a RAM em explorações de frangos de carne não convencionais em Itália (Pesciarolli *et al.*, 2020), à excepção dos valores das quinolonas e fluoroquinolonas que são superiores.

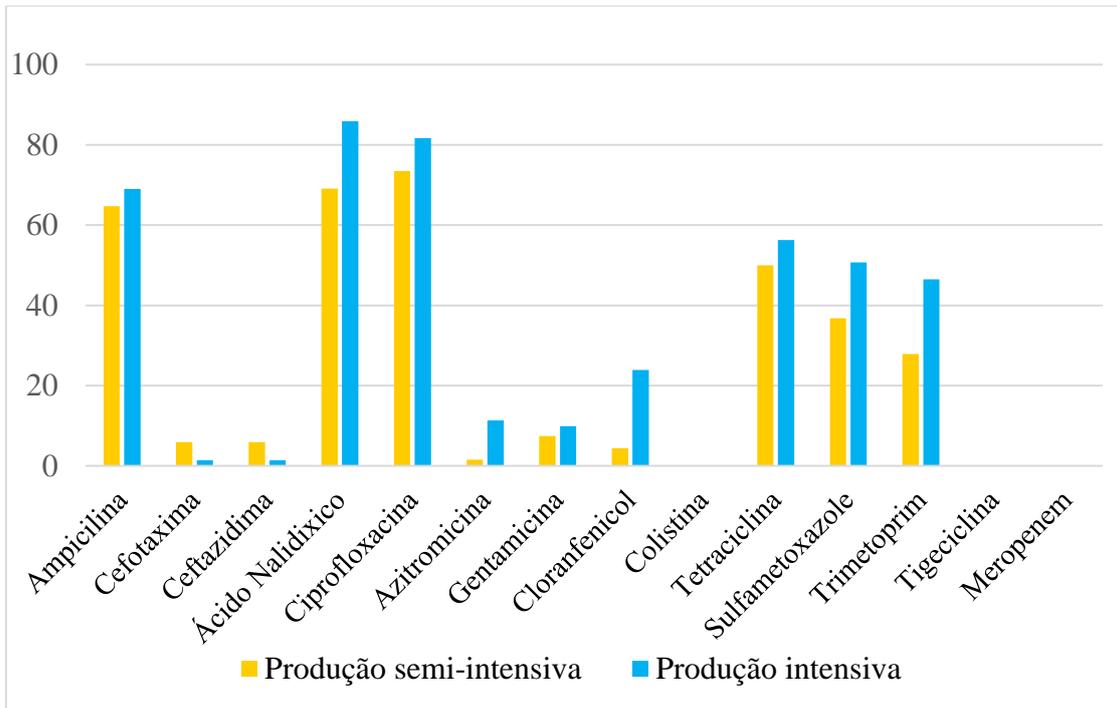


Figura 11-Frequência de estirpes de *E. coli* comensais com suscetibilidade reduzida aos antibióticos

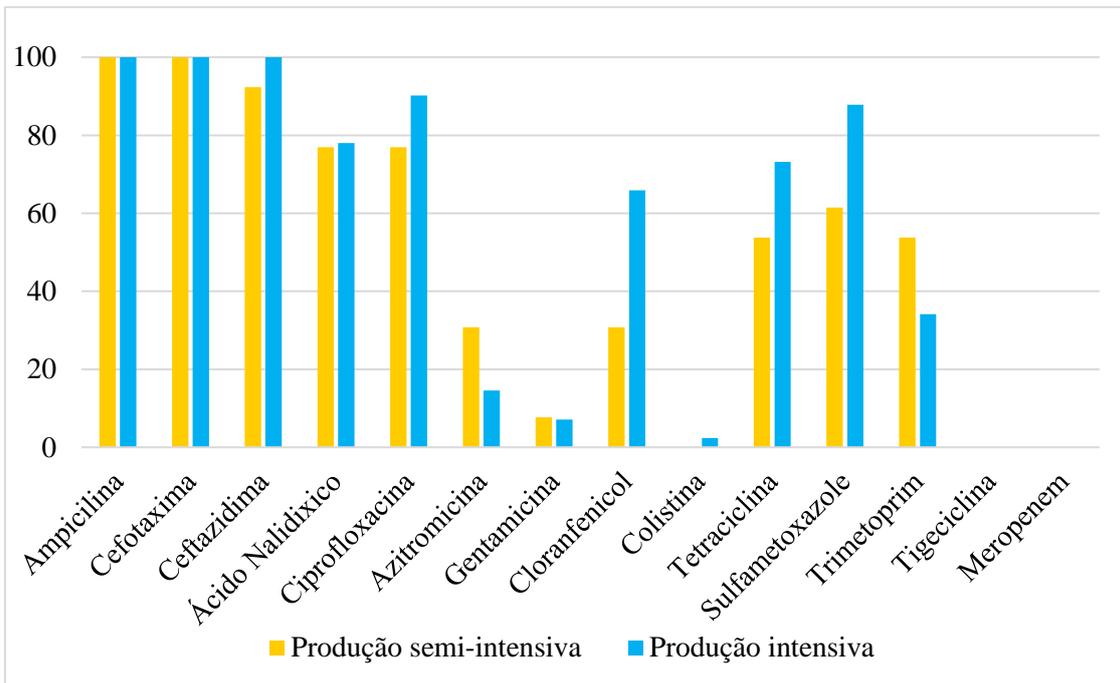


Figura 12- Frequência de estirpes de *E. coli* CTXr (presumíveis produtoras de enzimas ESBL e/ou AmpC) com suscetibilidade reduzida aos antibióticos

Tabela 2- Valores de CIM₅₀ (mg/L) e CIM₉₀ (mg/L) e a frequência de suscetibilidade reduzida (%SR) de *E. coli* comensais e *E. coli* presumíveis produtoras de enzimas ESBL e/ou AmpC (CTXr) em isolados de *E. coli* de frangos de produção intensiva (frangos industriais) e semi-intensiva (frangos do campo).

Antibiótico	Frangos do campo (n=81)		Frango industriais (n= 112)		ECOFF (mg/L)
	Comensais (n=68)	CTXr (n= 13)	Comensais (n=71)	CTXr (n= 41)	
Ampicilina					
CIM ₅₀	>64	>64	>64	>64	8
CIM ₉₀	>64	>64	>64	>64	
%SR	64,7	100	69	100	
Cefotaxima					
CIM ₅₀	≤ 0,25	16	≤ 0,25	16	0,25
CIM ₉₀	≤ 0,25	64	≤ 0,25	>64	
%SR	5,9	100	1,4	100	
Ceftazidima					
CIM ₅₀	≤ 0,5	4	≤ 0,5	16	0,5
CIM ₉₀	≤ 0,5	32	≤ 0,5	32	
%SR	5,9	92,3	1,4	100	
Cefoxitina					
CIM ₅₀	*	8	*	8	8
CIM ₉₀	*	32	*	16	
%SR	0	23,1	0	22	
Cefepime					
CIM ₅₀	*	1	*	1	0,125
CIM ₉₀	*	32	*	>32	
%SR	5,9	76,9	1,4	100	
Ácido nalidixico					
CIM ₅₀	>128	>128	>128	>128	16
CIM ₉₀	>128	>128	>128	>128	
%SR	69,1	76,9	85,9	78	
Ciprofloxacina					
CIM ₅₀	0,25	8	2	2	0,064
CIM ₉₀	8	>8	>8	>8	
%SR	73,5	76,9	81,7	90,2	
Azitromicina					
CIM ₅₀	8	8	8	8	16
CIM ₉₀	8	64	32	32	
%SR	1,5	30,8	11,3	14,6	
Gentamicina					
CIM ₅₀	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	1	2
CIM ₉₀	2	2	2	>32	
%SR	7,4	7,7	9,9	7,1	

ND – Não definido; NA – Não aplicável; *- não aplicável devido ao número insuficiente de isolados testados para estes antibióticos.

Tabela 2- Valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ (mg/L) e a frequência de suscetibilidade reduzida (%SR) de *E. coli* comensais e *E. coli* presumíveis produtoras de enzimas ESBL e/ou AmpC geração (CTXr) em isolados de *E. coli* de frangos de produção semi-intensiva (frangos industriais) e semi-intensiva (frangos do campo).

Cloranfenicol					
CIM ₅₀	≤ 8	≤ 8	≤ 8	32	16
CIM ₉₀	≤ 8	>128	128	>128	
%SR	4,4	30,8	23,9	65,9	
Colistina					
CIM ₅₀	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	2
CIM ₉₀	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	
%SR	0	0	0	2,4	
Tetraciclina					
CIM ₅₀	4	64	64	64	8
CIM ₉₀	>64	>64	>64	>64	
%SR	50	53,8	56,3	73,2	
Sulfametoxazole					
CIM ₅₀	≤ 8	>1024	1024	>1024	64
CIM ₉₀	>1024	>1024	>1024	>1024	
%SR	36,8	61,5	50,7	87,8	
Trimetoprim					
CIM ₅₀	≤ 0,25	>32	0,5	0,5	2
CIM ₉₀	>32	>32	>32	>32	
%SR	27,9	53,8	46,5	34,1	
Temocilina					
CIM ₅₀	*	8	*	8	ND
CIM ₉₀	*	8	*	16	
%SR	0	0	0	0	
Tigeciclina					
CIM ₅₀	≤ 0,25	≤ 0,25	0,5	≤ 0,25	ND
CIM ₉₀	0,5	≤ 0,25	1	0,5	
%SR	0	0	0	0	
Meropenem					
CIM ₅₀	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	0,125
CIM ₉₀	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	
%SR	0	0	0	0	
Ertapenem					
CIM ₅₀	*	≤ 0,015	*	≤ 0,015	0,06
CIM ₉₀	*	0,03	*	0,06	
%SR	0	0	0	4,9	
Imipenem					
CIM ₅₀	*	0,25	*	0,25	0,5
CIM ₉₀	*	0,25	*	0,5	
%SR	0	0	0	2,4	
Cefotaxima+ ácido clavulânico					
CIM ₅₀	*	≤ 0,06	*	≤ 0,06	NA
CIM ₉₀	*	4	*	0,25	
%SR	0	23,1	0	9,8	

ND – Não definido; NA – Não aplicável; *- não aplicável devido ao número insuficiente de isolados testados para estes antibióticos.

Tabela 2- Valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ (mg/L) e a frequência de suscetibilidade reduzida (%SR) de *E. coli* comensais e *E. coli* presumíveis produtoras de enzimas ESBL e/ou AmpC (CTXr) em isolados de *E. coli* de frangos de produção semi-intensiva (frangos industriais) e semi-intensiva (frangos do campo).

Ceftazidima+ácido clavulânico					
CIM ₅₀	*	≤ 0,125	*	0,25	NA
CIM ₉₀	*	2	*	0,5	
%SR	0	23,1	0	9,8	
MDR (%)	50	61,5	60,6	87,8	

ND - Não definido; NA - Não aplicável; *- não aplicável devido ao número insuficiente de isolados testados para estes antibióticos; MDR – Multirresistência.

A comparação dos resultados obtidos para os diferentes tipos de produção mostra que, nas estirpes comensais, existe uma diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os isolados de *E. coli* de frango do campo e os de frango industrial na prevalência de suscetibilidade reduzida para vários antibióticos, designadamente o ácido nalidíxico ($p=0,030$), azitromicina ($p=0,045$), cloranfenicol ($p=0,02$) e trimetoprim ($p=0,037$). Para as estirpes CTXr, a análise estatística realizada demonstrou que a diferença só é significativa para o cloranfenicol ($p=0,05$) e para o cefepime ($p=0,01$) (Tabela 2).

As prevalências de resistência observadas às cefalosporinas de terceira geração nas estirpes de *E. coli* comensais são relativamente baixas nos frangos de carne, apesar de ser nesta espécie animal que surgem mais surtos de *Enterobacteriaceae* resistentes a estes fármacos (Stedt *et al.*, 2015; Lalak *et al.*, 2016), o que está de acordo com o descrito em trabalhos anteriores realizados em animais de produção em Portugal (Machado *et al.*, 2008), e noutros países da Europa (Dessie *et al.*, 2013; Managero *et al.*, 2017; Roth *et al.*, 2018; Abbassi *et al.*, 2021; Ewers *et al.*, 2021). Neste estudo, os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ são iguais ou superiores nos isolados de *E. coli* de frangos produzidos em regime intensivo, para quase todos os antibióticos β -lactâmicos (Tabela 2).

Não sendo permitida a utilização das cefalosporinas de terceira geração em animais de produção na Europa, alguns autores sugerem que a emergência de estirpes ESBL e produtoras de carbapenemases nestes animais está relacionada com a pressão de co-seleção que resulta do uso de outros fármacos que não os β -lactâmicos (Manageiro *et al.*, 2017; Saliu *et al.*, 2017; Dandachi *et al.*, 2018). Outros fatores a ter em consideração na análise da existência de estirpes resistentes às cefalosporinas de terceira geração em frangos de carne, é a presença de bactérias portadoras de genes de resistência a estes antimicrobianos no ambiente das explorações, a grande densidade animal principalmente

nas explorações de sistemas intensivos (Costa *et al.*, 2009), e a importação de pintos do dia de países onde é permitida a administração de cefalosporinas de 3^a geração, e que são portadores de bactérias resistentes (Saliu *et al.*, 2017).

Grande parte das populações bacterianas de ambos os tipos de produção apresentam elevados níveis de SR às quinolonas e fluoroquinolonas, o que é demonstrado pelos valores de CIM₉₀ que são superiores a 128 mg/L para o ácido nalidíxico e iguais ou superiores a 8 mg/L para a ciprofloxacina em todas as populações bacterianas estudadas (Tabela 2). Este facto pode ser explicado pelo recurso bastante frequente à enrofloxacin na produção de frangos de carne. A utilização desta fluoroquinolona, de uso exclusivo para medicina veterinária, pode resultar na pressão seletiva de estirpes com mutações cromossómicas e/ou portadoras de genes PMQR que conferem resistência a antibióticos desta classe, tais como o ácido nalidíxico e a ciprofloxacina (Literak *et al.*, 2013; Perrin-Guyomard *et al.*, 2020).

É de salientar a prevalência de resistência moderada nos isolados CTXr de frangos do campo à azitromicina (30,8%) (Figura 12). Visto que este antibiótico não está autorizado para uso em medicina veterinária em Portugal na produção animal, esta perda de susceptibilidade pelas estirpes pode ser explicada pela resistência cruzada com a tilosina, um antibacteriano da classe dos macrólidos, muito utilizado na produção de frangos de carne para o tratamento de infeções do tracto respiratório (Roth *et al.*, 2018).

As prevalências de resistência às tetraciclinas são elevadas, sendo os valores de prevalência de susceptibilidade reduzida iguais ou superiores a 50% e a CIM₉₀ sempre superior a 64 mg/L em ambos os regimes produtivos. Estes fármacos constituem uma classe de antibióticos administrados frequentemente a frangos de carne para o tratamento de infeções por *E. coli*, com oxitetraciclina, ou para controlar infeções por *Mycoplasma* sp., com doxiciclina (Sreejith *et al.*, 2020).

Nas estirpes de *E. coli* comensais de frango do campo, observa-se uma grande discrepância entre os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ para a ciprofloxacina, tetraciclina, sulfametoxazole e trimetoprim (Tabela 2), o que pode indicar a existência de duas subpopulações bacterianas distintas a colonizar o trato gastrointestinal destes animais, com diferentes níveis de resistência (Clemente *et al.*, 2015; Mourand *et al.*, 2020).

A prevalência de resistência à colistina é muito baixa, tendo sido encontrado apenas um isolado de frango industrial CTXr. Embora Portugal seja o segundo país da Europa que

mais utiliza este antimicrobiano na produção animal (EMA/ESVAC, 2020), é utilizada principalmente em suínos e perus.

Nas estirpes CTXr de produção industrial, observaram-se dois isolados com resistência ao ertapenem, e um isolado resistente ao imipenem, contudo não foram encontrados genes que codificam carbapenemases, tais como *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}* e *bla_{IMP}*. Embora os valores de CIM ao ertapenem nestas três estirpes sejam de uma diluição acima dos valores de ECOFF estabelecidos, a diminuição de suscetibilidade a este antibiótico pode estar relacionada com a presença de mecanismos de efluxo, ou perda/alterações nas porinas OmpF e OmpC (Chetri *et al.*, 2019). Sendo as alterações na permeabilidade da membrana celular responsáveis pela diminuição da ação dos antibióticos (Warner *et al.*, 2013; Tangden *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2018), quando associadas à presença de genes que codificam enzimas ESBL ou AmpC, poderão ser responsáveis pelo aparecimento de estirpes com susceptibilidade reduzida aos carbapenemos (Tangdén *et al.*, 2013). A resistência a estes β -lactâmicos em bactérias da família *Enterobacteriaceae* isoladas de animais não é frequente, apesar de já ter sido detetada globalmente em animais de produção, animais de companhia e animais selvagens (Köck *et al.*, 2018).

Foram identificadas sete estirpes de *E. coli* de frango do campo (8,6%) e apenas quatro (3,6%) estirpes de *E. coli* de frango industrial que apresentam suscetibilidade a todos os antibióticos testados. Num estudo que avalia a RAM em estirpes comensais de *Escherichia coli* também se verifica que existe uma maior prevalência de estirpes totalmente susceptíveis provenientes de explorações não convencionais relativamente às explorações convencionais, e os valores são semelhantes aos registados neste estudo (Pesciarolli *et al.*, 2020)

As populações de estirpes CTXr de ambos os tipos de produção demonstram também prevalências de resistência superiores à azitromicina, cloranfenicol, colistina, tetraciclina, sulfametoxazole e trimetoprim, comparando com as estirpes comensais. Este facto poderá indicar que os genes de resistência às cefalosporinas de terceira geração e ou cefamicinas são selecionados por mecanismos de co-seleção associados a cassetes genéticas e em EGMs como plasmídeos, os quais podem conter genes que codificam mecanismos de resistência a outras classes de antibióticos (Blaak *et al.*, 2015).

1.2 Prevalência dos fenótipos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos

O fenótipo presumível mais comum nas estirpes de ambos os tipos de produção é o ESBL, encontrando-se em 76,9% dos isolados CTXr de frango do campo e 78% dos isolados CTXr de frango industrial (Figura 13). Este fenótipo é o mais frequentemente encontrado em estirpes isoladas de amostras fecais de frangos (Alegría *et al.*, 2020).

O fenótipo ESBL + AmpC foi o segundo mais frequente nos isolados CTXr de frango industrial (12,2%), mas não foi encontrado nos isolados CTXr de frango do campo. O fenótipo AmpC foi identificado nos dois tipos de produção, sendo mais prevalente nos isolados CTXr de frango do campo (23,1%), do que nos de frango industrial (9,8%).

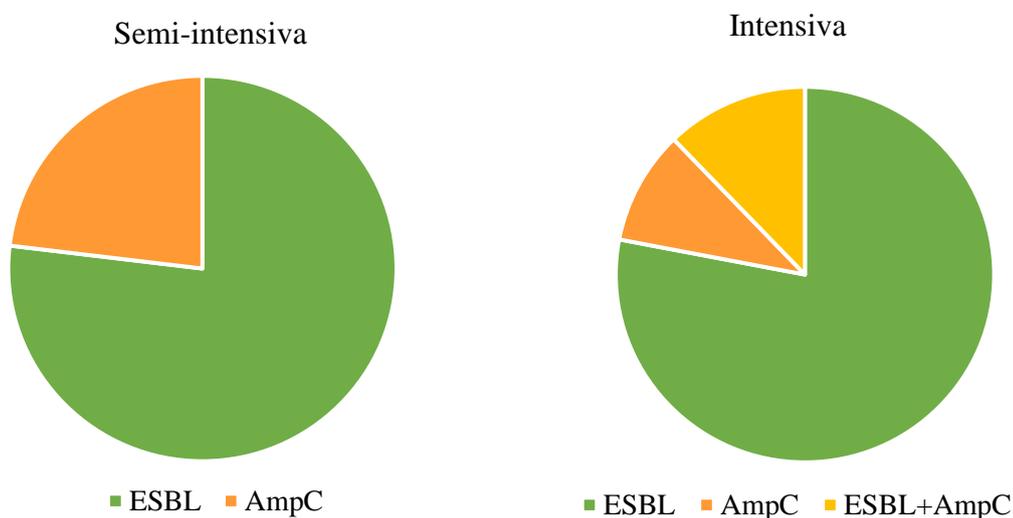


Figura 13-Proporção dos fenótipos presumíveis produtores de β -lactamases de espectro alargado (ESBL) e/ou β -lactamases AmpC em estirpes de *E.coli* CTXr (presumíveis produtoras de enzimas ESBL e/ou AmpC) isoladas de frangos de produção semi-intensiva e intensiva

Nas estirpes comensais foi apenas encontrada um isolado de frango industrial e quatro isolados de *E. coli* de frango do campo com resistência às cefalosporinas de terceira geração, e todas possuem o fenótipo ESBL.

1.3 Padrões de multirresistência

Foram identificadas 42 estirpes de *E. coli* de frango do campo (51,9%), e 77 estirpes de *E. coli* de frango industrial (68,8%) com resistência a pelo menos três classes de antibióticos. A prevalência de estirpes MDR de frango industrial encontrada é inferior a um outro estudo realizado por Manageiro *et al.*, (2017). Os vários padrões de

multirresistência observados encontram-se na Tabela 3, de acordo com o tipo de produção dos animais.

No total foram observados 45 perfis de multirresistência distintos, existindo 15 perfis comuns a ambos os tipos de produção. Dos restantes 30, apenas seis perfis distintos foram encontrados somente em isolados de *E. coli* de frango do campo, e 24 foram encontrados exclusivamente em isolados de *E. coli* de frango industrial.

O antibiótico mais frequente nos perfis de multirresistência é a ampicilina (n=42), seguindo-se a ciprofloxacina (n=40), o sulfametoxazole (n=39), e o ácido nalidixico (n=35).

Identificaram-se 22 perfis de MDR (48,9%) em que as estirpes exibem resistência, no mínimo, a duas classes de antimicrobianos classificados como sendo de importância crítica de máxima prioridade, tais como as cefalosporinas de terceira geração, as fluoroquinolonas, e os macrólidos. A maioria destes 22 perfis (63,6%), estão presentes apenas em isolados de *E. coli* de frango industrial. As estirpes de *E. coli* de frango industrial resistentes às cefalosporinas de terceira geração apresentam um número consideravelmente superior de padrões de multirresistência diferentes (n=19), comparando com as estirpes de *E. coli* de frango do campo (n=7).

O perfil mais prevalente (AMP-CIP-NAL-SMX-TET-TMP) foi identificado em 19% dos isolados de *E. coli* de frango do campo e, globalmente, é também o perfil mais comum considerando o conjunto de todas as estirpes estudadas (12,6%). Nos isolados de *E. coli* de frango industrial, o perfil com maior prevalência (AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-FEP) é exibido em 13% dos isolados; este perfil corresponde a apenas 2,4% dos isolados de *E. coli* provenientes de frango do campo. Apesar de em Portugal os macrólidos e as polimixinas fazerem parte das classes de antibióticos mais utilizados em avicultura (Costa 2019; comunicação pessoal), os antimicrobianos como a azitromicina e a colistina não fazem parte dos fenótipos MDR mais prevalentes em nenhum dos tipos de produção. Pelo contrário, os isolados de *E. coli* de frango industrial com o perfil fenotípico MDR mais prevalente são resistentes a várias cefalosporinas de terceira geração, apesar de ser proibida a utilização destes fármacos na Europa.

Em outros estudos realizados em aves de sistemas de produção intensivos em Portugal (Manageiro *et al.*, 2017) e na Europa (Schink *et al.*, 2013), também se encontraram isolados MDR que apresentam co-resistência a cefalosporinas de terceira geração, e

antibióticos de outras classes como as quinolonas e fluoroquinolonas, tetraciclina, sulfametoxazole e cloranfenicol.

Verifica-se, por isso, que as estirpes de *E. coli* de frango industrial apresentam perfis de multirresistência mais diversos e a mais antibióticos em simultâneo, do que as estirpes de *E. coli* de frango do campo. Este facto pode estar relacionado com uma maior pressão seletiva exercida ao longo do tempo, pelo uso mais frequente e a uma maior variedade de antimicrobianos, associada a uma eficiente captura de determinantes de resistência (como por exemplo os genes *bla*) por EGMs, em aves do regime intensivo em relação às aves do regime semi-intensivo, o que permitiu a seleção de estirpes com resistência a um maior número de antimicrobianos.

Tabela 3- Prevalência dos padrões de multirresistência observados nas estirpes de *E. coli* isoladas de frangos do campo (n=42) e frangos industriais (n=77).

Padrões de multirresistência	Frangos do campo		Frangos industriais		Total	
	N	%	N	%	N	%
AMP-CIP-NAL-TET	7	16,6	2	2,6	9	7,6
AMP-CIP-SMX-TMP	1	2,4	0	0	1	0,8
AMP-CIP-NAL-SMX	1	2,4	1	1,3	2	1,7
AMP-SMX-TET-TMP	2	4,8	2	2,6	4	3,4
AMP-CIP-GEN-NAL	1	2,4	0	0	1	0,8
AMP-CHL-CIP-NAL	0	0	1	1,3	1	0,8
CIP-GEN-NAL-SMX	1	2,4	0	0	1	0,8
CIP-NAL-SMX-TET	2	4,8	1	1,3	3	2,5
GEN-SMX-TET-TMP	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-CIP-NAL-SMX-TET	2	4,8	1	1,3	3	2,5
AMP-CIP-NAL-SMX-TMP	1	2,4	1	1,3	2	1,7
AMP-CHL-CIP-NAL-SMX	0	0	2	2,6	2	1,7
AMP-CIP-NAL TET-TMP	1	2,4	3	3,9	4	3,4
AMP-CIP-SMX-TET-TMP	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-CHL-CIP-NAL-TET	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-AZI-CIP-NAL-TMP	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-CIP-NAL-SMX-TET-TMP	8	19	7	9,1	15	12,6
AMP-CHL-CIP-NAL-SMX-TMP	1	2,4	0	0	1	0,8
AMP-CHL-CIP-GEN-NAL-SMX	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-CHL-CIP-NAL-SMX-TET	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-AZI-CHL-NAL-SMX-TMP	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-AZI-CIP-NAL-SMX-TET-TMP	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-TMP	2	4,8	9	11,7	11	9,2
AMP-AZI-CIP-GEN-NAL-SMX-TET-TMP	1	2,4	4	5,2	5	4,2
AMP-FOT-TAZ-CIP-SMX-FEP	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-FOT-TAZ-CHL-GEN-SMX-FEP	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-FEP	0	0	1	1,3	1	0,8

AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-SMX-TET-FEP	0	0	2	2,6	2	1,7
AMP-FOT-TAZ-CIP-SMX-TMP-FEP-FOX	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-FOT-TAZ-CHL-SMX-TET-FEP-FOX	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TMP-FEP	1	2,4	1	1,3	2	1,7
AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	2	4,8	2	2,6	4	3,4
AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TET-FEP-FOX	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TMP-FEP-FOX	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	3	7,1	1	1,3	4	3,4
AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	1	2,4	10	13	11	9,2
AMP-AZI-FOT-TAZ-CHL-CIP-SMX-TET-TMP-FEP	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-FEP-FOX	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TMP-FEP-FOX-ETP	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	0	0	2	2,6	2	1,7
AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-COL-NAL-SMX-TET-FEP	0	0	1	1,3	1	0,8
AMP-AZI-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	1	2,4	0	0	1	0,8
AMP-AZI-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	2	4,8	0	0	2	1,7
AMP-AZI-FOT-TAZ-CHL-CIP-GEN-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	1	2,4	5	6,5	6	5
AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-GEN-NAL-SMX-TET-TMP-FEP-FOX	0	0	1	1,3	1	0,8

AMP – Ampicilina; AZI – Azitromicina; FOT – Cefotaxima; TAZ – Ceftazidima; CHL – Cloranfenicol; CIP – Ciprofloxacina; COL – Colistina; GEN – Gentamicina; NAL – Ácido Nalidixico; SMX – Sulfametoxazole; TET – Tetraciclina; TMP – Trimetoprim; FEP – Cefepime; FOX – Cefoxitina; ETP - Ertapenem

2. Caracterização genotípica dos isolados

Várias famílias de genes *bla* que codificam diversas enzimas foram identificadas na população de *E. coli* isoladas de frango (Tabela 4 e Tabela 5). As β -lactamases do tipo SHV e do grupo CTX-M-1 são predominantes nas estirpes de produção intensiva (50% e 38,1% respectivamente), enquanto as β -lactamases do tipo SHV e do tipo TEM apresentam maior prevalência nas estirpes de produção semi-intensiva e estão ambas presentes em 41,2% dos isolados resistentes às cefalosporinas de terceira geração (Figura 14). No que respeita às enzimas da família CTX-M, foram também detectadas enzimas do grupo CTX-M-9.

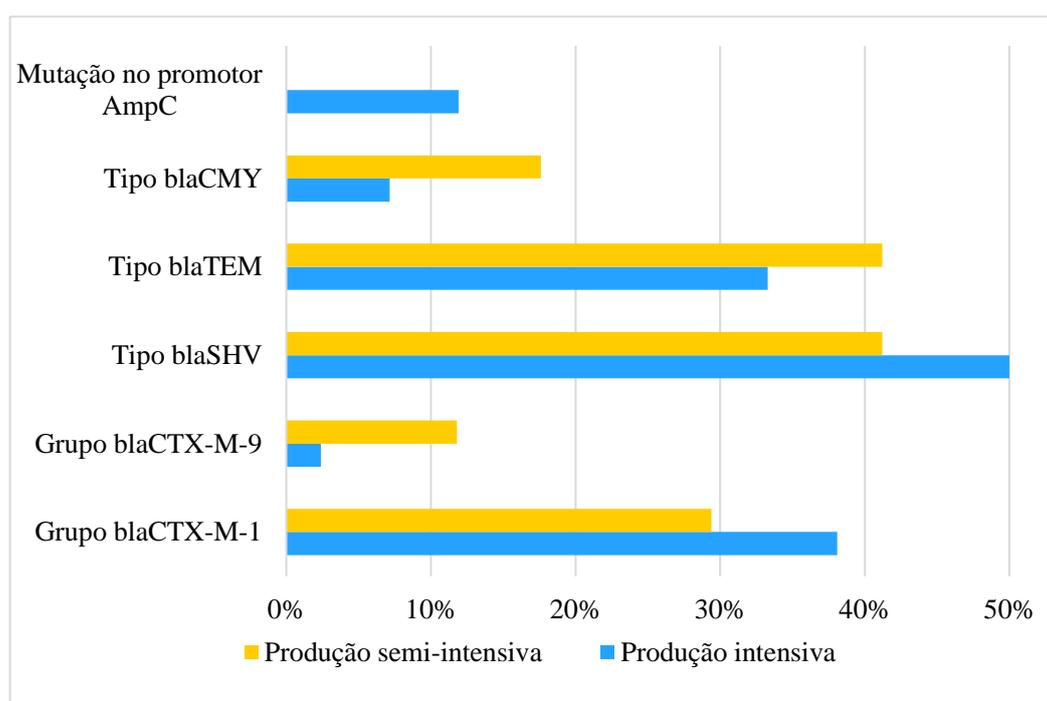


Figura 14- Distribuição dos genes *bla* nas estirpes de *E. coli* com fenótipo ESBL e/ou AmpC isoladas de frangos de produção intensiva e semi-intensiva

O gene *bla* mais frequentemente detetado neste estudo é o que codifica para a enzima SHV-12, quer no regime intensivo (n=21), quer no regime semi-intensivo (n= 6) (Figura 15). Do grupo CTX-M-1 foi possível identificar os genes *bla*_{CTX-M-1} (regime semi-intensivo= 4; regime intensivo= 4), *bla*_{CTX-M-32} (regime intensivo=2) e *bla*_{CTX-M-55} (regime semi-intensivo=1; regime intensivo=9) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4- Caracterização genotípica das estirpes de *E. coli* resistentes às cefalosporinas de 3ª geração, isoladas de frangos produzidos em regime semi-intensivo (n=17).

Amostra	Estirpe	Ano	Fenótipo	Inibição pelo AC	Genes de resistência <i>bla</i>	Integrões: Classe I, II e III
1fc	Comensal	2014	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	Negativo
2fc	Comensal	2014	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>bla</i> _{SHV-12}	I e II
3fc	Comensal	2014	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	Negativo
4fc	Comensal	2014	AMP-FOT-TAZ-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	Negativo
5fc	CTXr	2018	AMP-FOT-CIP-NAL-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	I
6fc*	CTXr	2018	AMP-AZI-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-14} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	I
7fc	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-FOX	Não	<i>bla</i> _{CMY-2} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	Negativo
8fc	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I e II
9fc	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-FOX	Não	<i>bla</i> _{CMY-2}	Negativo
10fc*	CTXr	2018	AMP-AZI-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-14} ; <i>bla</i> _{TEM-1B}	I
11fc	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-FOX	Não	<i>bla</i> _{CMY-2}	Negativo
12fc	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-type} ; <i>bla</i> _{TEM-type}	Negativo
13fc	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-1} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	I
14fc	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I
15fc	CTXr	2020	AMP-AZI-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I e II
16fc	CTXr	2020	AMP-AZI-FOT-TAZ-CHL-CIP-GEN-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-55} ; <i>bla</i> _{TEM-type}	I
17fc	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I

AC – Ácido Clavulânico; AMP – Ampicilina; AZI – Azitromicina; FOT – Cefotaxima; TAZ – Ceftazidima; CHL – Cloranfenicol; CIP – Ciprofloxacina; GEN – Gentamicina; NAL – Ácido Nalidixico; SMX – Sulfametoxazole; TET – Tetraciclina; TMP – Trimetoprim; FEP – Cefepime; FOX – Cefoxitina; *-estirpe selecionada para WGS

Tabela 5- Caracterização genotípica das estirpes de *E. coli* resistentes às cefalosporinas de 3ª geração, isoladas de frangos produzidos em regime intensivo (n=42).

Amostra	Estirpe	Ano	Fenótipo	Inibição pelo AC	Genes de resistência <i>bla</i>	Integrões
1fi	comensal	2018	AMP-AZI-FOT-TAZ-CHL-CIP-GEN-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-55} ; <i>bla</i> _{TEM-type}	I
2fi *	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-COL-NAL-AMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I
3fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TET-FEP-FOX	Sim	<i>bla</i> _{TEM-52C}	I
4fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I e II
5fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-FEP-FOX-ETP	Não	<i>bla</i> _{CMY-2} ; <i>bla</i> _{TEM-type}	Negativo
6fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CHL-SMX-TET-FEP-FOX	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I e II
7fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I e II
8fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I
9fi	CTXr	2018	AMP-AZI-FOT-TAZ-CHL-CIP-GEN-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-55} ; <i>bla</i> _{TEM-type}	I
10fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-1} ; <i>bla</i> _{TEM-type}	I
11fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TMP-FEP-FOX	Não	<i>bla</i> _{CMY-2}	I
12fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	Negativo
13fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-FEP-IMI	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	Negativo
14fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-55}	I
15fi	CTXr	2018	AMP-AZI-FOT-TAZ-CHL-CIP-GEN-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-55} ; <i>bla</i> _{TEM-type}	I
16fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CIP-SMX-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I
17fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	I
18fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CIP-SMX-TMP-FEP-FOX	Não	<i>bla</i> _{CMY-2} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	Negativo
19fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	II
20fi	CTXr	2018	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-55}	Negativo
21fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CHL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I

AMP – Ampicilina; AZI – Azitromicina; FOT – Cefotaxima; TAZ – Ceftazidima; CHL – Cloranfenicol; CIP – Ciprofloxacina; COL – Colistina; GEN – Gentamicina; NAL – Ácido Nalidixico; SMX – Sulfametoxazole; TET – Tetraciclina; TMP – Trimetoprim; FEP – Cefepime; FOX – Cefoxitina; ETP – Ertapenem; *-estirpe selecionada para WGS

Tabela 5- Continuação

Amostra	Estirpe	Ano	Fenótipo	Inibição pelo AC	Genes de resistência <i>bla</i>	Integrões
22fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	Negativo
23fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	Negativo
24fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-FEP-FOX	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-55}	I
25fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I
26fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	I
27fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I
28fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I
29fi	CTXr	2020	AMP-AZI-FOT-TAZ-CHL-CIP-GEN-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-55} ; <i>bla</i> _{TEM-type}	I
30fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TMP-FEP-FOX-ETP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-32} ; mutação no gene promotor AmpC (posição 28)	I
31fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I
32fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	Negativo
33fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	Negativo
34fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	Negativo
35fi	CTXr	2020	AMP-AZI-FOT-TAZ-CHL-CIP-GEN-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-55} ; <i>TEM-1</i>	I
36fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I
37fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CHL-GEN-SMX-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-32} ; <i>SHV-12</i>	I e II
38fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-GEN-NAL-SMX-TET-TMP-FEP+FOX	Sim	<i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>bla</i> _{CMY-type}	I e II
39fi	CTXr	2020	AMP-AZI-FOT-TAZ-CHL-CIP-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-1} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	I e II
40fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-SMX-TET-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I
41fi	CTXr	2020	AMP-AZI-FOT-TAZ-CHL-CIP-GEN-NAL-SMX-TET-TMP-FEP-FOX	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M-55} ; <i>bla</i> _{TEM-type}	I
42fi	CTXr	2020	AMP-FOT-TAZ-CHL-CIP-NAL-SMX-TET-TMP-FEP	Sim	<i>bla</i> _{SHV-12}	I

AC – Ácido Clavulânico; AMP – Ampicilina; AZI – Azitromicina; FOT – Cefotaxima; TAZ – Ceftazidima; CHL – Cloranfenicol; CIP – Ciprofloxacina; COL- Colistina; GEN – Gentamicina; NAL – Ácido Nalidixico; SMX – Sulfametoxazole; TET – Tetraciclina; TMP – Trimetoprim; FEP – Cefepime; FOX – Cefoxitina; ETP-Ertapenem

Segundo vários estudos, os genes predominantes em aves na Europa são os que pertencem ao grupo *bla*_{CTX-M-1}, sendo as enzimas SHV-12 também muito prevalentes (Alonso *et al.*, 2017; Dandachi *et al.*, 2018; Niero *et al.*, 2018; Cormier *et al.*, 2019; Ewers *et al.*, 2021).

Todavia, existem grandes diferenças entre países, no que diz respeito às enzimas ESBL mais frequentemente encontradas em frangos (Saliu *et al.*, 2017; Gundran *et al.*, 2019). O Reino Unido, os Países Baixos e a Alemanha, estão entre os países europeus com uma elevada prevalência de enzimas CTX-M-1 detetadas em amostras de frangos (Saliu *et al.*, 2017; Irrgang *et al.*, 2018). Espanha, pelo contrário, pertence aos países europeus com baixa prevalência desta enzima, mas alta prevalência da enzima SHV-12 nos animais de produção (van Hoek *et al.*, 2016; Saliu *et al.*, 2017; Ewers *et al.*, 2021). Os resultados do presente trabalho estão de acordo com o estudo realizado em 2017 por Manageiro *et al.*, em que o gene *bla*_{SHV-12} foi o mais frequentemente detetado em estirpes de aves em Portugal, seguindo-se as enzimas do grupo CTX-M-1.

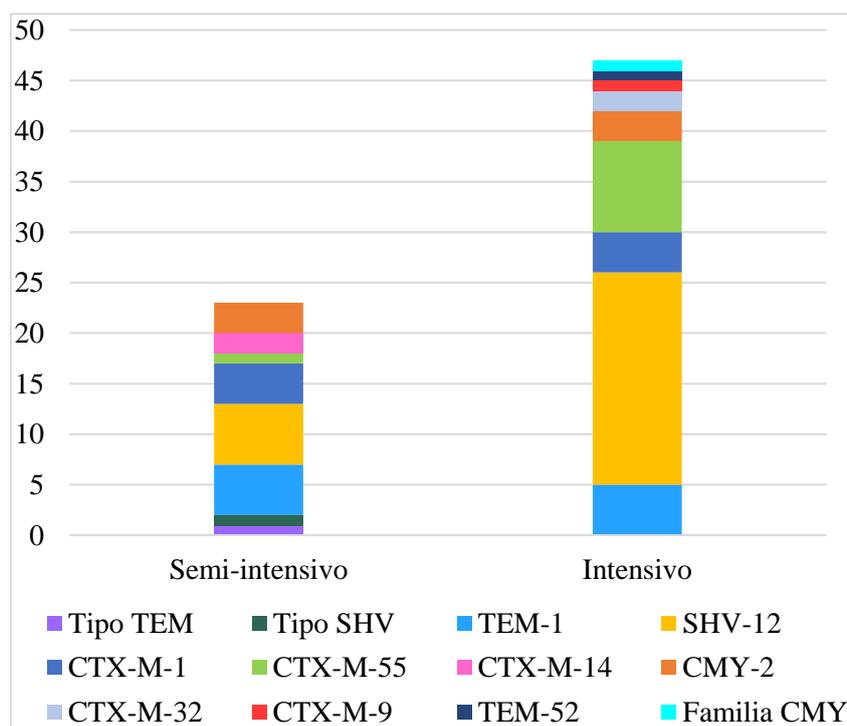


Figura 15-Distribuição dos genes que codificam β -lactamases nos isolados de *E.coli* produtores de enzimas ESBL e PMA β nos sistemas de produção de frangos de carne em regime intensivo e semi-intensivo

A enzima CTX-M-32 deriva da CTX-M-1 com alteração apenas de um aminoácido (Díaz-Jiménez *et al.*, 2020). Em Portugal, esta enzima além de identificada em frangos (Costa *et al.*, 2009) foi detetada em estirpes de *E. coli* de suínos (Ramos *et al.*, 2013), bovino

(Leão *et al.*, 2021) e cães (Meireles *et al.*, 2015). No nosso trabalho, este gene foi encontrado em duas estirpes de *E. coli* obtidas a partir de animais de produção intensiva, uma das quais transportava também o gene *bla_{SHV}*. A co-ocorrência de genes *bla* de diferentes famílias tem sido reportada em *E. coli* (Gundran *et al.*, 2019), geralmente aumentando o nível de resistência e trazendo vantagem para as bactérias.

A enzima CTX-M-55 foi identificada num número considerável de estirpes de *E. coli* de frango do campo, apesar de não existirem muitos estudos que façam referência a esta enzima em aves na Europa. Já foi identificada em cães e gatos em Portugal e em frangos de carne na Algeria (Carvalho *et al.*, 2021) e Tunisia (Hassen *et al.*, 2020). No entanto, este gene *bla_{CTX-M-55}* parece ser o mais comum e dominante em estirpes de *E. coli* isoladas de animais domésticos (Hassen *et al.*, 2020) e, por vezes, em explorações de frangos na China (Shafiq *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2021).

No que respeita ao grupo CTX-M-9, foram identificadas duas estirpes isoladas do regime semi-intensivo com o gene *bla_{CTX-M-14}*, e apenas uma estirpe do regime intensivo com o gene *bla_{CTX-M-9}*. O gene *bla_{CTX-M-14}* não é muito frequente nos animais de produção na Europa (Ewers *et al.*, 2021), mas num estudo realizado em Portugal em 2009 por Costa *et al.*, foi um dos genes encontrados em amostras de fezes de frango. Em países como Inglaterra, Espanha e Portugal, é o gene que codifica enzimas da família CTX-M mais frequentemente detetado em animais selvagens (Stedt *et al.*, 2015).

O gene *bla_{CTX-M-9}* é mais frequente na produção de carne de aves em países asiáticos (Gundran *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020). Este gene foi identificado pela primeira vez em Portugal em carne de frango de retalho em 2012 (Silva *et al.*, 2012), e já foi detetado no conteúdo fecal de frangos em países europeus, designadamente Itália (Dandachi *et al.*, 2018). É uma variante importante do ponto de vista da saúde pública, pois é reportada com alguma frequência em isolados humanos, particularmente em Espanha e no Reino Unido (Gundran *et al.*, 2019).

No que respeita à família TEM, a variante mais prevalente é a TEM-1, que não é responsável pelo fenótipo ESBL. Além do gene *bla_{TEM-1}* (regime semi-intensivo=5; regime intensivo= 5), foi identificado o gene *bla_{TEM-52}*, responsável pelo fenótipo ESBL numa estirpe proveniente de frangos industriais. Neste trabalho a co-ocorrência de genes de resistência aos β-lactâmicos é frequente, e corresponde essencialmente à associação do gene *bla_{TEM-1}* a outro gene *bla* (*bla_{CTX-M-14}*, *bla_{CMY-2}*, *bla_{SHV-12}*, *bla_{CTX-M-55}*, *bla_{CTX-M-32}*,

e *bla*_{CTX-M-1}). Verifica-se em 41,2% das estirpes de *E. coli* de frango do campo com resistência às cefalosporinas de terceira geração e 33% dos isolados de *E. coli* de frango industrial com resistência a estes antimicrobianos.

Em Portugal, um estudo anterior realizado em frangos saudáveis abatidos no matadouro revelou uma elevada presença do gene *bla*_{TEM-52} (Costa *et al.*, 2009). Estudos anteriores indicam ainda que, no nosso país, esta enzima é uma das ESBL do tipo TEM mais comum em infeções em humanos (Costa *et al.*, 2009) e já foi detetada noutros animais de produção como suínos (Rodrigues *et al.*, 2013), em avestruzes (Carneiro *et al.*, 2010), lobo ibérico (Gonçalves *et al.*, 2012), gaivotas (Poeta *et al.*, 2008), animais de companhia (Costa *et al.*, 2004), e peixes (Sousa *et al.*, 2011).

Nas estirpes com fenótipo AmpC e ESBL+AmpC, a pesquisa de genes *ampC* plasmídicos permitiu a identificação de genes pertencentes à família CMY, designadamente da variante *bla*_{CMY-2} (regime semi-intensivo=3; regime intensivo=3) (Tabelas 4 e 5). Esta enzima, frequentemente encontrada em estirpes de *E. coli* em várias regiões da Ásia, América do Norte, é a variante AmpC plasmídica da família CMY mais detetada na Europa (Jacoby, 2009; Huijbers *et al.*, 2014; Pietsch *et al.*, 2018; Ewers *et al.*, 2021), e a aumentar nos últimos anos em *Enterobacteriaceae* isoladas de animais de produção (Pietsch *et al.*, 2018).

No geral, os resultados deste estudo estão concordantes com outros trabalhos que mostram que, entre os animais de produção, as aves são a espécie onde são mais frequentemente detetadas enzimas ESBL, sendo os genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{SHV-12}, e *bla*_{CMY-2}, os predominantes (Stedt *et al.*, 2015; Saliu *et al.*, 2017).

Alguns estudos indicam que os animais de produção constituem uma fonte de infeção humana causada por estirpes de *E. coli* resistentes às cefalosporinas de espectro alargado (Stedt *et al.*, 2015; Saliu *et al.*, 2017). Segundo van Hoek *et al.* (2020), os genes ESBL/AmpC predominantes em trabalhadores de explorações de frango são *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CMY-2}, que foram também detetados em vários isolados de ambas as produções de frango de carne neste estudo.

Nas estirpes com fenótipo AmpC, em que não foram detetados genes *ampC* plasmídicos, fez-se a pesquisa de mutações no gene cromossómico *ampC*. No isolado 30fi detetou-se uma mutação no promotor na posição -28 (G-A). De acordo com Tracz *et al.* (2007), esta mutação não contribui significativamente para aumentar a expressão do promotor.

Todavia, a expressão da enzima AmpC aumenta em 1 a 3 diluições de base 2, pelo que está de acordo com os resultados obtidos, em que a CIM da cefoxitina é de apenas 16 mg/L neste isolado.

Nos restantes isolados com fenótipo AmpC, 3fi, 6fi, 24fi e 41fi, que apresentam igualmente CIM da cefoxitina de 16 mg/L, não foram encontradas mutações no gene *ampC* que possam causar sobreexpressão da enzima. Deste modo, a diminuição da susceptibilidade a este antimicrobiano pode estar relacionada com a presença de genes de resistência que codificam bombas de efluxo, ou diminuição do número de porinas na membrana celular (Jacoby, 2009).

3. Elementos genéticos móveis

A presença de integões é mais frequente nos isolados da produção intensiva em comparação com os da produção semi-intensiva (Figura 16). A classe de integrões do tipo I é a mais prevalente nos dois tipos de produção, encontrando-se em 46,4% dos isolados de aves produzidas em regime intensivo, e 29,6% dos isolados de aves produzidas em regime semi-intensivo. Os integrões da classe II foram identificados com uma ocorrência bastante inferior e com maior expressão nos isolados de *E. coli* de frango do campo comparativamente aos de frango industrial (3,7% e 0,89%, respectivamente). Foram também encontrados integrões destas duas classes em conjunto na mesma estirpe em 9,82% dos isolados de *E. coli* de frangos produzidos em sistema intensivo e 4,94% dos isolados de *E. coli* de frangos produzidos em regime semi-intensivo (Figura 16).

A presença de integrões é comum em isolados bacterianos MDR (Kargar *et al.*, 2014). Os da classe I são os mais frequentemente detetados em Portugal e em várias outras regiões do globo (Machado *et al.*, 2008; Clemente *et al.*, 2015), seguindo-se os da classe II (Dessie *et al.*, 2013).

Não foram observados integrões da classe III, o que está de acordo com vários estudos que referem que é a classe menos frequente (Kargar *et al.*, 2014). Embora já encontrados em *E. coli* em países europeus, tais como a Suíça (Deng *et al.*, 2015), os integrões da classe III são mais frequentes noutras regiões do globo, como no Irão (Kargar *et al.*, 2014) e na Índia, (Elizabeth *et al.*, 2018), em estirpes portadoras de genes que codificam enzimas CTX.

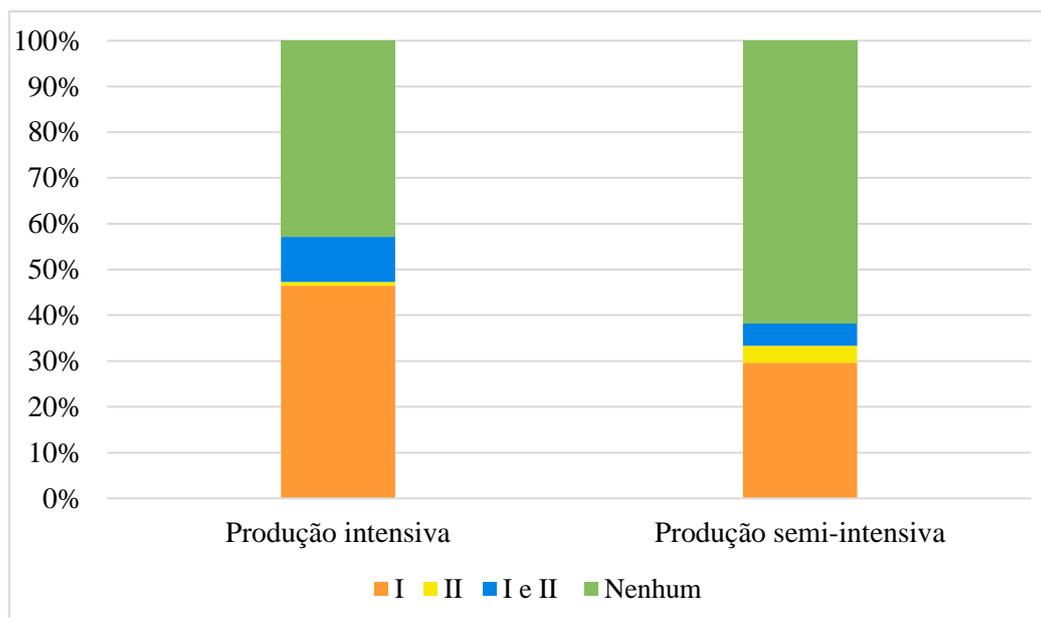


Figura 16-Distribuição dos integrons nas estirpes de *E. coli* isoladas de animais produzidos em sistemas de produção intensiva e produção semi-intensiva

4. Caracterização genômica dos isolados submetidos a Sequenciação do Genoma Completo (WGS)

A Sequenciação do Genoma Completo (WGS) é uma ferramenta cuja utilização possui muitas vantagens na investigação, permitindo a identificação e caracterização de estirpes de bactérias resistentes de forma muito mais rápida e precisa que os métodos convencionais. É cada vez mais utilizada em programas de vigilância epidemiológica não só na RAM, mas também no controlo da disseminação de estirpes patogénicas (Gurwitz, 2018).

Neste estudo recorreu-se à WGS para analisar o genoma de três isolados seleccionados pelo seu fenótipo multirresistente aos antibióticos de importância crítica, designadamente às cefalosporinas de 3ª geração, colistina, fluoroquinolonas e macrólidos. Os perfis genéticos dos isolados obtidos pela análise bioinformática utilizando as ferramentas do CGE estão de acordo com os resultados fenotípicos, e encontram-se detalhados na tabela 6.

Tabela 6— Características do genoma das estirpes MDR de *E. coli* seleccionadas para Sequenciação do Genoma Completo (WGS).

	Isolado	2fi	6fc	10fc
	Espécie	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	MLST	ST 10	ST 744	ST 744
	Serótipo	O166; H25	O101: H10	O101: H9
	Plasmídeos	Col; IncB/O/K/Z; IncI1; IncX4; p0111	IncFIB; IncI1; IncW	IncFIB; IncI1; IncI2;
	Filogrupo	A	A	A
Determinantes de resistência	Sulfonamidas	<i>sul3</i>	<i>sul1; sul2</i>	<i>sul1; sul2</i>
	Colistina	<i>mcr-1.1</i>	-	-
	β-lactâmicos	<i>bla_{SHV-12}</i>	<i>bla_{CTX-M-14}</i> ; <i>bla_{TEM-1B}</i>	<i>bla_{CTX-M-14}</i> ; <i>bla_{TEM-1B}</i>
	Macrolídeos	-	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>
	Fenicóis	<i>cmlA1</i>	<i>catA1</i>	<i>catA1</i>
	Tetraciclina	<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(B)</i>
	Trimetoprim	-	<i>dfrA17</i> ; <i>dfrA5</i>	<i>dfrA17</i>
	Quinolonas e Fluoroquinolonas	<i>gyrA</i> (p.S83L)	<i>parC</i> (p.A56T) <i>gyrA</i> (p.D87N) (p.S83L)	<i>parC</i> (p.A56T) <i>gyrA</i> (p.D87N) (p.S83L)

Neste estudo, as estirpes sequenciadas evidenciam a presença de determinantes de resistência a várias classes de antimicrobianos, incluindo os CIA. A estirpe de frango industrial (2fi) possui genes de resistência às sulfonamidas (*sul3*), colistina (*mcr-1.1*), β-lactâmicos (*bla_{SHV-12}*), fenicóis (*cmlA1*), tetraciclina (*tetA*), e uma mutação no promotor do gene *gyrA*. As duas estirpes de *E. coli* de frango do campo (6fc e 10fc) têm um perfil genotípico bastante semelhante, e possuem genes de resistência às sulfonamidas (*sul1* e *sul2*), β-lactâmicos (*bla_{CTX-M-14}* e *bla_{TEM-1}*), macrolídeos (*mphA*), fenicóis (*catA1*), tetraciclina (*tetB*), trimetoprim (*dfrA17* e *dfrA5*), e mutações nos genes *parC* e *gyrA*. Na região do mediterrâneo, as tetraciclina, sulfonamidas, fluoroquinolonas e polimixinas, são as classes de antibióticos mais prescritas no setor veterinário (Dandachi *et al.*, 2018).

O gene *mph(A)* foi identificado nos dois isolados de *E. coli* provenientes de frango do campo com resistência à azitromicina com valores de CIM elevados (6fc: CIM>64 mg/L e 10fc: CIM=32 mg/L). Este gene, que codifica uma fosforilase, é o mais frequentemente

encontrado em estirpes com susceptibilidade reduzida aos macrólidos, e dissemina-se através de elementos genéticos móveis. Este é considerado o principal mecanismo responsável pela resistência à azitromicina, estando a sua presença associada a valores de CIM ≥ 32 mg/L. Ainda que não esteja definido o valor de ECOFF para este antimicrobiano pelo EUCAST, alguns estudos indicam que 32 mg/L é um valor indicativo adequado para a identificação da presença deste mecanismo de resistência (Gomes *et al.*, 2019).

A presença dos genes *tet(A)* e *tet(B)* conferem resistência às tetraciclinas, antibióticos largamente utilizados nos animais de produção em todo o mundo (Møller *et al.*, 2016; Sreejith *et al.*, 2020). O desenvolvimento da resistência a esta classe de antimicrobianos em bactérias de Gram-negativo ocorre, essencialmente, através da existência de bombas de efluxo libertando o antibiótico para o exterior da célula bacteriana. Os genes *tet(A)* e *tet(B)* detetados neste estudo, são os mais frequentemente encontrados em estirpes de *Escherichia coli* (Bryan *et al.*, 2004; Møller *et al.*, 2016; Abbassi *et al.*, 2021).

Existem vários mecanismos de resistência às quinolonas e fluoroquinolonas, mas as mutações localizadas na região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) no gene *gyrA* e *parC* constituem o mecanismo de resistência que contribuem para o maior aumento dos valores da CIM (Saenz *et al.*, 2003; Shigemura *et al.*, 2012). Neste estudo, o isolado de frango industrial (2fi) apresenta uma mutação no gene *gyrA* com substituição de um aminoácido (Ser-83→Leu), que é reconhecida como uma das substituições mais frequentes (Vanni *et al.*, 2014). A presença de apenas uma substituição na proteína GyrA está associada a uma pequena diminuição da susceptibilidade à ciprofloxacina (CIM= 0.03-1 mg/L) (Saenz *et al.*, 2003; Vanni *et al.*, 2014), contudo neste estudo a estirpe 2fi têm uma CIM > 8 mg/L. Este facto pode estar relacionado com a presença de bombas de efluxo que resultam em valores mais elevados de CIM à ciprofloxacina (Saenz *et al.*, 2003). Nas duas estirpes de *E. coli* de frango do campo (6fc e 10fc) identificaram-se duas mutações no gene *gyrA* que resultam em substituições de aminoácidos (Ser-83→Leu; Asp-87→Asn) frequentemente encontradas em *E. coli* (Yoon *et al.*, 2020), e uma no gene *parC* (Ala-56→Thr). As substituições de três aminoácidos (dois na GyrA e um na ParC) estão associadas a uma resistência moderada/elevada à ciprofloxacina (8-32 mg/L) (Saenz *et al.*, 2003; Vanni *et al.*, 2014) tal como se verifica nestas estirpes que possuem uma CIM > 8 mg/L.

Genes de resistência aos fenicóis, designadamente *catA1* e *cmlA1*, foram identificados no genoma dos isolados de ambos os regimes de produção. O cloranfenicol é um antibiótico

de largo espectro que já não é utilizado em animais de produção. A resistência a este antibiótico pode ser mediada por enzimas como a CATA1 (cloranfenicol acetyl transferase), ou por bombas de efluxo codificadas por genes como o *cmlA* ou *flo* (Yaqoob *et al.*, 2018). Estes genes podem ser selecionados e co-transferidos simultaneamente com genes de resistência a outros antimicrobianos (em cassetes de genes ou EGMs como plasmídeos) aprovados para a utilização em animais de produção (Bischoff *et al.*, 2005).

A combinação sulfametoxazole-trimetoprim é utilizada em frangos de carne por ser eficaz no controlo de infeções por *E. coli*, mas não é utilizado com frequência em Portugal (Costa 2019, comunicação pessoal). O isolado de frango industrial possui o gene *sul3* e nos dois isolados de *E. coli* de frango do campo detetaram-se os genes *sul1*, *sul2*, *dfrA5* e *dfrA17*. Os genes *sul* são responsáveis pela resistência às sulfonamidas nas bactérias de Gram-negativo e codificam formas da enzima alvo destes antibióticos, a dihidropeteroato sintetase (Blahna *et al.*, 2006). O gene *sul1* encontra-se muitas vezes descrito como fazendo parte do segmento conservado 3'-CS dos integrões da classe I, que são os mais frequentes em bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Blahna *et al.*, 2006; Soufi *et al.*, 2011). Os genes *sul3*, apesar de menos frequentes, são muitas vezes descritos como fazendo parte de uma sequência genética (*qacH-IS440-sul3*) ligada também a integrões da classe I, mas que não possuem o clássico segmento 3'-CS (Soufi *et al.*, 2011; Abbassi *et al.*, 2021). O gene *sul2* localiza-se normalmente em plasmídeos conjugativos de pequenas dimensões, ou plasmídeos de grandes dimensões que alojam genes de resistência a várias outras classes de antibióticos. Pelo facto de o modo de transferência dos genes *sul1* e *sul2* entre estirpes ser diferente, é comum estes genes coexistirem no mesmo isolado, tal como se verifica nos isolados 6fc e 10fc (Blahna *et al.*, 2006; Abbassi *et al.*, 2021). A resistência ao trimetoprim ocorre por mutações na enzima dihidrofolato redutase, codificada por genes *dfr*. São conhecidos cerca de 30 genes *dfr* que estão normalmente associados a integrões, sendo o gene *dfr17* um dos mais frequentes (Brolund *et al.*, 2018).

Na estirpe 2fi confirmou-se a presença do gene de resistência à colistina *mcr-1*. Este gene foi já identificado em diversas espécies bacterianas, provenientes de várias espécies animais, do meio ambiente, e de alimentos como carne e vegetais (Jones-Dias *et al.*, 2016; Manageiro *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2018). Pensa-se que a principal causa da emergência e transmissão do gene *mcr-1* tem sido a utilização abusiva de colistina em animais de produção (Sun *et al.*, 2018; Javed *et al.*, 2020). Portugal é o segundo país europeu com

maior consumo de colistina na atividade pecuária (EMA/ESVAC, 2020), e este antibiótico é um dos mais utilizados na produção de aves, principalmente perús (Costa 2019, comunicação pessoal). Este isolado é MDR, apresentando vários outros genes de resistência, incluindo o gene *bla_{SHV-12}* que codifica uma ESBL. Vários estudos referem que a proporção de genes *mcr-1* em bactérias *E. coli* produtoras de ESBL em animais tem vindo a aumentar consideravelmente, comparando com a baixa prevalência deste gene em estirpes não produtoras de β -lactamases, sugerindo que a utilização de colistina favorece a seleção e disseminação de estirpes portadoras de genes de resistência às cefalosporinas de segunda, terceira e quarta geração (Lalak *et al.*, 2016; Haenni *et al.*, 2017; Clemente *et al.*, 2019; Perrin-Guyomard *et al.*, 2020).

Os três isolados sequenciados pertencem ao filogruppo A, tal como noutro estudo realizado em Portugal, em isolados comensais de *E. coli* de aves (Machado *et al.*, 2008). Nalguns países europeus da região da bacia do mediterrâneo, está também documentado que os isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases ESBL e AmpC com origem em aves, são principalmente do filogruppo A (Saliu *et al.*, 2017; Dandachi *et al.*, 2018).

Foram identificados dois *sequence types* diferentes; a estirpe de frango industrial pertence ao ST10, e as duas estirpes de *E. coli* de frango do campo pertencem ao ST744. A deteção de uma estirpe ST10 MDR ESBL/*mcr-1* em aves é relevante, visto que este ST pertence ao complexo clonal 10 (CC10) que é um dos mais frequentes em estirpes de *E. coli* clínicas isoladas em humanos (Oteo *et al.*, 2009; Díaz-Jiménez *et al.*, 2020), e é também comum ser encontrado em *E. coli* de animais de companhia como cães e gatos (Dandachi *et al.*, 2018). O ST744 apesar de não ser tão frequente, está por vezes associado a estirpes de *E. coli* que causam infeções em humanos e animais (Haenni *et al.*, 2017) que apresentam resistência a CIA designadamente à colistina, fluoroquinolonas e carbapenemos (Hayer *et al.*, 2020).

As estirpes sequenciadas apresentam três ou mais plasmídeos, entre os quais IncB/O/K/Z, IncI1, IncI2, IncX4, IncFIB, IncW e Col. Os plasmídeos promovem a THG entre bactérias da mesma espécie ou espécies diferentes dependendo do seu espectro de hospedeiros, das suas propriedades conjugativas e eficiência de conjugação (Carattoli, 2013). Os que conferem multirresistência normalmente são de grandes dimensões, auto-conjugativos, e possuem mecanismos de controlo que permitem regular a sua taxa de replicação (Carattoli, 2013). Os plasmídeos associados à disseminação das principais enzimas ESBL estão bem-adaptados e possuem propriedades que aumentam a sua capacidade de difusão

e persistência em diferentes hospedeiros e ambientes (Carattoli, 2013). Em *Enterobacteriaceae*, os plasmídeos que transportam um maior número de determinantes de resistência são: IncF, IncI, IncA/C, IncL, IncN e IncH (Rozwandowicz *et al.*, 2018).

Os plasmídeos IncI possuem um espectro estreito de hospedeiros e são conjugativos. Ocorrem essencialmente na Europa, em isolados de *E. coli* e *Salmonella enterica* produtores de enzimas ESBL e AmpC isolados de aves (García-Fernandéz *et al.*, 2008). Vários estudos reportam que nas aves os genes *bla_{SHV-12}* estão associados principalmente a plasmídeos IncI1 (Huijbers *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2017; Ewers *et al.*, 2021). Os plasmídeos IncI2 podem ser transmitidos entre diferentes espécies bacterianas e o gene de resistência ao beta-lactâmicos que albergam com mais frequência é *bla_{CTX-M-55}* (Rozwandowicz *et al.*, 2018). O gene *bla_{CTX-M-14}* detetado nas duas estirpes de *E. coli* de frango do campo é o gene *bla* com maior disseminação em humanos em alguns países como Espanha, e, tal como o gene *bla_{SHV}*, já foi identificado em plasmídeos IncI1 e IncFIB em estirpes de *E. coli* de frangos de carne (Saliu *et al.*, 2017; Dandachi *et al.*, 2018).

Os plasmídeos IncF são conjugativos e estão limitados à família *Enterobacteriaceae*; por vezes, encontram-se na mesma estirpe com plasmídeos IncI1 (Rozwandowicz *et al.*, 2018). São dos plasmídeos mais frequentemente descritos em isolados de humanos e animais, principalmente em *E. coli*, e possuem com frequência genes que codificam ESBLs, carbapenemases, genes que codificam enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos e genes de resistência adquirida às fluoroquinolonas (Poirel *et al.*, 2018). Em alguns países, como França e Coreia estão associados à disseminação do gene *bla_{CTX-M-14}* (Marcadé *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011; Carattoli, 2013).

Os plasmídeos IncX são um grupo de plasmídeos com um espectro de hospedeiros estreito, não são conjugativos, e estão associados a genes de resistência aos β -lactâmicos de espectro alargado, quinolonas, e por vezes tetraciclinas e trimetoprim (Ageevets *et al.*, 2019). Recentemente, o plasmídeo IncX4 tem sido associado aos genes *mcr-1* e *mcr-2* (Poirel *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018), e já foram identificados em todo o mundo, sugerindo que estes plasmídeos estão associados à disseminação da resistência à colistina, mesmo em países com um baixo consumo deste antimicrobiano em medicina humana e veterinária (Ageevets *et al.*, 2019).

Capítulo V- Conclusões

A resistência antimicrobiana constitui um problema de saúde pública global, que ameaça o sucesso do tratamento de infecções em humanos e animais, com o consequente aumento das taxas de morbidade e mortalidade.

No que diz respeito à produção de frangos de carne, existem vários fatores que variam nos sistemas de produção semi-intensivos e intensivos, e que podem afetar a RAM, tais como o manejo, a alimentação, as condições de bem-estar, a época do ano, as doenças existentes e os fármacos administrados, incluindo os antimicrobianos. Neste estudo considerou-se importante fazer uma comparação relativamente às características fenotípicas e genotípicas de estirpes de *E. coli* recuperadas de frangos provenientes dos dois sistemas de produção, tratando-se de uma bactéria comensal do trato gastrointestinal. É sabido que estas bactérias podem constituir um reservatório importante de determinantes de resistência a várias classes de antimicrobianos, os quais podem ser transmitidos quer por transferência vertical quer horizontal, na presença ou mesmo na ausência de pressão seletiva.

Com este estudo é possível concluir que:

- ✓ As prevalências de suscetibilidade reduzida são superiores nas estirpes comensais de *E. coli* e presumíveis produtoras de ESBL/AmpC de frango industrial para a maioria dos antibióticos testados, nomeadamente os CIA, tais como as fluoroquinolonas e macrólidos).
- ✓ O fenótipo ESBL é predominante sobre o fenótipo AmpC, sendo que o AmpC+ESBL foi identificado apenas em estirpes de *E. coli* de frango industrial.
- ✓ Os isolados multirresistentes (MDR) de frango industrial apresentam perfis de multirresistência mais diversos, e a um maior número de antimicrobianos em simultâneo. O perfil MDR mais comum nos isolados de *E. coli* provenientes de frango industrial inclui as cefalosporinas de 3^a geração, o que sugere que a co-resistência a vários antibióticos CIA é mais frequente nos isolados deste tipo de produção.
- ✓ Existem diferenças nos genes *bla* identificados nas estirpes dos dois regimes de produção. Nos isolados de *E. coli* de frango do campo as enzimas mais prevalentes responsáveis pelos fenótipos observados são SHV-12 e CTX-M-1, e nos de frango industrial são SHV-12 e CTX-55. O gene *bla*_{CTX-M-14} só foi identificado em

estirpes de *E. coli* de frango do sistema semi-intensivo, enquanto *bla*_{CTX-M-32}, *bla*_{CTX-M-9} e *bla*_{TEM-52} só foram detetados em estirpes de *E. coli* de frango industrial.

- ✓ A identificação do gene *mcr-1* numa estirpe isolada de animais produzidos em sistema intensivo poderá indicar que existe uma maior probabilidade de disseminação de resistência à colistina em estirpes de *E. coli* isoladas de aves neste regime produtivo.
- ✓ Os integrões predominantes pertencem à classe I, e encontram-se com maior frequência em isolados de *E. coli* de frango industrial, o que salienta o maior potencial de transferência horizontal de genes nestes isolados.
- ✓ A sequenciação do genoma completo (WGS) demonstrou ser uma ferramenta muito útil para a caracterização mais completa das estirpes, no que respeita a genes de resistência, de virulência, fatores de patogenicidade, serogrupo, identificação de elementos genéticos móveis como plasmídeos, e na determinação do filogruppo e dos *sequence types* (ST).

Em sùmula, este estudo confirma que os dois regimes de produção apresentam diferenças importantes na RAM em estirpes de *E. coli* que colonizam o intestino de frangos saudáveis que irão entrar na cadeia alimentar. Este estudo permite ainda realçar a importância da co-seleção de vários determinantes de resistência a CIA, devido à co-transferência de genes por transferência horizontal, pelo que se torna premente recorrer a uma estratégia holística, multidisciplinar e integrativa, envolvendo os vários intervenientes com o objetivo da diminuição conjunta de utilização de várias classes de antibióticos no sector da produção animal.

Considerando a importância da interdependência que existe entre a dimensão humana, animal e o ambiente, é imperativo adotar a abordagem Uma Só Saúde, de modo a tomar medidas que permitam preservar a eficácia dos antimicrobianos existentes, diminuindo o seu uso inadequado e limitando a disseminação de bactérias resistentes.

Bibliografía

Abbassi. M. S., Kilani. H., Abid. I., Sáenz. Y., Hynds. P., Lengliz. S., Chehida. N.B., & Boubaker. I.B. (2021). Genetic Background of Antimicrobial Resistance in Multiantimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Feces of Healthy Broiler Chickens in Tunisia. *BioMed Research International*. 2021:1-7. Doi: 10.1155/2021/1269849.

Ageevets. V., Lazareva. I., Mrugova. T., Gostev. V., Lobzin. Y., & Sidorenko. S. (2019). IncX4 plasmids harboring *mcr-1* genes: Further dissemination. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 18:166-167. Doi: 10.1016/j.jgar.2019.07.002.

Akrami. F, Rajabnia. M, & Pournajaf. A. (2019). Resistance integrons; A mini review. *Caspian Journal Internal Medicine*. 10(4): 370-376. Doi: 10.22088/cjim.10.4.370.

Aldred. K.J., Kerns.R.J, Osheroff. N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*. 53(10): 1565–1574. Doi: 10.1021/bi5000564.

Alegría, Á., Arias-Temprano, M., Fernández-Natal, I., Rodríguez-Calleja, J. M., García-López, M., & Santos, J. A. (2020). Molecular Diversity of ESBL-Producing *Escherichia coli* from Foods of Animal Origin and Human Patients. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 17(4):1312. Doi: 10.3390/ijerph17041312.

Alonso. C. A., Michael, G. B., Li, Jun; S. S., Simón, C., Wang, Y., Kaspar, H., Kadlec, K., Torres, C., & Schwarz, S. (2017). Analysis of *bla*_{SHV-12}-carrying *Escherichia coli* clones and plasmids from human, animal and food sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72(6):1589-1596. Doi: 10.1093/jac/dkx024.

Amador, P., Fernandes, R., Prudêncio, C., & Duarte, I. (2019). Prevalence of Antibiotic Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae* on Portuguese Livestock Manure. *Antibiotics*. 8(1): 23. Doi: 10.3390/antibiotics8010023.

Andriole, V. T. (2005). The Quinolones: Past, Present, and Future. *Clinical Infectious Diseases*. 41(Suplemento 2): S113–S119. Doi: 10.1086/428051.

Angers. A., Petrillo. M., Patak. A., Quercy. M., & Van den Eede. G. (2017). The Role and Implementation of Next-Generation Sequencing Technologies in the Coordinated Action Plan against Antimicrobial Resistance. *European Commission*. EUR 28619. Doi:

10.2760/745099. Disponível em <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/c6a53822-45ab-11e7-aea8-01aa75ed71a1/language-en>. Acedido em Abril de 2021.

Apostolakos, I., & Piccirillo, A. (2018). A review on the current situation and challenges of colistin resistance in poultry production. *Avian Pathology*. 47(6):546-558. Doi: 10.1080/03079457.2018.1524573.

Arsic, B., Barber, J., Čikoš, A., Mladenovic, M., Stankovic, N., & Novak, P. (2018). 16-membered macrolide antibiotics: a review. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 51(3): 283–298. Doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.05.020.

Babakhani S, & Oloomi M. (2018). Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of Basic Microbiology*. 58(11):905-917. Doi: 10.1002/jobm.201800204.

Beghain. J, Bridier-Nahmias. A, Le Nagard. H, Denamur. E., & Clermont. O. (2018) ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microbial genomics*. 4(7): e000192. Doi: 10.1099/mgen.0.000192.

Bergšpica. I., Kaprou. G., Alexa E.A., Prieto-Maradona. M., & Alvarez-Ordóñez. A. (2020). Identification of risk factors and hotspots of antibiotic resistance along the food chain using next-generation sequencing. *EFSA Journal*. 18 (Suplemento 1): e181107. Doi: 10.2903/j.efsa.2020.e181107.

Bischoff. K. M., White. D. G., Hume. M. E., Poole. T. L., & Nisbet, D. J. (2005). The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 243(1): 285–291. Doi: 10.1016/j.femsle.2004.12.017.

Blaak, H., van Hoek, A. H. A. M., Hamidjaja, R. A., van der Plaats, R. Q. J., Kerkhof-de Heer, L., de Roda Husman, A. M., & Schets, F. M. (2015). Distribution, Numbers, and Diversity of ESBL-Producing *E. coli* in the Poultry Farm Environment. *PLOS ONE*. 10(8): e0135402. Doi: 10.1371/journal.pone.0135402.

Blahna. M. T., Zalewski. C. A., Reuer. J., Kahlmeter. G., Foxman. B., & Marrs. C. F. (2006). The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim–sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57(4): 666–672. Doi: 10.1093/jac/dkl020.

Blair. J.M, Webber. M.A, Baylay .A.J, Ogbolu. D.O, Piddock. L.J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 13(1):42-51. Doi: 10.1038/nrmicro3380.

Bortolaia. V., Kaas. R. F., Ruppe. E., Roberts. M. C., Schwarz. S., Cattoir. V., Philippon. A., Allesoe. R. L., Rebelo. A. R, Florensa. A.R., Fagelhauer. L., Chakraborty. T., Neumann. B., Werner. G., Bender. J.K., Stingl. K., Nguyen. M., Coppens. J., Xavier. B. B., Malhotra-Kumar. S., Westh. H., Pinholt. M., Anjum. M. F., Duggett. N. A., Kempf. I., Nykäsenoja. S., Olkkola. S., Wieczorek. K., Amaro. A., Clemente. L., Mossong. J., Losch. S., Ragimbeau. C., Lund. O., & Aarestrup. F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 75(12): 3491-3500. Doi: 10.1093/jac/dkaa345.

Brolund. A., Sundqvist. M., Kahlmeter. G., & Grape. M. (2010). Molecular Characterisation of Trimethoprim Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a Two Year Intervention on Trimethoprim Use. *PLoS ONE*. 5(2): e9233. Doi: 10.1371/journal.pone.0009233.

Bryan, A., Shapi. N., & Sadowsky. M. J. (2004). Frequency and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in Genetically Diverse, Nonselected, and Nonclinical *Escherichia coli* Strains Isolated from Diverse Human and Animal Sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(4): 2503–2507. Doi: 10.1128/AEM.70.4.2503-2507.2004.

Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54(3): 969–976. Doi: 10.1128/AAC.01009-09.

Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 6(8): a025247. Doi: 10.1101/cshperspect.a025247.

Caniaux, I., van Belkum, A., Zambardi, G., Poirel, L., & Gros, M. F. (2016). MCR: modern colistin resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(3): 415–420. Doi: 10.1007/s10096-016-2846-y.

Canıça, M., Lu. C., Krishnamoorthy. R., & Paul. G. (1997). Molecular Diversity and Evolution of *bla* TEM Genes Encoding β -Lactamases Resistant to Clavulanic Acid in Clinical *E. coli*. *Journal of Molecular Evolution*. 44(1):57–65. Doi: 10.1007/pl00006121.

- Cantón, R., & Coque, T. M. (2006). The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*. 9(5): 466–475. Doi: 10.1016/j.mib.2006.08.011.
- Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*. 3:110. Doi: 10.3389/fmicb.2012.00110.
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*. 303(6-7): 298–304. Doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.001.
- Carattoli, A., Zankari, E., Garcia-Fernandez, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F. M., & Hasman, H. (2014) PlasmidFinder and pMLST: *in silico* detection and typing of plasmids. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 58(7): 3895-903. Doi: 10.1128/AAC.02412-14.
- CARD (2021). The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. Disponível em <https://card.mcmaster.ca/analyze/blast> . Acedido em Julho de 2021.
- Carneiro, C., Araújo, C., Gonçalves, A., Vinué, L., Somalo, S., Ruiz, E., Uliyakina, I., Rodrigues, J., Igrejas, G., Poeta, P., & Torres, C. (2010). Detection of CTX-M-14 and TEM-52 Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Fecal *Escherichia coli* Isolates of Captive Ostrich in Portugal. *Foodborne Pathogens and Disease*. 7(8): 991–994. Doi: 10.1089/fpd.2009.0494.
- Carvalho, I., Safia Chenouf, N., Cunha, R., Martins, C., Pimenta, P., Pereira, A. R., Martínez-Álvarez, S., Ramos, S., Silva, V., Igrejas, G., Torres, C., & Poeta, P. (2021). Antimicrobial Resistance Genes and Diversity of Clones among ESBL- and Acquired AmpC-Producing *Escherichia coli* Isolated from Fecal Samples of Healthy and Sick Cats in Portugal. *Antibiotics*. 10(3): 262. Doi: 10.3390/antibiotics10030262.
- CE (Comissão Europeia). (2017). Plano de Ação Europeu “Uma Só Saúde” contra a Resistência aos Agentes Antimicrobianos (RAM). Comunicação da Comissão ao Conselho e ao Parlamento Europeu. Disponível em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52017DC0339&from=PT>. Acedido em Abril de 2021.
- Ceccarelli, D., Kant, A., van Essen-Zandbergen, A., Dierikx, C., Hordijk, J., Wit, B., Mevius, D. J., & Veldman, K. T. (2019). Diversity of Plasmids and Genes Encoding Resistance to Extended Spectrum Cephalosporins in Commensal *Escherichia coli* From

Dutch Livestock in 2007–2017. *Frontiers in Microbiology*. 10:76. Doi: 10.3389/fmicb.2019.00076.

Clemente, L., Manageiro, V., Jones-Dias, D., Correia, I., Themudo, P., Albuquerque, T., Geraldes, M., Matos, F., Almendra, C., Ferreira, E., & Caniça, M. (2015) Antimicrobial susceptibility and oxymino- β -lactam resistance mechanisms in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from different animal sources. *Research in Microbiology*. 166(7):574-83. Doi: 10.1016/j.resmic.2015.05.007.

Clemente, L., Manageiro, V., Correia, I., Amaro, A., Albuquerque, T., Themudo, P., Ferreira, E., & Caniça, M. (2019). Revealing *mcr-1*-positive ESBL-producing *Escherichia coli* strains among *Enterobacteriaceae* from food-producing animals (bovine, swine and poultry) and meat (bovine and swine), Portugal, 2010–2015. *International Journal of Food Microbiology*. 296: 37–42. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.006.

Cormier, A., Zhang, P. L.C., Chalmers, G., Weese, J. S., Deckert, A., Mulvey, M., McAllister, T., & Boerlin, P. (2019). Diversity of CTX-M-positive *Escherichia coli* recovered from animals in Canada. *Veterinary Microbiology*. 231:71-75. Doi: 10.1016/j.vetmic.2019.02.031.

Costa. D., Vinué. L., Poeta. P., Coelho. A. C., Matos. M., Sáenez. Y., Somalo. S., Zaragaza. M., Rodrigues. J. & Torres. C. (2009). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in fecal samples in broilers. *Veterinary Microbiology*. 138(3-4): 339-344. Doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.029.

Costa, D., Poeta, P., Briñas, L., Sáenz, Y., Rodrigues, J., & Torres, C. (2004). Detection of CTX-M-1 and TEM-52 β -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54(5): 960–961. Doi: 10.1093/jac/dkh444.

Cottell. J.L., Webber. M.A., & Piddock. L.J. V. (2012). Persistence of transferable extended-spectrum- β -lactamase resistance in the absence of antibiotic pressure. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 56(9):4703–6. Doi: 10.1128/AAC.00848-12.

GGE (2021). Center for Genomic Epidemiology. Disponível em <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>. Acedido em Janeiro de 2021

Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3): 490–495. Doi: 10.1093/jac/dkp498.

Dandachi, I., Chabou, S., Daoud, Z., & Rolain, J-M. (2018). Prevalence and Emergence of Extended-Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram Negative Bacteria of Animal Origin in the Mediterranean Basin. *Frontiers in Microbiology*. 9: 2299. Doi: 10.3389/fmicb.2018.02299.

Decisão de Execução da Comissão de 12 de Novembro de 2013 relativa à vigilância e comunicação de dados sobre a resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas e comensais. *Jornal Oficial da União Europeia*. Comissão Europeia

Decreto-Lei nº 79/2010, de 25 de junho. *Diário da República* nº 122/2010- 1ª série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das pescas, Lisboa.

Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., & Yu, G. (2015). Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 14(1): 45. Doi: 10.1186/s12941-015-0100-6.

Dessie, H. K., Bae, D. H., & Lee, Y. J. (2013). Characterization of integrons and their cassettes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from poultry in Korea. *Poultry Science*. 92(11): 3036–3043. Doi: 10.3382/ps.2013-03312.

DGAV (2017). Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Relatório Nacional de Monitorização do Consumo de Antimicrobianos. Disponível em <https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2021/09/ESVAC-RELATORIO-2017.pdf>. Acedido em fevereiro de 2021

DGS/DGAV/APA (2019). Direção Geral de Saúde/ Direção Geral de Alimentação e Veterinária/ Agência Portuguesa do Ambiente. Plano Nacional de Combate à Resistência aos Antimicrobianos 2019-2023: “Uma Só Saude”. Disponível em: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/plano-nacional-de-combate-a-resistencia-aos-antimicrobianos-2019-2023-pdf.aspx>. Acedido em fevereiro de 2021.

Díaz-Jiménez, D., García-Meniño, I., Herrera, A., García, V., López-Beceiro, A. M., Alonso, M. P., Blanco, J., & Mora, A. (2020). Genomic Characterization of *Escherichia coli* Isolates Belonging to a New Hybrid aEPEC/ExPEC Pathotype O153:H10-A-ST10

eae-beta1 Occurred in Meat, Poultry, Wildlife and Human Diarrheagenic Samples. *Antibiotics*. 9(4): 192. Doi: 10.3390/antibiotics9040192.

Dimopoulos, G., Kollef, M. H., & Cohen, J. (2016). In 2035, will all bacteria be multiresistant? Yes. *Intensive Care Medicine*. 42(12): 2014–2016. Doi: 10.1007/s00134-016-4310-y.

ECDC (2020a). European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net). *Annual Epidemiological Report 2019*. Disponível em <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2019>. Acedido em Março de 2021.

ECDC (2020b). European Center for Disease Prevention and Control. Disponível em <https://antibiotic.ecdc.europa.eu/en>. Acedido em Fevereiro de 2021.

EFSA (2011). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food producing animals: ESBL/AmpC in food-producing animals and foods. *EFSA Journal*. 9(8): 2322. Doi: 10.2903/j.efsa.2011.2322.

EFSA (2020). European Food Safety Authority. Disponível em <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/antimicrobial-resistance>. Acedido em Março de 2021.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2021). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSA Journal*. 19(4):6490. Doi:10.2903/j.efsa.2021.6490

Elizabeth. R., Chanda. D.D., Chakravarty. A., Paul. D., Chetri. S., Bhowmik. D., Wangkheimayum. J., & Bhattacharjee. A. (2018). Association of Glycerol Kinase Gene with Class 3 Integrons: A Novel Cassette Array within *Escherichia coli*. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 36:104-107. Doi: 10.4103/ijmm.IJMM_17_188.

EMA (2016a). European Medicines Agency. Advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals (colistin) following the recente discovery of the first mobile colistin resistance gene (*mcr-1*). Disponível em <https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/call-scientific-data-update-advice->

impact-public-health-animal-health-use-antibiotics-animals_en.pdf. Acedido em Setembro de 2021.

EMA (2016b). European Medicines Agency. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. Disponível em https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/updated-advice-use-colistin-products-animals-within-european-union-development-resistance-possible_en-0.pdf. Acedido em Abril de 2021

EMA (2020). European Medicines Agency. Categorisation of antibiotics used in animals promotes responsible use to protect public and animal health. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/infographic-categorisation-antibiotics-use-animals-prudent-responsible-use_en.pdf. Acedido em Fevereiro de 2021.

EMA/ESVAC (2020). European Medicines Agency/ European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018. Disponível em https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report_en.pdf. Acedido em Outubro de 2021.

Emmerson. A. M & Jones. A. M. (2003). The Quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51(Suplemento 1): 13-20. Doi: 10.1093/jac/dkg208.

EUCAST (2020). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disponível em <https://eucast.org/>. Acedido em Outubro de 2021.

Ewers. C, de Jong. A, Prenger-Berninghoff. E, El Garch. F., Leidner. U., Tiwari. S.K., & Semmler. T. (2021) Genomic Diversity and Virulence Potential of ESBL-and AmpC- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains From Healthy Food Animals Across Europe. *Frontiers in Microbiology*. 12:626774. Doi: 10.3389/fmicb.2021.626774.

Fisher. J. F., & Mobashery. S. (2020). Constructing and Deconstructing the Bacterial Cell Wall. *Protein Science*. 29(3):629-646. Doi: 10.1002/pro.3737.

- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 3(9): 722–732. Doi: 10.1038/nrmicro1235.
- García-Fernández, A., Chiaretto, G., Bertini, A., Villa, L., Fortini, D., Ricci, A., & Carattoli, A. (2008). Multilocus sequence typing of IncII plasmids carrying extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61(6): 1229–1233. Doi: 10.1093/jac/dkn131.
- García-Meniño, I., García, V., Mora, A., Díaz-Jiménez, D., Flament-Simon, S. C., Alonso, M. P., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2018). Swine Enteric Colibacillosis in Spain: Pathogenic Potential of *mcr-1* ST10 and ST131 *E. coli* Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 9:2659. Doi: 10.3389/fmicb.2018.02659.
- Gillings, M. R. (2014). Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 78(2): 257–277. Doi: 10.1128/MMBR.00056-13.
- Gomes, C., Martínez-Puchol, S., Palma, N., Horna, G., Ruiz-Roldán, L., Pons, M, J., & Ruiz, J. (2017). Macrolide resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*: Focus on azithromycin. *Critical Reviews in Microbiology*. 43(1):1-30. Doi: 10.3109/1040841X.2015.1136261.
- Gomes, C., Ruiz-Roldán, L., Mateu, J., Ochoa, T. J., & Ruiz, J. (2019). Azithromycin resistance levels and mechanisms in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*. 9(1): 6089. Doi: 10.1038/s41598-019-42423-3.
- Gonçalves, A., Igrejas, G., Radhouani, H., Estepa, V., Pacheco, R., Monteiro, R., Brito, F., Guerra, A., Petrucci-Fonseca, F., Torres, C., & Poeta, P. (2012). Iberian Wolf as a Reservoir of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* of the TEM, SHV, and CTX-M Groups. *Microbial Drug Resistance*. 18(2): 215–219. Doi: 10.1089/mdr.2011.0145.
- Gundran, R. S., Cardenio, P. A., Villanueva, M. A., Sison, F. B., Benigno, C. C., Kreausukon, K., Pichpol, D., & Punyapornwithaya, V. (2019). Prevalence and distribution of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. *BMC Veterinary Research*. 15(1): 227. Doi: 10.1186/s12917-019-1975-9.

- Gurwitz, D. (2018). Whole-genome sequencing for combatting antibiotic resistance. *Drug Development Research*. 80(1):3-5. Doi: 10.1002/ddr.21496.
- Haenni, M., Châtre, P., & Madec, J.-Y. (2014). Emergence of *Escherichia coli* producing extended-spectrum AmpC β -lactamases (ESAC) in animals. *Frontiers in Microbiology*, 5:53. Doi: 10.3389/fmicb.2014.00053.
- Haenni, M., Beyrouthy, R., Lupo, A., Châtre, P., Madec, J.-Y., & Bonnet, R. (2017). Epidemic spread of *Escherichia coli* ST744 isolates carrying *mcr-3* and *bla_{CTX-M-55}* in cattle in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 73(2): 533–536. Doi: 10.1093/jac/dkx418.
- Hao, H., Sander, P., Iqbal, Z., Wang, Y., Cheng, G., & Yuan, Z. (2016). The Risk of Some Veterinary Antimicrobial Agents on Public Health Associated with Antimicrobial Resistance and their Molecular Basis. *Frontiers in Microbiology*. 7:1626. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01626.
- Hasman, H., Saputra, D., Sicheritz-Ponten, T., Lund, O., Svendsen, C. A., Frimodt-Møller, N., & Aarestrup, F. M. (2014). Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 52(1):139-46. Doi: 10.1128/JCM.02452-13.
- Hassen, B., Abbassi, M. S., Ruiz-Ripa, L., Mama, O. M., Hassen, A., Torres, C., & Hammami, S. (2020). High prevalence of *mcr-1* encoding colistin resistance and first identification of *bla_{CTX-M-55}* in ESBL/CMY-2-producing *Escherichia coli* isolated from chicken faeces and retail meat in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*, 318: 108478. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108478.
- Hayer, S. S., Lim, S., Hong, S., Elnekave, E., Johnson, T., Rovira, A., Vannucci, F., Clayton, J. B., Perez, A. & Alvarez, J. (2020). Genetic Determinants of Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporin and Fluoroquinolone in *Escherichia coli* Isolated from Diseased Pigs in the United States. *mSphere*. 5(5):e00990-20. Doi: 10.1128/mSphere.00990-20.
- Huijbers, P. M. C., Graat, E. A. M., Haenen, A. P. J., van Santen, M. G., van Essen-Zandbergen, A., Mevius, D. J., van Duijkeren, E., & van Hoek, A. H. A. M. (2014). Extended-spectrum and AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and people living and/or working on broiler farms: prevalence, risk factors and

molecular characteristics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69(10): 2669–2675. Doi: 10.1093/jac/dku178.

Hussein. N. H., AL-Kadmy. I. M. S., Taha. B. M., & Hussein, J. D. (2021). Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Molecular Biology Reports*. 48(3): 2897–2907. Doi: 10.1007/s11033-021-06307-y.

Impey. R. E., Hawkins. D. A., Sutton. J. M., & Soares da Costa. T. P. (2020). Overcoming Intrinsic and Acquired Resistance Mechanisms Associated with the Cell Wall of Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*. 9(9): 623. Doi: 10.3390/antibiotics9090623.

INIAV (2020). Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária. Disponível em <https://projects.iniaiv.pt/ciainvet/>. Acedido em Março de 2020.

Irrgang, A., Hammerl, J. A., Falgenhauer, L., Guiral, E., Schmogger, S., Imirzalioglu, C., Fischer, J., Guerra, B., Chakraborty, T., & Käsbohrer, A. (2018). Diversity of CTX-M-1-producing *E. coli* from German food samples and genetic diversity of the *bla*_{CTX-M-1} region on IncI1 ST3 plasmids. *Veterinary Microbiology*, 221: 98–104. Doi: 10.1016/j.vetmic.2018.06.003.

Jacoby. G. A. (2009). AmpC β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 22(1): 161–182. Doi: 10.1128/CMR.00036-08.

Javed, H., Saleem, S., Zafar, A., Ghafoor, A., Shahzad, A. B., Ejaz, H., Junaid, K., & Jahan, S. (2020). Emergence of plasmid-mediated *mcr* genes from Gram-negative bacteria at the human-animal interface. *Gut Pathogens*. 12(1):54. Doi: 10.1186/s13099-020-00392-3.

Joensen., K. G., Tetzschner. A. M., Iguchi. A., Aarestrup. F. M., & Scheutz. F. (2015). Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* using whole genome sequencing (WGS) data. *Journal of Clinical Microbiology*. 53(8):2410-2426. Doi: 10.1128/JCM.00008-15.

Jones-Dias, D., Manageiro, V., Ferreira, E., Barreiro, P., Vieira, L., Moura, I. B., & Caniça, M. (2016). Architecture of Class 1, 2, and 3 Integrons from Gram Negative Bacteria Recovered among Fruits and Vegetables. *Frontiers in Microbiology*. 7:1400. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01400.

- Kargar, M., Mohammadalipour, Z., Doosti, A., Lorzadeh, S., & Japoni-Nejad, A. (2014). High Prevalence of Class 1 to 3 Integrons Among Multidrug-Resistant Diarrheagenic *Escherichia coli* in Southwest of Iran. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 5(4): 193–198. Doi: 10.1016/j.phrp.2014.06.003.
- Kim, J., Bae, I. K., Jeong, S. H., Chang, C. L., Lee, C. H., & Lee, K. (2011). Characterization of IncF plasmids carrying the *bla*_{CTX-M-14} gene in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66(6): 1263–1268. Doi: 10.1093/jac/dkr106.
- Köck, R., Daniels-Haardt, I., Becker, K., Mellmann, A., Friedrich, A. W.; Mevius, D., Schwarz, S., Jurke, A. (2018). Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in wildlife, food-producing and companion animals – a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection*. 24(12):1241-1250. Doi: 10.1016/j.cmi.2018.04.004.
- Kong, H-K., Pan, Q., Lo, W-U., Liu, X., Law, C. O. K., Chan, T-f., Ho, P-L., Lau, T. C-K. (2018). Fine-tuning carbapenem resistance by reducing porin permeability of bacteria activated in the selection process of conjugation. *Scientific Reports*. 8(1): 15248. Doi: 10.1038/s41598-018-33568-8.
- Lalak, A., Wasyl, D., Zajac, M., Skarzyńska, M., Hoszowski, A., Samcik, I., Woźniakowski, G., & Szulowski, K. (2016). Mechanisms of cephalosporin resistance in indicator *Escherichia coli* isolated from food animals. *Veterinary Microbiology*. 194:69-73. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.01.023.
- Lammie, S. L., & Hughes, J. M. (2016). Antimicrobial Resistance, Food Safety, and One Health: The Need for Convergence. *Annual Review of Food Science and Technology*. 7(1): 287–312. Doi: 10.1146/annurev-food-041715-033251.
- Larsen, M., Cosentino, S., Rasmussen, S., Rundsten, C., Hasman, H., Marvig, R., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D., Aarestrup, F., & Lund, O. (2012). Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 50(4): 1355-1361. Doi: 10.1128/JCM.06094-11.
- Leão, C., Clemente, L., Guerra, V., Botelho, A., & Amaro, A. (2021). Occurrence of a Rare Multidrug Resistant *Escherichia coli* Coharboring *bla*_{CTX-M-32} and *bla*_{CTX-M-2} Genes in a Bovine. *Microbial Drug Resistance*. 27(8):1155-1157. Doi: 10.1089/mdr.2020.0520.

- Lerminiaux, N. A & Cameron. A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*. 65(1):34-44. Doi: 10.1139/cjm-2018-0275.
- Li, X-Z., Plésiat. P., & Nikado. H. (2015). The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 28(2): 337-418. Doi: 10.1128/CMR.00117-14.
- Literak, I., Reitschmied, T., Bujnakova, D., Dolejska, M., Cizek, A., Bardon, J., Pokludova, L., Alexa, P., Halova, D., & Jamborova. I. (2013). Broilers as a source of quinolone-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in the Czech Republic. *Microbial Drug Resistance*. 19(1): 57–63. Doi: 10.1089/mdr.2012.0124.
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 16(2): 161-168. Doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
- Liu, Y., & Liu. J-H. (2018). Monitoring colistin resistance in food animals: An Urgent Threat. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 16(6): 443-336. Doi: 10.1080/14787210.2018.1481749.
- Liu, X., Wei, X., Liu, L., Feng, X., Shao, Z., Han, Z., & Li, Y. (2020). Prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* from broiler chickens at different day-age. *Poultry Science*. 99(7):3688-3696. Doi: 10.1016/j.psj.2020.04.015.
- Löhren, U., Ricci, A., & Cummings, T. S. (2009). Guidelines for Antimicrobial Use in Poultry. In *Guide to Antimicrobial Use in Animals*, ed. Guardabassi, L., Jensen, L. B., & Kruse, H. Chichester, UK, ISBN: 9781444302639, pp 126–142.
- Machado. E., Canton. R., Baquero. F., Galan. J.-C., Rollan. A., Peixe. L., & Coque. T. M. (2005). Integron Content of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains over 12 Years in a Single Hospital in Madrid, Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(5): 1823–1829. Doi: 10.1128/AAC.49.5.1823-1829.2005.

Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., Sousa, J. C., & Peixe, L. (2008). Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 62(2): 296–302. Doi: 10.1093/jac/dkn179.

Magiorakos. A.P., Srinivasan. A., Carey. R.B., Carmeli. Y., Falagas. M.E., Giske. C.G., Harbarth. S., Hindler. J.F., Kahlmeter. G., Olsson-Liljequist. B., Paterson. D.L., Rice. L.B., Stelling. J., Struelens. M.J., Vatopoulos. A., Weber. J.T., Monnet. D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 18(3):268-281. Doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

Magnusson, U., Sternberg. S., Eklund. G., e Rozstalnyy. A. (2019). Prudent and efficient use of antimicrobials in pigs and poultry. *FAO Animal Production and Health Manual*. 23: 1-44. Doi: 10.4060/CA6729EN.

Mammeri, H., Poirel. L., Fortineau. N., & Nordmann. P. (2006). Naturally occurring extended-spectrum cephalosporinases in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 50(7): 2573–2576. Doi: 10.1128/AAC.01633-05.

Manageiro (2011). Dynamics of β -lactamases in Gram-negative bacteria. Tese de doutoramento em Biologia (Microbiologia), Universidade de Lisboa, Portugal, pp. 77.

Manageiro, V., Clemente, L., Graça, R., Correia, I., Albuquerque, T., Ferreira, E., & Caniça. M. (2017). New insights into resistance to colistin and third-generation cephalosporins of *Escherichia coli* in poultry, Portugal: Novel *bla*_{CTX-M-166} and *bla*_{ESAC} genes. *International Journal of Food Microbiology*. 263: 67–73. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.007.

Marcadé, G., Deschamps, C., Boyd, A., Gautier, V., Picard, B., Branger, C., Denamur, E., & Arlet, G. (2008). Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 63(1): 67–71. Doi: 10.1093/jac/dkn428.

Mehdi, Y., Létourneau-Montminy, M.-P., Gaucher, M.-L., Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., Brar. S. K., Côté. C., Ramirez. A. A., & Godbout, S. (2018). Use of antibiotics

in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*. 4(2): 170–178. Doi: 10.1016/j.aninu.2018.03.002.

Meireles, D., Leite-Martins, L., Bessa, L.J., Cunha, S., Fernandes, R., de Matos, A., Manaia, C.M., Martins da Costa, P. (2015). Molecular characterization of quinolone resistance mechanisms and extended-spectrum β -lactamase production in *Escherichia coli* isolated from dogs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 41:43-8. Doi: 10.1016/j.cimid.2015.04.004.

Mendonça, N., Leitão, J., Manageiro, V., Ferreira, E., & Caniça M. (2007). Spread of extended-spectrum β -lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(6):1946–55. Doi: 10.1128/AAC.01412-06.

Mohr, K. I. (2016). History of Antibiotics Research. In *How to Overcome the Antibiotic Crisis*. Ed Stadler M., Dersch P. Cham, Suíça. ISBN: 978-3-319-49282-7, pp-237-262

Møller, T. S. B., Overgaard, M., Nielsen, S. S., Bortolaia, V., Sommer, M. O. A., Guardabassi, L., & Olsen, J. E. (2016). Relation between *tetR* and *tetA* expression in tetracycline resistant *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*. 16:39. Doi: 10.1186/s12866-016-0649-z.

Mourand, G., Le Devendec, L., Delannoy, S., Fach, P., Keita, A., Amelot, M., Jaunet, H., Dia, M. E. H., & Kempf, I. (2020). Variations of the *Escherichia coli* population in the digestive tract of broilers. *Avian Pathology*. 49(6):678-688. Doi: 10.1080/03079457.2020.1814201.

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. In *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens (5ª edição)*. Ed Kudva, I. T. Cornick, N, A., Plummer, P, J., Zhang, Q., Nicholson, T, L., Bannantine, J, P., Bellaire, B, H. Whashington DC, USA, ISBN: 978-1-555-81927-9. pp 481–511.

NCBI (2021). National Center for Biotechnology Information. Disponível em https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch. Acedido em Junho de 2021

Niero, G., Bortolaia, V., Vanni, M., Intorre, L., Guardabassi, L., & Piccirillo, A. (2018). High diversity of genes and plasmids encoding resistance to third-generation

cephalosporins and quinolones in clinical *Escherichia coli* from commercial poultry flocks in Italy. *Veterinary Microbiology*. 216: 93–98. Doi: 10.1016/j.vetmic.2018.02.012.

Obeng, A. S., Rickard, H., Ndi, O., Sexton, M., & Barton, M. (2012). Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. *Veterinary Microbiology*. 154(3-4): 305–315. Doi: 10.1016/j.vetmic.2011.07.010.

OIE (2007). World Organization for Animal Health. List of Antimicrobials of Veterinary Importance. disponível em https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_May2018.pdf. Acedido em Setembro de 2021.

OIE (2016). World Organization for Animal Health. The OIE Strategy on Antimicrobial Resistance and the Prudent Use of Antimicrobials. Disponível em <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/en-oie-amrstrategy.pdf>. Acedido em Março de 2021.

Olsen, R. H., Bisgaard, M., Löhren, U., Robineau, B., & Christensen, H. (2014). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. *Avian Pathology*. 43(3): 199–208. Doi: 10.1080/03079457.2014.907866.

Oteo, J., Diestra, K., Juan, C., Bautista, V., Novais, Â., Pérez-Vázquez, M., Moyá, B., Miró, E., Coque, T. M., Oliver, A., Cantón, R., Navarro, F., & Campos, J. (2009). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 34(2): 173–176. Doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.03.006.

Perrin-Guyomard, A., Jouy, E., Urban, D., Chauvin, C., Granier, S. A., Mourand, G., Chevance, A., Adam, C., Moulin, G., & Kempf, I. (2020). Decrease in fluoroquinolone use in French poultry and pig production and changes in resistance among *E. coli* and *Campylobacter*. *Veterinary Microbiology*. 243: 108637. Doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108637.

Pesciaroli, M., Magistrali, C. F., Filippini, G., Epifanio, E. M., Lovito, C., Marchi, L., Maresca, C., Massacci, F. R., Orsini, S., Scoccia, E., Tofani, S., & Pezzotti, G.

(2020). Antibiotic-resistant commensal *Escherichia coli* are less frequently isolated from poultry raised using non-conventional management systems than from conventional broiler. *International Journal of Food Microbiology*. 314:108391. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108391.

Pietsch, M., Irrgang, A., Roschanski, N., Brenner M. G., H. A., Rieber, H., Käsbohrer, A., Schwarz, S., Rösler, U., Kreienbrock, L., Pfeifer, Y., Fuchs, S., & Werner, G. (2018). Whole genome analyses of CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food in Germany. *BMC Genomics*. 19(1): 601. Doi: 10.1186/s12864-018-4976-3.

Poeta, P., Radhouani, H., Igrejas, G., Goncalves, A., Carvalho, C., Rodrigues, J. Vinué, L., Somalo, S., & Torres, C. (2008). Seagulls of the Berlengas Natural Reserve of Portugal as Carriers of Fecal *Escherichia coli* Harboring CTX-M and TEM Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(23): 7439–7441. Doi: 10.1128/AEM.00949-08.

Poirel, L., & Nordmann, P. (2016). Emerging plasmid-encoded colistin resistance: the animal world as the culprit? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(8): 2326–2327. Doi: 10.1093/jac/dkw074.

Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polimixins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromossomes. *Clinical Microbiology Reviews* 30(2): 557-596. Doi: 10.1128/CMR.00064-16.

Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*. 6(4). Doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.

Ramos, S., Silva, N., Dias, D., Sousa, M., Capelo-Martinez, J. L., Brito, F., Caniça, M., Igrejas, G., & Poeta, P. (2013). Clonal Diversity of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Pigs at Slaughter Level in Portugal. *Foodborne Pathogens and Disease*. 10(1): 74–79. Doi: 10.1089/fpd.2012.1173.

Rasheed, J. K., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., Steward, C., Hill, B., Medeiros, A. A., & Tenover, F. C. (1997). Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of

bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41(3): 647–653. Doi: 10.1128/AAC.41.3.647.

Ray, S., Das, S., & Suar, M. (2017). Molecular Mechanism of Drug Resistance. *Drug Resistance in Bacteria, Fungi, Malaria, and Cancer*. 22: 47–110. Doi: 10.1007/978-3-319-48683-3_3.

Rebelo, A, R-, Bortolaia, V., Kjeldgaard, J,S., Pedersen, S,K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I,M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J,A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S,A., De Frutos, Escobar, C., Malhotra-Kumar, S., Villa, L., Carattoli, A., & Hendriksen, R,S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance*. 23(6):17-00672. Doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672.

Regulamento nº 543/2008, de 16 de junho que estabelece regras de execução do Regulamento (CE) nº 1234/2007 do Conselho no que respeita às normas de comercialização para a carne de aves de capoeira. *Jornal Oficial da União Europeia*. Comissão Europeia (CE).

Rodrigues, C., Machado, E., Peixe, L., & Novais, A. (2013). IncI1/ST3 and IncN/ST1 plasmids drive the spread of *bla*_{TEM-52} and *bla*_{CTX-M-1/-32} in diverse *Escherichia coli* clones from different piggeries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68(10):2245-2248. Doi: 10.1093/jac/dkt187.

Roth. N., Kasbohrer. A., Mayrhofer. S., Zitz. U., Hofacre. C., & Doming. K. J. (2019). The application in broiler production and resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global Overview. *Poultry Science*. 98:1791-1804. Doi: 10.3382/ps/pey539.

Rozwandowicz, M., Brouwer. M. S. M., Fischer. J., Wagenaar. J. A., Gonzalez-Zorn. B., Guerra, B., Mevius. D.J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 73(5): 1121–1137. Doi: 10.1093/jac/dkx488.

Rusch, M., Spielmeyer. A., Zorn. H., & Hamscher. G. (2019). Degradation and transformation of fluoroquinolones by microorganisms with special emphasis on ciprofloxacin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103: 6933-6948. Doi: 10.1007/s00253-019-10017-8.

- Saenz, Y., Zarazaga, M., Briñas, L., Larrea-Ruiz, F., & Torres, C. (2003). Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51(4): 1001–1005. Doi: 10.1093/jac/dkg168.
- Saliu, E., Vahjen, W., & Zentek, J. (2017). Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in poultry. *Animal Health Research Reviews*. 18(1):46-57. Doi: 10.1017/S1466252317000020.
- Sawa, T., Kooguchi, K., & Moriyama, K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*. 8:13. Doi: 10.1186/s40560-020-0429-6.
- Schink, A.-K., Kadlec, K., Kaspar, H., Mankertz, J., & Schwarz, S. (2013). Analysis of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates collected in the GERM-Vet monitoring programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68(8): 1741–1749. Doi: 10.1093/jac/dkt123.
- Shafiq, M., Huang, J., Shah, J. M., Ali, I., Rahman, S. U., & Wang, L. (2021). Characterization and resistant determinants linked to mobile elements of ESBL-producing and *mcr-1*-positive *Escherichia coli* recovered from the chicken origin. *Microbial Pathogenesis*. 150: 104722. Doi: 10.1016/j.micpath.2020.104722.
- Shigemura, K., Tanaka, K., Yamamichi, F., Shirakawa, T., Miyake, H., & Fujisawa, M. (2012). Does mutation in *gyrA* and/or *parC* or efflux pump expression play the main role in fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* urinary tract infections?: A statistical analysis study. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 40(6): 516–520. Doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.07.019.
- Silva, N., Costa, L., Gonçalves, A., Sousa, M., Radhouani, H., Brito, F., Igrejas, G., & Poeta, P. (2012). Genetic characterisation of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from retail chicken products including CTX-M-9 containing isolates: a food safety risk factor. *British Poultry Science*. 53(6): 747–755. Doi: 10.1080/00071668.2012.740554.
- Soufi, L., Sáenz, Y., Vinué, L., Abbassi, M. S., Ruiz, E., Zarazaga, M., Hassan, A. B., Hammami, S., & Torres, C. (2011). *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir

of sulphonamide resistance genes and integrons. *International Journal of Food Microbiology*. 144(3): 497–502. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.008.

Sousa, M., Torres, C., Barros, J., Somalo, S., Igrejas, G., & Poeta, P. (2011). Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) as Carriers of SHV-12 and TEM-52 Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Containing *Escherichia coli* Isolates. *Foodborne Pathogens and Disease*. 8(10): 1139–1141. Doi: 10.1089/fpd.2011.0866.

Sreejith, S., Shajahan. S., Prathiush. P. R., Anjana. V. M., Viswanathan. A., Chandran. V., Ajith Kumar. G.S., Jayachandran. R., Mathew. J., & Radhakrishnan, E. K. (2020). Healthy broilers disseminate antibiotic resistance in response to tetracycline input in feed concentrates. *Microbial Pathogenesis*. 149:104562. Doi: 10.1016/j.micpath.2020.104562.

Stedt, J., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Waldenström, J., McMahon, B. J., Tolf, C., Olsen, B., & Drobni. M. (2015). Carriage of CTX-M type extended spectrum β -lactamases (ESBLs) in gulls across Europe. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57(1): 74. Doi: 10.1186/s13028-015-0166-3.

Sun, J., Zhang, H., Liu, Y-H., & Feng, Y. (2018). Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends in Microbiology*. 26(9):794-808. Doi: 10.1016/j.tim.2018.02.006.

Tangden, T., Adler, M., Cars, O., Sandegren, L., & Lowdin, E. (2013). Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an in vitro pharmacokinetic model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68(6): 1319–1326. Doi: 10.1093/jac/dkt044.

Tracz. D. M., Boyd. D. A., Hizon. R., Bryce. E., McGeer. A., Ofner-Agostini, M. Simor. A. E., Paton. S., & Mulvey. M. R. (2007). *ampC* gene expression in promoter mutants of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *FEMS Microbiology Letters*. 270(2): 265–271. Doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00672.x.

Udaondo, Z., & Huertas, M. J. (2020). Fighting the enemy: one health approach against microbial resistance. *Microbial Biotechnology*. 13(4): 888–891. Doi: 10.1111/1751-7915.13587.

Van Hoek, A. H.A.M., Stalenhoef, J E., Duijkeren, E van., & Franz, E, (2016). Comparative virulotyping of extended-spectrum cephalosporin-resistant *E. coli* isolated from broilers, humans on broiler farms and in the general population and UTI patients.. *Veterinary Microbiology*. 194:55-61. Doi: 10.1016/j.vetmic.2016.04.008.

Van Hoek, A. H A M., Dierikx, C., Bosch, T., Schouls, L., van Duijkeren, E., Visser, & M. (2020). Transmission of ESBL-producing *Escherichia coli* between broilers and humans on broiler farms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 75(3):543-549. Doi: 10.1093/jac/dkz507.

Vanni, M., Meucci, V., Tognetti, R., Cagnardi, P., Montesissa, C., Piccirillo, A. Rossi. A. M., Di Bello. D., & Intorre, L. (2014). Fluoroquinolone resistance and molecular characterization of *gyrA* and *parC* quinolone resistance-determining regions in *Escherichia coli* isolated from poultry. *Poultry Science*. 93(4): 856–863. Doi: 10.3382/ps.2013-03627.

Warner, D. M., Yang, Q., Duval, V., Chen, M., Xu, Y., & Levy, S. B. (2013). Involvement of MarR and YedS in Carbapenem Resistance in a Clinical Isolate of *Escherichia coli* from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57(4):1935–1937. Doi: 10.1128/AAC.02445-12.

Wei, B., Ke S. C., Zhang. J., Jang. H., & Kang. M. (2021). Genetic diversity of extended-spectrum cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* and *E. coli* isolates in a single broiler chicken. *Veterinary Microbiology*. 254:109010. Doi: 10.1016/j.vetmic.2021.109010.

Woolhouse, M., Ward, M., van Bunnik, B., & Farrar, J. (2015). Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 370(1670): 20140083. Doi: 10.1098/rstb.2014.0083.

WHO (2011). World Health Organization. Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. Disponível em <https://www.euro.who.int/en/publications/abstracts/tackling-antibiotic-resistance-from-a-food-safety-perspective-in-europe>. Acedido em Março de 2021.

WHO (2015). World Health Organization. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Disponível em <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>. Acedido em Fevereiro de 2021.

WHO/FAO/OIE. (2016). World Health Organization/Food and Agriculture Organization/World Organization for Animal Health. Antimicrobial Resistance: A Manual for Developing National Action Plans, versão 1. Disponível em <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204470>. Acedido em Março de 2021.

WHO. (2019). World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine: 6th revision. Disponível em <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528>. Acedido em Janeiro de 2021.

WHO (2020). World Health Organization. Disponível em <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>. Acedido em Abril de 2021.

Yaqoob, M., Wang, L. P., Kashif, J., Memon, J., Umar, S., Iqbal, M. F., Fiaz, M., & Lu, C.-P. (2018). Genetic characterization of phenicol-resistant *Escherichia coli* and role of wild-type repressor/regulator gene (*acrR*) on phenicol resistance. *Folia Microbiologica*. 63(4): 443–449. Doi: 10.1007/s12223-017-0579-7.

Yoon, M. Y., Kim, Y. B., Ha, J. S., Seo, K. W., Noh, E. B., Son, S. H., & Lee, Y. J. (2020). Molecular characteristics of fluoroquinolone-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. *Poultry Science*. 99(7): 3628–3636. Doi: 10.1016/j.psj.2020.03.029.

Anexo

Tabela suplementar 1-*Primers* e programas de amplificação utilizados na detecção dos genes *bla* que codificam as β-lactamases ESBL e AmpC plasmídicas, dos genes plasmídicos codificadores de resistência à colistina, e dos EGMs através de PCR multiplex.

Gene alvo	Primers (volume em µl)	Sequência nucleotídica (5' → 3')	Produto amplificado (bp)	Programa de amplificação	Temperatura de hibridação	Referência
<i>bla</i> _{CTX-M-Grupo1}	0,5 de MultiCTXMGP1_F 0,25 de MultiCTXMGP1-2_R	TTAGGAARTGTGCCGCTGY A ^a CGATATCGTTGGTGGTRCC AT ^a	688	Pré desnaturação: 95°C 5 min Desnaturação: 95°C 40 seg Hibridação: 55°C 40 seg Extensão: 72°C 60 seg Extensão final: 72°C 7 min } 30 ciclos	60°C	Danelle <i>et al.</i> , 2010
<i>bla</i> _{CTX-M-Grupo2}	0,25 de MultiCTXMGP2_F 0,25 de MultiCTXMGP1-2_R	CGTTAACGGCACGATGAC CGATATCGTTGGTGGTRCC AT ^a	404		60°C	Danelle <i>et al.</i> , 2010
<i>bla</i> _{CTX-M-Grupo9}	0,5 de MultiCTXMGP9_F 0,5 de MultiCTXMGP9_R	TCAAGCCTGCCGATCTGGT TGATTCTCGCCGCTGAAG	561		60°C	Danelle <i>et al.</i> , 2010
<i>bla</i> _{CTX-M-Grupo8/25}	0,5 de CTX-Mg8/25_F 0,5 de CTX-Mg8/25_R	AACRCRCAGACGCTCTAC ^a TCGAGCCGGAASGTGYAT ^a	326	Pré desnaturação: 95°C 5 min Desnaturação: 95°C 40 seg Hibridação: 55°C 40 seg Extensão: 72°C 60 seg Extensão final: 72°C 7 min } 30 ciclos	60°C	Danelle <i>et al.</i> , 2010
<i>bla</i> _{Tipo-TEM}	0,5 de PrimerTEM_F 0,5 de PrimerTEM_R	CATTTCCGTGTCGCCCTTAT TC CGTTCATCCATAGTTGCCT GAC	800	Pré desnaturação: 95°C 5 min Desnaturação: 95°C 40 seg Hibridação: 55°C 40 seg Extensão: 72°C 60 seg Extensão final: 72°C 7 min } 30 ciclos	60°C	Danelle <i>et al.</i> , 2010
<i>bla</i> _{Tipo-SHV}	0,5 de PrimerSHV_F 0,5 de PrimerSHV_R	AGCCGCTTGAGCAAATTAA AC ATCCCGCAGATAAATCACC AC	713		60°C	Danelle <i>et al.</i> , 2010

^ay=T ou C; R=A ou G; S=G ou C; D= A ou G ou T

Tabela suplementar 1- continuação

<i>bla</i> _{Tipo-OXA}	0,5 de PrimerOXA_F 0,5 de PrimerOXA_R	GGCACCAGATTCAACTTTC AAG GACCCCAAGTTTCCTGTAA GTG	564		60°C	Danelle <i>et al.</i> , 2010
<i>bla</i> _{Tipo-FOX}	0,625 de MultiCaseFOX_F 0,625 de MultiCaseFOX_R	CTACAGTGCGGGTGGTTT CTATTTGCGGCCAGGTGA	162	Pré desnaturação: 95°C 5 min Desnaturação: 95°C 40 seg Hibridação: 55°C 40 seg Extensão: 72°C 60 seg Extensão final: 72°C 7 min } 30 ciclos	60°C	Danelle <i>et al.</i> , 2010
<i>bla</i> _{Tipo-MOX}	0,25 de MultiCaseMOX_F 0,25 de MultiCaseMOX_R	GCAACAACGACAATCCATC CT GGGATAGGCGTAACTCTCC CAA	895		60°C	Danelle <i>et al.</i> , 2010
<i>bla</i> _{Tipo-DHA}	0,625 de MultiCaseDHA_F 0,625 de MultiCaseDHA_R	TGATGGCACAGCAGGATAT TC GCTTTGACTCTTTCGGTATT CG	997		60°C	Danelle <i>et al.</i> , 2010
<i>bla</i> _{Tipo-CIT}	0,25 de MultiCaseCIT_F 0,25 de MultiCaseCIT_R	CGAAGAGGCAATGACCAG AC ACGGACAGGGTTAGGATA GY ^a	538		60°C	Danelle <i>et al.</i> , 2010
<i>bla</i> _{Tipo-ACC}	0,25 de MultiCaseACC_F 0,25 de MultiCaseACC_R	CACCTCCAGCGACTTGTTA C GTTAGCCAGCATCACGATC C	346		60°C	Danelle <i>et al.</i> , 2010
<i>bla</i> _{Tipo-EBC}	0,25 de MultiCaseEBC_F 0,25 de MultiCaseEBC_R	CGGTAAAGCCGATGTTGCG AGCCTAACCCCTGATACA AGTCCGTTTGTCTTGTGG C	683		60°C	Danelle <i>et al.</i> , 2010
<i>mcr-1</i>	0,5 de MCR1_F 0,5 de MCR1_R	AGATCCTTGGTCTCGGCTT G	320			58°C

^ay=T ou C; R=A ou G; S=G ou C; D= A ou G ou T

Tabela suplementar 1- continuação

<i>mcr-2</i>	0,5 de MCR2_F 0,5 de MCR2_R	CAAGTGTGTTGGTCGCAGT T TCTAGCCCGACAAGCATAC C	715	Pré desnaturação: 94°C 10 min Desnaturação: 94°C 30 seg } Hibridação: 58°C 90 seg } 25 ciclos Extensão: 72°C 60 seg } Extensão final: 72°C 10 min }	58°C	Rebello <i>et al.</i> , 2018
<i>mcr-3</i>	0,5 de MCR3_F 0,5 de MCR3_R	AAATAAAAATTGTTCCGCT TATG AATGGAGATCCCCGTTTTT	929		58°C	Rebello <i>et al.</i> , 2018
<i>mcr-4</i>	0,5 de MCR4_F 0,5 de MCR4_R	TCACCTTCATCACTGCGTT G TTGGTCCATGACTACCAAT G	1116		58°C	Rebello <i>et al.</i> , 2018
<i>mcr-5</i>	0,5 de MCR5_F 0,5 de MCR5_R	ATGCGGTTGTCTGCATTTA TC TCATTGTGGTTGTCCTTTTC TG	1644		58°C	Rebello <i>et al.</i> , 2018
<i>IntI1</i>	0,5 de IntI1_F 0,5 de IntI1_R	GGTCAAGGATCTGGATTTTC G ACATGCGTGTAATCATCG TC	436		60°C	Machado <i>et al.</i> , 2005
<i>IntI2</i>	0,5 de IntI2_F 0,5 de IntI2_R	CACGGATATGCGACAAAA AGG TGTAGCAAACGAGTGACG AAATG	788	Pré desnaturação: 94°C 10 min Desnaturação: 94°C 60 seg } Hibridação: 60°C 60 seg } 32 ciclos Extensão: 72°C 120 seg } Extensão final: 72°C 10 min }	60°C	Machado <i>et al.</i> , 2005
<i>IntI3</i>	0,5 de IntI3_F 0,5 de IntI3_R	AGTGGGTGGCGAATGAGT G TGTTCTTGTATCGGCAGGT G	600		60°C	Machado <i>et al.</i> , 2005

^ay=T ou C; R=A ou G; S=G ou C; D= A ou G ou T

Tabela suplementar 2 - Condições de eletroforese em gel de agarose para os produtos amplificados.

Gene	% de agarose	Duração da corrida (min)	Voltagem (volts)	Produto amplificado (µl)
<i>bla</i> _{CTX-M-Grupo1} <i>bla</i> _{CTX-M-Grupo2} <i>bla</i> _{CTX-M-Grupo9}	2,5	70	110	8
<i>bla</i> _{CTX-M-Grupo8} <i>bla</i> _{CTX-M-Grupo25}	1,5	30	110	8
<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} <i>bla</i> _{OXA}	1,5	45-60	130	8
<i>bla</i> _{ACC} <i>bla</i> _{FOX} <i>bla</i> _{MOX} <i>bla</i> _{DHA} <i>bla</i> _{CIT} , <i>bla</i> _{EBC}	2,5	70	90	8
<i>mcr-1</i> <i>mcr-2</i> <i>mcr-3</i> <i>mcr-4</i> <i>mcr-5</i>	1,5	30-45	130	8
<i>Int1</i> <i>Int2</i> <i>Int3</i>	1,5	30-45	120	8

Tabela suplementar 3 -*Primers* e programa utilizado na purificação dos produtos amplificados para sequenciação.

Gene alvo	Primer	Sequência nucleotídica (5' → 3')	Produto amplificado (bp)	Temperatura de hibridação	Programa de amplificação	Referência
<i>bla</i> _{CTX-M-Grupo1}	CTXM15F CTXM1R	AGAATAAGGAATCCCATGGTT CCGTTTCCGCTATTACAA	903	53°C	Pré desnaturação: 96°C 4 min Desnaturação: 96°C 30 seg Hibridação: * 60 seg Extensão: 72°C 30 seg Extensão final: 72°C 5- 10 min } 25-35 ciclos	Mendonça <i>et al.</i> , 2007
<i>bla</i> _{CTX-M-Grupo9}	CTXM9F CTXMG9R2	AGAATAAGGAATCCCATGGTT CCGTTTCCGCTATTACAA	878	55°C		Cottell <i>et al.</i> , 2012
<i>bla</i> _{Tipo-TEM}	FIN DEB	ATTCTTGAAGACGAAAGGG ATGAGTAAACTTGGTCTGAC	1091	54°C		Caníça <i>et al.</i> , 1997
<i>bla</i> _{Tipo-SHV}	SHVF149P SHVR1059	CGCTTCTTTACTCGCCTTTA TTAGCGTTGCCAGTGCTC	911	56°C		Rasheed <i>et al.</i> , 1997
<i>bla</i> _{Tipo-CMY}	CMYG2F CMYG2R	TTACGGAAGTATTTCATG TCGTCAGTTATTGCAGC	1143	56°C		Manageiro, 2011
<i>bla</i> _{AmpC c/ promotor}	Int-B2 Int-HN	TTCCTGATGATCGTTCTGCC AAAAGCGGAGAAAAGGTCCG	1315	57°C		Mammeri <i>et al.</i> , 2006

* a temperatura de hibridação deve ser otimizada consoante os *primers* utilizados para detetar cada um dos genes alvo.