

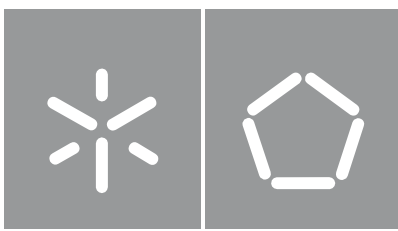
Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Sandra Manuela Silva Pais

Patogenicidade de isolados de *Escherichia coli* provenientes de fezes de galinhas ou bovinos e resistência a antibióticos

Janeiro de 2021



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Sandra Manuela Silva Pais

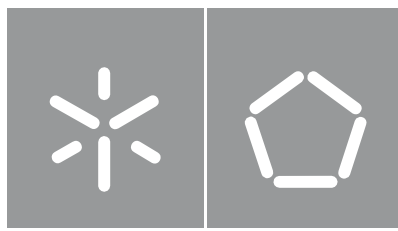
Patogenicidade de isolados de *Escherichia coli* provenientes de fezes de galinhas ou bovinos e resistência a antibióticos

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

Trabalho realizado sob a orientação da professora Lígia Raquel Marona Rodrigues e o Doutor Gonçalo António Nieto Uria Ribeiro de Almeida.

Janeiro de 2021



Universidade do Minho

Escola de Engenharia



Sandra Manuela Silva Pais

Patogenicidade de isolados de *Escherichia coli* provenientes de fezes de galinhas ou bovinos e resistência a antibióticos

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

Trabalho realizado sob a orientação da professora Lígia Raquel Marona Rodrigues e o Doutor Gonçalo António Nieto Uria Ribeiro de Almeida.

Janeiro de 2021

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



Atribuição-NãoComercial

CC BY-NC

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Agradecimentos

Embora uma tese seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem cair no esquecimento. Por essa razão, quero expressar o meu sincero agradecimento a todos aqueles que por qualquer motivo contribuíram, neste percurso, para o meu sucesso.

Ao Doutor Gonçalo, meu orientador, pela oportunidade que me proporcionou, pela competência científica, pela disponibilidade e generosidade reveladas, mas acima de tudo pela simpatia e positivismo que transmitiu ao longo deste ano. Agradeço-lhe os ensinamentos, a confiança e todo o tempo despendido nas inter-ajudas ao longo deste ano assim como na correção desta tese. Mais que ninguém, merece um agradecimento muito especial!

Ao grupo que me acolheu no INIAV, em especial ao Ricardo, ao João, ao Hugo, Ana Pinheiro, Ana Maria, Esperança e Manuela pelo inestimável apoio, orientação e permanente disponibilidade para ajudar, pela amizade e pelos momentos que partilhamos durante este ano. Mas sem esquecer a todos os estagiários que por lá passaram que estiverem presentes e sempre disponíveis para ajudar no que fosse necessário. A todos vós o meu OBRIGADO, este trabalho também é vosso!

À Professora Lígia e a todo o corpo docente do mestrado de tecnologia e ciência alimentar pela competência científica e orientação que ofereceram a todos nós durante estes dois anos.

A todos os meus amigos, aos de longa data e em especial aos “Féte Mulée”, pelo companheirismo e pelos momentos que partilhamos, porque a vida não é só estudar e trabalhar. Rir é um dos segredos para o sucesso!

Por último, mas não menos importante, quero agradecer à minha família, especialmente aos meus pais e às minhas irmãs que sempre me apoiaram, demonstrando confiança nas minhas decisões, e pelo esforço que fazem para que continue a seguir os meus sonhos. Tudo o que sou hoje devo a vós!

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Patogenicidade de isolados de *Escherichia coli* provenientes de fezes de galinhas ou bovinos e resistência a antibióticos

Resumo

Escherichia coli é uma bactéria Gram negativa que pertence à família *Enterobacteriaceae*. Faz parte da microbiota intestinal do homem e animais, podendo ser encontrada em fezes. Possui uma capacidade de vida livre, apresentando-se com características bastantes distintas. De acordo com o seu grupo filogenético (A, B1, B2, C, E, D, F) e a sua patogenicidade (EPEC, EIEC, ETEC, EHEC/STEC e EAEC) poderá ou não causar danos ao hospedeiro. A principal diferença entre os isolados patogênicos e comensais de *E. coli* está associado à presença de elementos genéticos específicos (cromossomais ou extracromossomais). Para o combate destas infecções, são utilizados diferentes antibióticos. Contudo a eficácia dos agentes antibacterianos foi rapidamente superada pela capacidade que as bactérias têm de se opor à sua acção, principalmente pelo uso abusivo e intensivo dos mesmos, favorecendo a sua seleção. Este trabalho foi desenvolvido no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária e teve por objetivo inicial caracterizar fenotipicamente e genotipicamente isolados de *E. coli* provenientes de fezes de bovinos e de galinhas, verificando a sua diversidade genética pela determinação e identificação dos seus grupos filogenéticos, avaliar se pertenciam a um dos seis patótipos diarreicogênicos e finalmente verificar a resistência aos diferentes antimicrobianos selecionados e pesquisar a existência de genes de resistência associados às β -lactamases de largo espectro. Dos 140 isolados em estudo provenientes de fezes de bovino e de fezes de galinhas, o grupo filogenético predominantemente identificado foi B1 para ambos os grupos de animais. Ao nível dos genes de patogenicidade DEC em estudo, em nenhum dos isolados foram identificados. Quanto à exibição de resistência a antimicrobianos verificou-se que os isolados de galinhas apresentaram percentagens de resistência superiores aos isolados de bovinos. Quase metade dos isolados em estudo, apresentaram-se multirresistentes, havendo diferenças quando se analisou os isolados provenientes de bovinos com uma margem de 20% e isolados provenientes de galinhas com uma margem de 55%. Para ambos os grupos de animais foram detetados genes de resistência β -lactamases de largo espectro.

Palavras-chaves: *Escherichia coli*, galinhas, grupos filogenéticos, patótipos, antimicrobianos, multirresistência, *ESBL*., bovinos.

Pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from chicken or cattle faeces origin and its resistance to antibiotics

ABSTRACT

Escherichia coli is a Gram-negative bacterium that belongs to the *Enterobacteriaceae* family. It is part of the intestinal microbiota of man and animals, and can be found in faeces. According to its phylogenetic group (A, B1, B2, C, E, D, F) and its pathogenicity type (EPEC, EIEC, ETEC, EHEC / STEC and EAEC) it may cause injury to the host. The main difference between pathogenic and commensal *E. coli* is associated with the presence of specific genetic elements - chromosomal or extrachromosomal. To combat infections of the pathogen, different antibiotics are used. However, the effectiveness of antibacterial agents was quickly overcome by the ability of bacteria to oppose their action. This work was developed at the National Institute of Agrarian and Veterinary Research and its initial goal was to characterize phenotypically and genotypically the isolates of *E. coli* from faeces of cattle and chickens, verifying their genetic diversity by determining and identifying their phylogenetic groups, assess whether they belonged to one of the six decotypes diarrhogenic and finally check the resistance to the different selected antimicrobials and research the existence of resistance genes associated with Extended spectrum beta-lactamases. This work was developed at the National Institute of Agrarian and Veterinary Research and its initial objective was to characterize phenotypically and genotypically isolates of *E. coli* from cattle and chicken faeces origin, verifying their genetic diversity by determining and identifying their phylogenetic groups, assessing whether they belonged to one of the six diarrhogenic pathotypes and finally to assess the resistance to the different selected antimicrobials and to investigate the existence of resistance genes associated with extended-spectrum β -lactamases. Of the 140 isolates under study from bovine and chicken faeces, the predominantly identified phylogenetic group was B1 for both groups of animals. Level of DEC pathogenicity genes under study, in none of the identified cases. As for the display of resistance, it was found that chickens had higher percentages than cattle. Almost half of the gains under study, if separated multi-resistant, with differences when analysing the gains obtained from cattle with a margin of 20% and obtaining proof from chickens with a margin of 55%. ESBL resistance genes were detected for both groups of animals.

Keywords: Phylogenetic groups, pathotypes, antimicrobials, multiresistant, ESBL, cattle.

ÍNDICE

Capítulo I Introdução.....	1
1. Enquadramento.....	2
Capítulo II Estado da arte: Caracterização fenotípica e genotípica de <i>Escherichia coli</i> e suscetibilidade a antibióticos	4
2. Estado da Arte	5
2.1. <i>Escherichia coli</i>	5
2.1.1. Morfologia.....	5
2.1.2. Ecologia.....	5
2.1.3. Condições de crescimento e sobrevivência	6
2.2. Grupos Filogenéticos	7
2.3. Patotipos	9
2.3.1. <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC) e enterohemorrágica (EHEC).....	11
2.3.2. <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica (ETEC)	12
2.3.3. <i>Escherichia coli</i> Enteropatogénica (EPEC).....	13
2.3.4. <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC).....	14
2.3.5. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	15
2.3.6. <i>Escherichia coli</i> de adesão difusa (DAEC).....	15
2.3.7. <i>Escherichia coli</i> patogénica aviária (APEC).....	16
2.4. Predominância dos patotipos DEC	18
2.5. Surtos.....	19
2.6. Prevenção das doenças de origem alimentar	20
2.7. Antibióticos.....	21
2.7.1. Resistência a antibióticos	24
2.7.2. Multirresistência	25
2.7.3. Mecanismos de resistência aos antibióticos	25
2.7.4. Bactérias heterorresistentes.....	27
Capítulo III MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3. Material e Métodos	29
3.1. Amostragem	29

3.2. Reagentes, Meios de Cultura e Equipamentos utilizados	30
<i>Simmons Citrate Agar</i>	30
<i>Triple Sugar Iron Agar (TSI)</i>	30
3.3. Crescimento dos isolados de <i>Escherichia coli</i> conservados a – 80 °C	30
3.4. Testes bioquímicos para a caracterização dos isolados de <i>Escherichia coli</i>	31
3.4.1. Fermentação do Sorbitol	31
3.4.2. Atividade hemolítica	31
3.4.3. Produção de indol.....	31
3.4.4. Pesquisa de β -glucoronidase.....	31
3.4.5. Fermentação da lactose MacConkey	32
3.4.6. Identificação bioquímica por BBL™ CRYSTAL™	32
3.4.7. Testes adicionais em meio sim, citrato e tsi	32
3.5. Conservação de culturas em Criovias	32
3.6. Extração do DNA	33
3.7. Ressuspensão e Diluição dos <i>primers</i>	33
3.8.1. Determinação dos Grupos-filogenéticos de <i>Escherichia coli</i>	34
3.8.2. Determinação dos Patotipos de <i>ESCHERICHIA COLI</i> ,	36
3.9. Separação por eletroforese dos fragmentos de DNA.....	39
3.10. Sequenciação	40
3.11. Distinção de <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella</i> spp. e <i>Citrobacter freundii</i>	40
3.12. Determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos através do método de difusão de disco	41
3.12.1. Subpopulações resistentes a antimicrobianos	42
Capítulo IV Resultados e Discussão	43
4. Resultados	44
4.1. Comportamento fenotípico	44
4.1.1. Fermentação do sorbitol.....	44
4.1.2. Hémolise.....	44
4.1.3. Indol	45
4.2. Grupos Filogenéticos	47
4.2.1. Isolados provenientes de fezes de galinha	48

4.2.2. Isolados provenientes de fezes de bovino	52
4.2.3. Estudos semelhantes	54
4.3. Patotipos	56
4.4. Antibiogramas	56
4.4.1. Isolados provenientes de fezes de galinha	59
4.4.2. Isolados provenientes de fezes de bovino	62
4.4.3. Estudos semelhantes	66
4.4.4. Isolados multirresistentes	69
4.4.5. Subpopulações	73
4.4.6. Genes de resistência.....	73
Capítulo Considerações Finais e Perspetivas futuras.....	75
Considerações finais	76
Capítulo Referências Bibliográficas.....	78
Referências bibliográficas	79
Capítulo ANEXOS	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 : Determinação dos grupos filogenéticos de <i>Escherichia coli</i> de acordo com a presença ou ausência dos genes em estudo	8
Figura 2: Interação dos diferentes patotipos DEC de <i>Escherichia coli</i> com as células do intestino.....	10
Figura 3: Local de atuação dos diferentes patotipos de <i>Escherichia coli</i>	11
Figura 4: Percentagem total dos vários patotipos (DEC) de <i>Escherichia coli</i> detetados	18
Figura 5: Número de casos confirmados dos vários patotipos de <i>Escherichia coli</i> , durante o período de 2002 e 2012	19
Figura 6: Número de casos confirmados dos vários patotipos de <i>Escherichia coli</i> , durante o período de 2002 e 2012	19
Figura 7: Principais modos de ação de antimicrobianos sobre as bactérias	22
Figura 8: Processo de extração: a) Isolados após crescimento em meio TSA; b) Crescimento de uma colónia em meio TSB; c) 1 ml do isolado de TSB d) Centrifugação; e) Descarte do sobrenadante; f) tubo com H ₂ O após 95 °C; g) centrifugação e h) armazenamento do sobrenadante.....	33
Figura 9: Perfis obtidos em gel de 2% agarose dos produtos de genes de patogenicidade DEC por PCR simplex ou multiplex. Linha 1 e 11– Marcador de Peso Molecular V (1000 bp): Linha 2- <i>est</i> ; Linha 3- <i>est</i> e <i>elt</i> ; Linha 4- <i>ipaH</i> ; Linha 5- <i>aggR</i> ; Linha 6 CVD432; Linha 7- <i>eae</i> ., Linha 8 <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>eae</i> ; Linha 9- <i>bpfA</i> ; Linha 10 - controlo negativo.....	37
Figura 10: Comportamento dos isolados face à capacidade de fermentar o sorbitol: (a) Estirpe que fermenta o sorbitol (b) Estirpe que não fermenta o sorbitol.....	44
Figura 11: Comportamento dos isolados face à presença de sangue de carneiro no meio: estirpes destacadas com circunferência apresentam uma hemólise maior que as restantes.....	45
Figura 12: Comportamento dos isolados: (a) controlo positivo e negativo face à presença de indol; (b) colónias tipicamente esverdeadas para <i>Escherichia coli</i> em meio TBX; (c) colónias tipicamente avermelhadas para <i>Escherichia coli</i> em <i>MacConkey</i> ; (d) Teste bioquímico BBL <i>Crystal</i> ; (e) teste em SIM; (f) teste em citrato <i>Simmons</i> e (g) teste em TSI.....	46
Figura 13: Percentagem de isolados de acordo com os grupos filogenéticos encontrados e os não associados nos isolados provenientes de fezes de galinhas e bovinos.	47
Figura 14: Número de isolados para cada filogrupos para isolados provenientes de fezes de bovino e isolados provenientes de fezes de galinha.....	48
Figura 15: Número de isolados de filogrupos detetados para os isolados de fezes de galinhas conforme o seu local de recolha.....	48

Figura 16: Percentagens de filogrupos detetados em isolados provenientes de fezes de galinha de acordo com o seu tipo.....	49
Figura 17: Grupos filogenéticos encontrados nos isolados provenientes de fezes de bovino conforme o seu local de recolha	52
Figura 18: Percentagem dos grupos filogenéticos encontrados e os não associados nos isolados provenientes de fezes de bovino nas diferentes explorações estudadas (L1, L2, L3 e L4).	53
Figura 19: Grupos filogenéticos encontrados nos isolados provenientes de fezes de vacas de lactação e novilhas	54
Figura 20: Percentagem de exibição de resistência (categoria Intermédio + Resistente) face aos diferentes antimicrobianos em estudo de acordo com o local de recolha dos isolados provenientes de fezes de galinha.....	60
Figura 21: Percentagem de exibição de resistência (categoria Intermédio + Resistente) face aos antimicrobianos em estudo, para os isolados provenientes de fezes de galinha de acordo com o seu tipo.....	61
Figura 22: Percentagem de exibição de resistência (categoria Intermédio + Resistente) face aos antimicrobianos em estudo, para os isolados provenientes de fezes de bovino, face ao seu local de recolha.....	63
Figura 23: Exibição de resistência (categoria Intermédio + Resistente) face aos diferentes antimicrobianos em estudo de acordo com a exploração dos isolados provenientes de fezes de bovino.....	64
Figura 24: Exibição de resistência (categoria Intermédio + Resistente) face aos diferentes antimicrobianos em estudo dos isolados provenientes de fezes de bovino de acordo com o seu tipo: vacas em lactação vs novilhas.....	65
Figura 25: Perfis obtidos em gel de 2% agarose dos produtos de genes de resistência à ESBL por PCR multiplex. Linha 1 – Marcador de Peso Molecular V (1000 bp): Linha 2 – 3: Perfis obtidos das estirpes de controlo: <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M e <i>bla</i> SHV respetivamente; Linha 4-11: Perfis obtidos de isolados; e Linha 12 - controlo negativo.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos fatores que afetam o crescimento e a sobrevivência da <i>Escherichia coli</i>	7
Tabela 2: Surtos provocados por <i>Escherichia coli</i> entre 2016 e 2019.....	10
Tabela 3: Exemplos de famílias de antibióticos e o seu modo de ação	26
Tabela 4: Mecanismos de resistência para as diferentes classes de antibiótico.....	30
Tabela 5: Meios de cultura, marca e referência e finalidade de utilização.....	34
Tabela 6: <i>Primers</i> utilizados para a determinação dos grupos filogenéticos	35
Tabela 7: Caracterização dos filogrupos dos isolados de <i>Escherichia coli</i>	35
Tabela 8: <i>Primers</i> utilizados para a distinção do filogrupo E, D ou <i>Escherichia clade I</i>	36
Tabela 9: <i>Primers</i> utilizados para a distinção do Grupo A ou C.....	37
Tabela 10: <i>Primers</i> utilizados para a determinação dos patotipos	37
Tabela 11: Tabela resumo do produto de PCR para cada par de primers, as suas concentrações iniciais, condições de amplificação e o volume por reação.....	38
Tabela 12: <i>Primers</i> utilizados para a determinação de genes indicadores de β -lactamases de largo espectro.....	39
Tabela 13: <i>Primers</i> utilizados para a determinação de genes de resistência AmpC.....	39
Tabela 14: <i>Primers</i> utilizados para a sequenciação dos isolados L01V17 e L03V12.....	40
Tabela 15: <i>Primers</i> utilizados para a distinção de <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella</i> spp. e <i>Citrobacter freundii</i>	41
Tabela 16: Percentagens/número de isolados provenientes de fezes de galinha de acordo com o seu local de recolha e o tipo de bando, em relação ao total de isolados encontrados em cada grupo filogenético.....	50
Tabela 17: Resultados dos grupos filogenéticos dos isolados de <i>Escherichia coli</i> entre detetados com o mesmo número de amostra de acordo com o local e o tipo de bando.....	51
Tabela 18: Percentagem/ número de amostras que apresentam ou não o mesmo grupo filogenético de acordo com o local e o tipo de bando.....	52
Tabela 19: Percentagem de isolados suscetíveis e exibição de resistência para os isolados provenientes de fezes de galinhas e de bovinos.....	58
Tabela 20: Percentagem de isolados suscetíveis aos diferentes antimicrobianos em estudo de acordo com o tipo de animal: isolados provenientes de fezes de galinhas <i>vs</i> isolados provenientes de fezes de bovino.....	59

Tabela 21: Percentagens de isolados provenientes de fezes de galinha de acordo com o seu local e tipo, que exibem resistência (categoria Intermédio + Resistente) face aos antimicrobianos em estudo.....	62
Tabela 22: Percentagens de isolados provenientes de fezes de bovino de acordo com o seu local e tipo, que exibem resistência (categoria Intermédio + Resistente) face aos antimicrobianos em estudo.....	66
Tabela 23: Número de isolados resistentes a três ou mais categorias de antibióticos para serem considerados multirresistentes.....	69
Tabela 24: Percentagens de isolados multirresistentes provenientes de fezes de bovino de acordo com o local de recolha, a exploração e o seu tipo	72
Tabela 25: Percentagens de isolados multirresistentes provenientes de fezes de galinha de acordo com o local de recolha e o seu tipo.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

MLEE: *multi-locus enzyme electrophoresis*
DEC: estirpes patogénicas intestinais
ExPEC: estirpes patogénicas extraintestinais
STEC: *E. coli* produtora de toxina Shiga
EHEC: *E. coli* enteroemorrágica
HC: colite hemorrágica
SHU: síndrome hemolítico urémico
UPEC: *E. coli* uropatogénica
APEC: *E. coli* patogénica aviária
NMEC: *E. coli* causadora de meningite neonatal
ETEC: *E. coli* enterotoxigénica
EPEC: *E. coli* enteropatogénica
EIEC: *E. coli* enteroinvasiva
EAEC: *E. coli* enteroagregativa
DAEC: *E. coli* de adesão difusa
AMP: ampicilina
AZM: azitromicina
COX: cefotaxima
CDZ: ceftazidima
NA: ácido nalidíxico
CIP: ciprofloxacina
CHL: cloranfenicol
GMN: gentamicina
MEM: meropenem
S: sulfonamidas
TE: tetraciclina
TRM: trimetoprim
ESBL: *extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae*
Beta-lactamases de largo espectro
ENRO: enrofloxacina
PEN: Família penicilinas
MAC: Família macrólidos
CEF: Família cefalosporinas
Fluor: Família fluorquinolonas
FEN: Família fenicóis
AMIN: Família aminoglicosídeos
CARB: Família carbapenemos
PIRI: Família pirimidinas

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I INTRODUÇÃO

1. Enquadramento

Os alimentos de origem animal são uma fonte importante de nutrientes na dieta humana. Entre estes, o leite sempre teve uma figura central na evolução humana, sendo que o início do seu consumo data de à 8000 - 10000 anos, ainda que, algumas populações só popularizaram o seu consumo há algumas décadas. A presença deste alimento nas dietas alimentares denota a sua importância na alimentação humana. Contudo, nas últimas décadas, o consumo de leite após o desmame tem sido alvo de diversas controvérsias (Lima, 2012).

Juntamente com o leite, a partir do século XX, a avicultura também passou a ser encarada como uma indústria altamente produtiva. A carne de frango tornou-se um produto de consumo em massa em todas as regiões do mundo, em países com muitas diferenças de desenvolvimento, e em diversas formas. O setor da produção de ovos teve início na Índia e na China, onde se domesticaram algumas espécies de galináceos. Nas últimas décadas, a melhoria da produtividade das galinhas poedeiras comercial tem sido muito significativa, devido a uma combinação de fatores como o melhoramento genético, alimentação animal, práticas de manejo e prevenção de doenças. Os ovos são alimentos que potencialmente podem transportar perigos alimentares bacterianos para a saúde pública, graças à contaminação fecal à qual são sujeitos durante a postura, bem como qualquer traumatismo na casca do ovo podendo provocar fissuras e entrada de bactérias (Damerow, 1995; Regulamento (CE) nº 853/2004).

De acordo com o relatório de Estatísticas Agrícolas de 2018 (INE, 2019), verificou-se que comparando os resultados obtidos em 2017, a produção de carne de animais de capoeira decresceu em 1,7%, sendo que a produção de carne de frango decresceu em 3,6%. A produção de ovos de galinha aumentou 1,1% face a 2017, sendo que de 143 mil toneladas de ovos, 120 mil foram para consumo humano e 23 mil para incubação para assinalar a manutenção da produção para os galináceos. Relativamente às vacas e novilhas verificou-se que houve um aumento de abate de novilhas e vacas (tendo assim de forma global um aumento de 3,1% de produção de carne bovina) assim como um aumento de produção na categoria de novilhas. O abate deveu-se à seca e a falta de alimentos para os animais que existiam nas pastagens, no primeiro quadrimestre. Também se registou um aumento na categoria de vacas e novilhas, para que houvesse uma compensação para os produtores de leite que pretendiam abandonar a produção. Relativamente ao leite de vaca, foi registado um aumento de 1% face a 2017, sendo o principal leite produzido (95%).

CAPÍTULO I INTRODUÇÃO

As doenças de origem alimentar têm-se revelado um enorme problema para o ser humano, acarretando significativa morbidade, mortalidade e custos económicos para a sociedade. Os fungos, os parasitas e as bactérias são os contaminantes biológicos com maior relevo em doenças alimentares. Bactérias como a *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* são, no panorama atual, algumas das bactérias com maior relevo e importância, sendo a causa de muitas das ocorrências de doenças alimentares (infecções/intoxicações alimentares). Isto ocorre devido não só a falhas de segurança e qualidade do alimento ao longo do ciclo de vida do mesmo (cultivo, distribuição, preparação), como também devido a práticas incorretas, nomeadamente no uso inadequado de antibacterianos em humanos e animais (Alves, 2012).

As bactérias resistentes, que sobrevivem à ação dos antibióticos, representam uma séria ameaça para a saúde humana e animal. Se não se travar o seu desenvolvimento, num futuro próximo, a medicina terá grande dificuldade em tratar as doenças bacterianas por ineficácia dos medicamentos (DECO, 2016).

Este estudo teve como objetivo inicial caracterizar fenotipicamente e genotipicamente os isolados de *E. coli* provenientes de fezes de bovinos e de galinhas, verificando a sua diversidade genética pela determinação e identificação dos seus grupos filogenéticos, avaliar se pertenciam a um dos seis patotipos diarréicos (DEC) e finalmente verificar a resistência aos diferentes antimicrobianos selecionados e pesquisar a existência de genes de resistência associados a β -lactamases de largo espectro (ESBL).

CAPÍTULO II

ESTADO DA ARTE: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
ESCHERICHIA COLI E SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

CAPÍTULO II ESTADO DA ARTE

2. Estado da Arte

2.1. *Escherichia coli*

Em 1885, Theodor Von Escherich foi o primeiro a descrever esta bactéria, designando-a como *Bacterium coli commune*. Contudo, em 1958, recebeu a denominação atual, *Escherichia coli* em sua homenagem (Berchieri e Macari, 2000).

2.1.1. Morfologia

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa que pertence à classe Proteobacteria, subclasse Gamma e família *Enterobacteriaceae*. Apresenta-se em forma de bastonete curto (bacilo), não esporulado, e podem ser imóveis ou móveis (maioria) por flagelos peritricos. As estirpes de *E. coli* diferenciam-se com base nos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K). Adicionalmente, a presença de fímbrias e de outras estruturas relacionadas desempenham um papel importante na virulência da bactéria (Stackebrandt *et al.*, 1988; Quinn *et al.*, 2005; ASAE, 2019).

É uma bactéria produtora de indol, não utiliza o citrato como fonte de carbono, não apresenta a enzima urease, não fermenta o adonitol, são fermentadoras de glicose e outros açúcares, são catalases positivas, oxidases negativas e reduzem o nitrato a nitrito (Edwards e Ewing, 1986, Murray *et al.*, 1999; Kaneman *et al.*, 2006).

2.1.2. Ecologia

As bactérias simbiotes presentes nos intestinos dos seres humanos apresentam vários benefícios desde nutricionais, como na defesa contra os organismos patogênicos. O controle de agentes patogênicos no intestino é conseguido através da presença de uma camada impenetrável de muco. Ou seja, para que um agente patogênico consiga manifestar os seus fatores de virulência necessita de atravessar esta barreira, ou então serão excretados com o muco. Aquelas que conseguem atravessar o muco e aderir às células epiteliais, o organismo elabora um processo inflamatório como mecanismo de defesa, para a sua eliminação (Brooks e Carroll, 2011).

A *E. coli* é encontrada normalmente na microbiota entérica (intestino) de aves e mamíferos. Nos seres humanos, normalmente colonizam o trato gastrointestinal algumas horas após o nascimento, quando bactérias presentes na mucosa vaginal e na pele da mãe, além das provenientes de fontes ambientais, são adquiridas pelo recém-nascido. Algumas estirpes são denominadas residentes uma vez que podem persistir por muitos meses na microbiota do

CAPÍTULO II

ESTADO DA ARTE

indivíduo, enquanto outras são estirpes transientes, têm baixa capacidade de colonização e desaparecem em algumas semanas (Sears *et al.*, 1956, Tenaillon *et al.*, 2010; Kaper *et al.*, 2004).

E. coli é o simbionte anaeróbio facultativo mais abundante no intestino humano. Esta bactéria é muitas vezes encontrada em fezes de vários animais de sangue quente e répteis, variando o seu tamanho populacional de acordo com o tipo de hospedeiro. Nesse sentido, pode ocorrer a disseminação da mesma no meio ambiente conseguindo sobreviver nas partículas fecais, poeiras e água por semanas ou meses. Assim, a *E. coli* faz parte do grupo de coliformes fecais sendo considerada o indicador de contaminação fecal mais específico e de eventual presença de bactérias patogénicas (Berg, 1996; Oliveira *et al.*; 2004 Andrade, 2005; Savioli, 2010; Tenaillon *et al.*, 2010).

Com o enorme número de hospedeiros, e a sua capacidade de vida livre, esta bactéria possui várias linhagens com características bastantes distintas. Dentro dessas linhagens há linhagens que colonizam o hospedeiro não causando danos e podendo ou não fornecer benefícios (comensalismo e mutualismo), como haver a colonização de estirpes altamente virulentas, resistentes a antibióticos, causando danos ao hospedeiro (parasitismo). Também pode ocorrer o contacto entre diferentes estirpes de *E. coli* havendo transformações das mesmas. Ou seja, pode ocorrer troca de material genético ou *Quorum sensing* tornando as estirpes mais virulentas, ou então a transformação de estirpes patogénicas em comensais ou mutualistas. A principal diferença entre os patótipos e as linhagens comensais de *E. coli* é a presença de elementos genéticos específicos nos primeiros, tanto cromossomais como extracromossomais (Berg, 1996; Tinaz, 2003; Kaper *et al.*, 2004; Leatham *et al.*, 2009; O'Reilly *et al.*, 2010; Tenaillon *et al.*, 2010; Momeni *et al.*, 2011; Fukuda *et al.*, 2011).

2.1.3. Condições de crescimento e sobrevivência

De acordo com a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE, 2019), os fatores que estão associados às condições de crescimento e sobrevivência são a temperatura, pH, disponibilidade da água, a relação com o oxigénio e a radiação, descritos na tabela 1.

CAPÍTULO II ESTADO DA ARTE

Tabela 1: Descrição dos fatores que afetam o crescimento e a sobrevivência da *Escherichia coli* (ASAE, 2019)

Fatores	Descrição
Temperatura	- Intervalo de sobrevivência: 8 °C e 45 °C
	- Intervalo ótimo de crescimento: 35 °C a 40 °C
	- Valor ótimo de crescimento: 37 °C
	* Não ocorre qualquer redução quando os produtos são armazenados a temperatura de refrigeração e congelamento (- 20 °C)
pH	- O efeito do pH no crescimento depende do tipo de ácido presente (Ex: sobrevive num pH de 4,5 na presença de ácido clorídrico, mas não consegue na presença de ácido láctico)
Aw	- Limite mínimo: 0,95
	* Pode ocorrer o crescimento com concentrações de NaCl de 6,5%, e concentrações de 8,5% são consideradas inibitórias.
Oxigênio	- Anaeróbia facultativa
Radiação	- Destruída por irradiação
	* Presença de oxigênio aumenta o efeito letal por irradiação, que é máximo a temperaturas entre os 45 °C e os 55 °C

2.2. Grupos Filogenéticos

O estudo da diversidade de *E. coli* antecede o surgimento da era molecular, e por isso a sua diferenciação era feita por sorotipagem. Contudo esse método não era o mais correto, pois estirpes com o mesmo serotipo poderiam se apresentar geneticamente distantes, ou então, estirpes estreitamente relacionadas com diferentes serotipos. Os primeiros passos de conhecimento genético de *E. coli* foi através da técnica do MLEE (*Multi-locus enzyme electrophoresis*), e progrediu com o surgimento do MLST (*Multi-locus sequence typing*) e acumulação de dados de sequências nucleotídicas (Chaudhuri e Henderson, 2012).

No ano de 2000, Clermont *et al.* desenvolveram uma técnica de PCR multiplex que visava caracterizar as estirpes de *E. coli* em diferentes grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D), de acordo com a presença ou ausência de dois genes (*chuA* – gene necessário para o transporte de heme em pacientes enterohemorrágicos e *yjaA* – gene encontrado no genoma completo da *E. coli* k-12 e está envolvido na resposta celular ao peróxido de hidrogênio e stresse ao ácido) e um fragmento de DNA (*TSPE4.C2*), caracterizado mais tarde como um gene putativo de lipase esterase. Esta caracterização permitiria dividir as estirpes estudadas em comensais ou patogênicas DEC (A e B1) ou as mais altamente patogênicas ExpPEC (B2 e D), como pode ser verificado na figura 1. Contudo, usando este método, alguns isolados não podiam ser claramente classificados, pois não

CAPÍTULO II ESTADO DA ARTE

pertenciam a nenhum dos grupos existentes, ou então poderiam estar mal classificados, tendo em conta que o método apresentava uma percentagem de classificações corretas dos isolados de 85%. A evolução destes estudos ao longo do tempo permitiu reconhecer mais grupos filogenéticos, nomeadamente o grupo E (ao qual pertence a 0157:H7); o grupo F (caracterizado por ser um grupo irmão do grupo B2); e o grupo C (contendo estirpes intimamente relacionadas, mas distintas do grupo B1) (Picard *et al.*, 1999; Johnson e Stell, 2000, Gordon *et al.*, 2008, Tenaillon *et al.*, 2010; Chaudhuri e Henderson, 2012).

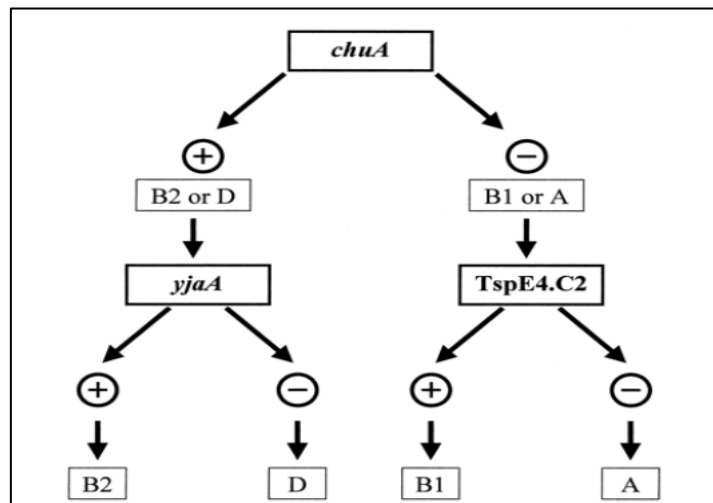


Figura 1: Determinação dos grupos filogenéticos de *Escherichia coli* de acordo com a presença ou ausência dos genes *chuA*, *yjaA* e *TspE4.C2* (Retirada de Clermont *et al.* 2000)

Para determinar os novos grupos filogenéticos pela técnica de PCR, foi necessário alterar o método base, utilizando os mesmos alvos genéticos, mas melhorando a performance dos mesmos, e acrescentando um novo alvo genético, o *arpA* (funcionando como um controlo interno da qualidade do DNA). Com base no genótipo determinado pelo PCR multiplex inicial, é possível a determinação mais geral dos grupos filogenéticos e a distinção entre *E. coli* e clades, contudo não permite a distinção entre o grupo A e o C, assim como entre o grupo D e o E. Em 2009, foram descritos cinco clades de *Escherichia*, referidos como “enigmáticos” devido à incapacidade de distingui-los de isolados de *E. coli* através de testes bioquímicos. Este tem sido um tema muito explorado para permitir uma melhor distinção filogenética e explorar a diversidade genómica (Walk, 2015).

Assim, é proposto por Clermont *et al.*, 2013 o uso de um teste adicional por PCR simplex para esses isolados, utilizando outros iniciadores. A distinção do grupo A e C consiste na ausência (A) ou presença (C) do *trpA*. Já para a distinção entre o grupo E e D, é a presença (D) ou ausência do (E) do *arpAggE*, permitindo assim a classificação do grupo filogenético de *E. coli*. A não

CAPÍTULO II

ESTADO DA ARTE

atribuição do grupo filogenético de uma pequena fração de *E. coli* pode ocorrer devido a recombinações entre amostras de grupos filogenéticos diferentes ou devido à alta variabilidade do conteúdo genético de *E. coli*, que ocorre através de ganhos e/ou perdas de genes. Outros fatores, tais como a dieta, a morfologia intestinal, a massa corporal, e a localização geográfica podem interferir na frequência dos filogrupos detetados (Gordon *et al.*, 2008; Clermont *et al.*, 2013).

Os estudos de tipagem filogenética mostraram que as estirpes pertencentes aos diferentes filogrupos podem estar associadas com a origem do isolado. Os filogrupos A e B2 são os mais comuns em isolados de seres humanos, sendo o B1 e D os menos prevalentes. Os filogrupos B1 seguido de A, B2 e, em menor grau, de D são os mais comumente isolados de animais (Chaudhuri e Henderson, 2012; Clermont *et al.*, 2013).

2.3. Patotipos

Os isolados de *E. coli* são divididos em três categorias principais compostas por: estirpes comensais, estirpes patogênicas intestinais ou diarreio-gênicas (DEC) e estirpes patogênicas extraintestinais (ExPEC) (Russo e Johnson, 2000; Clermont *et al.*, 2013).

Na generalidade, os microrganismos patogênicos de *E. coli* são classificados em patotipos, definidos por uma variedade de características como o modo de transmissão, características do hospedeiro afetado, serotipos e sorogrupos, fenótipos de interação com as células epiteliais intestinais, mecanismos de patogenicidade e determinantes genéticos de virulência. Atualmente são conhecidos os seguintes patotipos de DEC: EPEC (*Escherichia coli* enteropatogênica), ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigênica), EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasiva), EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa), STEC (*Escherichia coli* produtora de toxina) /EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica) e DAEC (*Escherichia coli* de adesão difusa), figura 2 (Russo e Johnson, 2000; Kapper *et al.*, 2004).

CAPÍTULO II ESTADO DA ARTE

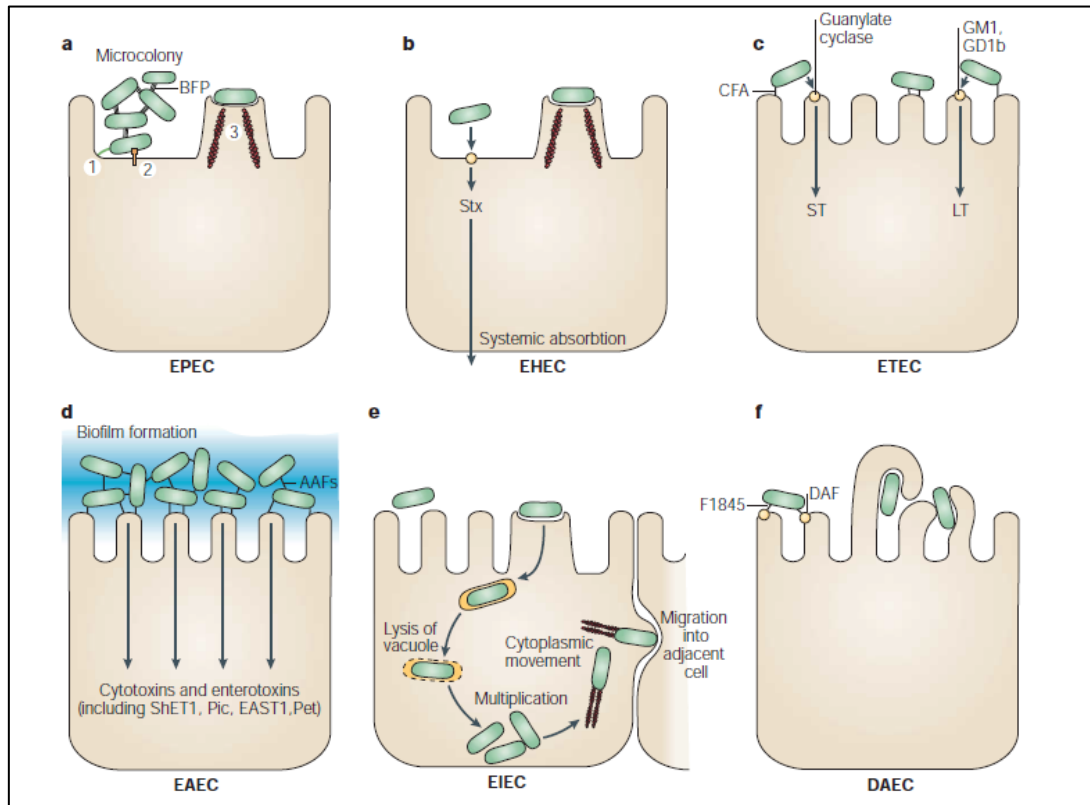


Figura 2: Interação dos diferentes patótipos DEC de *Escherichia coli* com as células do intestino (Retirado de Kapper *et al.* 2004)

Além destes patótipos DEC, são reconhecidos outros patótipos como a UPEC (*E. coli* uropatogénica), NMEC (*E. coli* causadora de meningite neonatal), e APEC (*E. coli* patogénica aviária), que pertencentes ao grupo ExPEC. Inicialmente, os patótipos ExPEC eram reconhecidos apenas pelo sítio de isolamento onde provocava infeção e o seu hospedeiro e não pelas suas características que definem um patótipo, em particular os seus marcadores de virulência (Russo e Johnson, 2000; Johnson *et al.*, 2001; Johnson e Russo, 2002; Rendon *et al.*, 2007).

Os patótipos de *E. coli* DEC causam gastroenterite, mas raramente alguma doença fora do trato intestinal. Por outro lado, as estirpes de ExPEC mantêm a capacidade de colonizar o intestino sem causar doença, porém são capazes de se disseminar e colonizar outros nichos no hospedeiro, incluindo a corrente sanguínea, sistema nervoso central e trato urinário, resultando em doenças, figura 3 (Wiles *et al.*, 2008).

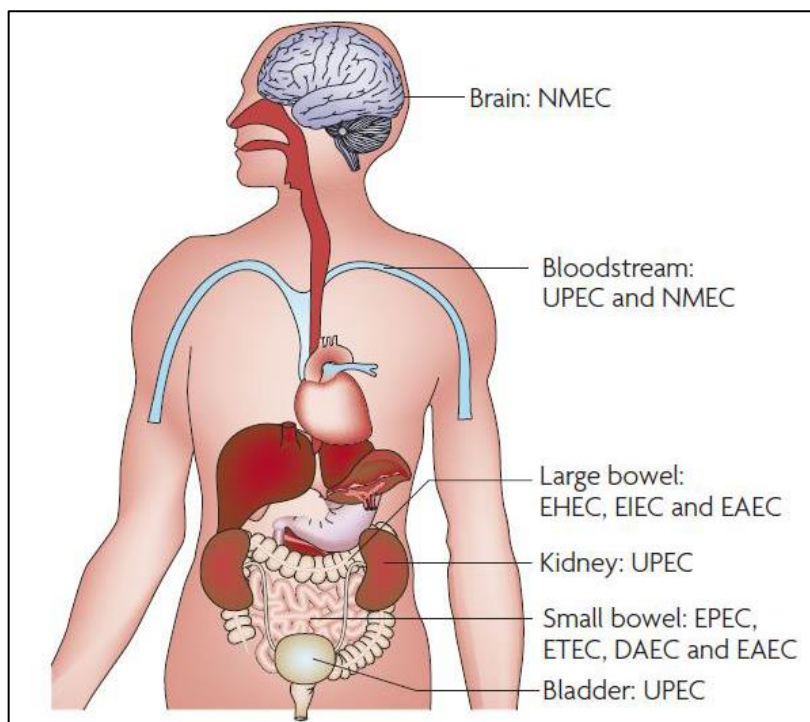


Figura 3: Local de atuação dos diferentes patótipos de *Escherichia coli* (Retirado de: Croxen e Finlay, 2010)

2.3.1. *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e enterohemorrágica (EHEC)

O reconhecimento de STEC como uma classe de *E. coli* patogénica distinta foi o resultado de duas linhas de estudo convergentes: a primeira iniciou-se quando se verificou a capacidade de certas estirpes produzirem toxinas que causavam efeito citopático irreversível em células Vero (células de rim de macaco verde africano). Foi descrita pela primeira vez por Konowalchuk, Speirs e Starvic em 1977, surgindo o termo verotoxina ou verocitotoxina. As nomenclaturas “VTEC / verotoxina” passaram a ser utilizadas, principalmente, por investigadores canadianos, enquanto os termos “SLTEC / SLT / *Shiga-like toxin*” foram adotados por investigadores americanos. Em 1996, Calderwood *et al* propuseram a nomenclatura toxina Shiga / *E. coli* produtora de toxina Shiga (stx / STEC), devido ao alto grau de homologia estrutural e funcional da toxina de *E. coli* com a toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1. Atualmente, o termo STEC é utilizado para caracterizar estirpes de *E. coli* produtoras de stx, enquanto EHEC caracteriza estirpes que produzem stx e causam uma lesão histopatológica (*attaching and effacing*, A/E). A característica mais importante de virulência é a produção de uma ou mais toxinas Shiga (stx1 e / ou stx2). Para causar doença é necessário a existência de outros fatores tais como: a presença do plasmídeo pO157, que

CAPÍTULO II ESTADO DA ARTE

codifica a enterohemolisina e a produção de adesinas fimbriais e afimbriais. Englobando esses fatores, a ligação de stx aos recetores causa morte das células por inibição de síntese proteica, causando enterocolite hemorrágica e falência renal (Nataro e Kaper, 1998; Paton, 1998).

STEC e EHEC estão relacionadas com um amplo espectro de doenças humanas, que compreende desde diarreias leves à colite hemorrágica (HC) e ao síndrome hemolítico urémico (SHU), cuja seqüela mais grave é, possivelmente, a falência renal e a púrpura trombocitopênica trombótica (TTP) em seres humanos. Estas bactérias aderem ao epitélio intestinal e colonizam o tubo digestivo, de forma assintomática ou ocasionando diarreia. Bebês e crianças são os principais pacientes afetados e, embora a incidência de infecção varie de região para região, os impactos na saúde pública são imensos, sendo a principal causa de insuficiência renal aguda em crianças em muitos países. O serotipo *E. coli* O157: H7 foi o primeiro a ser ligado a casos de HC e SHU no início dos anos 80. Contudo centenas de outros serotipos podem abrigar os genes *stx*. Os mais frequentes nas infecções humanas, para além do O157 são o O26, O45, O103, O111, O121 e O145 (Griffin e Tauxe, 1991; Nataro e Kaper, 1998; Garcia-Aljaro *et al.*, 2005; Biscola *et al.*, 2011; Gould *et al.*, 2013; Kaper e O'Brian, 2014; Majowicz *et al.*, 2014).

A distribuição de EHEC / STEC no trato gastrointestinal de uma grande variedade de animais indica o caráter zoonótico de suas infecções. Além do gado bovino que é o reservatório natural mais comum, verificou-se também a presença destes patótipos nas fezes de búfalos leiteiros, ovinos, porcos, pássaros e peixes. Assim, é necessário assegurar a segurança alimentar em toda a produção e processamento, uma vez que poderá haver a transmissão por carne mal cozinhada e produtos não pasteurizados. A presença de EHEC / STEC no meio ambiente é outro motivo de preocupação, pois estas bactérias podem sobreviver no solo, estrume, pastagens e água, que representam importantes veículos de transmissão. A capacidade de aderir, colonizar e formar biofilmes em alimentos e vários tipos de superfícies pode ser uma fonte importante e / ou veículo de transmissão de EHEC / STEC. Além disso, o biofilme também pode atuar como proteção bacteriana contra condições ambientais adversas (Borges *et al.*, 2012; Lascowski *et al.*, 2013; Beraldo *et al.*, 2014; Maluta *et al.*, 2014).

2.3.2. ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC)

Foi na década de 70, após uma infecção por parte da estirpe ETEC, causando diarreia endêmica na Ásia, que se estabeleceu a sua importância clínica na infecção humana. As estirpes deste patótipo são as mais frequentemente causadoras da “diarreia dos viajantes”. No caso dos

CAPÍTULO II

ESTADO DA ARTE

viajantes, a probabilidade de adquirirem imunidade aumenta com o número de viagens às áreas endêmicas. A doença tem início repentino com um período de incubação de 14 a 50 horas e pode ser moderada e autolimitada (1-3 dias). Porém, pode causar sintomas severos semelhantes aos da cólera, sendo caracterizada por ser uma doença muito séria em recém-nascidos. Produz febre baixa, os vômitos são raros e a diarreia é aquosa e tem uma aparência semelhante à água de arroz, normalmente sem sangue. Foi descoberto que a amamentação no primeiro ano de vida proporciona um efeito protetor contra infecções entéricas severas por ETEC e por outros patogênicos (Sack, 1975; Levine, 1987; Nataro e Kaper 1998; Forsythe, 2002a; Forsythe, 2010).

As ETEC são caracterizadas por colonizarem a superfície da mucosa do intestino delgado, a partir de fatores de colonização (CFs), fimbriais ou não fimbriais, e por produzirem enterotoxinas termoestáveis (ST) e termolábeis (LT). Estas alteram as funções dos enterócitos, sem induzir alterações morfológicas significativas no intestino, aumentando a secreção e reduzindo a absorção de líquidos. Uma característica da biologia da ETEC é a expressão de enterotoxinas, que também exibem uma heterogeneidade antigênica com relevância. Aproximadamente um terço das estirpes isoladas de pacientes com diarreia expressam apenas LT e outro terço apenas ST. Finalmente o outro terço expressa os dois tipos de toxinas. As toxinas termoestáveis são denominadas STaP (produzida por ETEC de animais e seres humanos), STaH (produzida por ETEC de seres humanos) e STb (encontra-se em isolados de suíno). Quanto às toxinas termolábeis existem dois tipos: LTIh (LTIh – ETEC de seres humanos e LTIp – ETEC de suínos e seres humanos) e LTII (LT-IIa e LT-IIb – isolados de seres humanos, e com menor frequência de bovinos e bubalinos) (Yamamoto e Yokota, 1983, Nataro e Kaper 1998; Nagy e Fekete 2005; Croxen e Finlay, 2010; Mainil, 2013).

2.3.3. *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGENICA (EPEC)

A EPEC foi descoberta em 1945 e ainda hoje é considerada a mais versátil entre as categorias diarreicogênicas. Este patotipo foi o primeiro a ser associado a diarreia num surto que ocorreu numa enfermaria pediátrica em Londres. Estas, são caracterizadas pela presença da ilha de patogenicidade *Locus of Enterocyte Effacement* (LLE) e ausência do gene *stx* que codifica as toxinas Shiga. Em 1995, a EPEC foi classificada em duas subcategorias, nomeadamente a EPEC típica (tEPEC) e atípica (aEPEC). Ambas são identificadas pela presença do gene *eae* (EPEC *attaching and effacing*). A diferença entre elas consiste na presença (EPEC-t) ou ausência (EPEC-a) do plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*), que é responsável pela codificação de genes necessários para a formação e expressão de fimbrias do tipo IV (*bundle-forming pilus* – BFP),

CAPÍTULO II ESTADO DA ARTE

importantes tanto para a autoagregação, aderência localizada e também pela dispersão deste tipo de patotipo (Levine *et al.*, 1985; Albert *et al.*, 1995; Albert, 1996; Fagundes-Neto e Scaletsky, 2000; Vieira *et al.*, 2001; Trabulsi *et al.*, 2002; Hazen *et al.*, 2013).

A EPEC-t representa a categoria original de EPEC com comportamento epidemiológico restrito aos seres humanos e patogenia bem definida. A EPEC-a está associada à diarreia humana e pode ser encontrada em diversos animais, alimentos, podendo estar distribuída em diferentes ambientes (Vidal *et al.*, 2007; Morato *et al.*, 2009; Moura, 2009).

Atualmente os surtos por esta categoria de *E. coli* são raros em países desenvolvidos, contudo continua a ser das maiores causas de mortalidade infantil em países em desenvolvimento (Nataro e Kaper, 1998).

2.3.4. ESCHERICHIA COLI ENTEROINVASIVA (EIEC)

A primeira descrição desta bactéria ocorreu em 1947, por Ewing e Gravatti em fezes de soldados americanos com diarreia durante a Segunda Guerra Mundial. Causou assim a doença denominada de disenteria bacilar. Normalmente o quadro clínico é caracterizado pela presença de diarreia líquida e possibilidade de ser também sanguinolenta, podendo ter a presença de leucócitos e muco, acompanhada de cefaleia, dores abdominais severas, febre, mau estar e calafrios (DuPont *et al.*, 1971; Faundez *et al.*, 1988; Moreno *et al.*, 2010).

As infecções por EIEC são mais usuais em países subdesenvolvidos, principalmente em crianças, sendo também associadas à diarreia de viajante. O seu maior reservatório é o trato gastrointestinal humano (Fratamico e Smith, 2006).

Estas estirpes são capazes de colonizar células do cólon intestinal humano, que por sua vez desencadeia uma infecção semelhante à provocada pela *Shigella* spp. A diferença de infecção entre estes organismos, consiste na dose infetante, sendo necessário uma dose maior de EIEC, na ordem de 10^6 , em relação à *Shigella*. O processo de invasão, multiplicação e disseminação leva à destruição da monocamada do epitélio intestinal (DuPont *et al.*, 1971; Parsot, 2005).

O processo de invasão está associado à presença do plasmídeo (pLNV), mais concretamente ao fragmento ial, o que permite também a diferenciação deste tipo de organismos com outras categorias de *E. coli* (Small e Falkow, 1988; Nataro e Kaper, 1998).

CAPÍTULO II ESTADO DA ARTE

2.3.5. *ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA (EAEC)

Em 1979, foram identificadas estirpes de *E. coli* que aderiam a monocamadas celulares, sendo observado posteriormente que a adesão ocorria em dois padrões distintos: Adesão localizada (AL) e Adesão difusa (AD). Mais tarde, foi ainda proposta a diferenciação da AD e Adesão agregativa (AA), sendo esta última caracterizada pela aglutinação das células bacterianas e a sua disposição em camadas em “tijolos empilhados” (Scaletsky *et al.*, 1984; Nataro *et al.*, 1985; Nataro *et al.*, 1987).

Estas estirpes são caracterizadas por não excretarem as enterotoxinas ST e LT, e formarem um padrão agregativo quando associadas às células Hep-2 e HeLa. Este padrão agregativo ocorre por fimbrias e fatores de aderência (Nataro *et al.*, 1992; Czczulin *et al.*, 1997).

A patogenicidade dos isolados de EAEC compreende a colonização da mucosa intestinal seguida pela secreção de enterotoxinas e citotoxinas, provocando uma diarreia secretória, assim como lesão da mucosa. EAEC alberga um plasmídeo de virulência designado pAA, sendo que alguns genes codificados no pAA são as fimbrias de aderência agregativa (AAF-I, II, III e IV) e o ativador transcricional aggR, sendo este empregado para diferenciar o patotipo EAEC em típica e atípica, baseado na presença ou ausência deste gene, respetivamente (Nataro *et al.*, 1994; Czczulin *et al.*, 1997; Nataro *et al.*, 1998; Harrington *et al.*, 2006).

Os alimentos contaminados parecem ser a principal fonte de infecção por EAEC e têm sido implicados em vários surtos de diarreia transmitidos por alimentos (Hedberg *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 1997).

As EAEC causam diarreia persistente (dura mais de duas semanas). São também associadas à má nutrição e crescimento retardado em crianças, quando não ocorre diarreia. Os surtos ocorrem tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos (Forsythe, 2002b; Torres *et al.*, 2005; Forsythe, 2010; Donnenberg, 2013).

2.3.6. *ESCHERICHIA COLI* DE ADESÃO DIFUSA (DAEC)

As estirpes que englobam este patotipo são definidas pelo seu padrão de AD a células HEp-2, onde se distribuem de forma uniforme sobre toda a superfície celular. O padrão de aderência difusa ocorre pela presença de adesinas codificadas por *afa* /*dra* / *daa* que levam à produção de adesinas fimbrias (F1845 e Dr) e não fimbriais (AfaE-I e AfaE-II). O gene que codifica a F1845 é o *daaE* e está presente tanto no cromossoma da bactéria como no plasmídeo e

CAPÍTULO II

ESTADO DA ARTE

apresenta homologia com os membros da família de adesinas afa / Dr (Scaletsky *et al.*, 1984; Bilge *et al.*, 1989; Nowicky *et al.*, 1990; Nataro e Kaper, 1998; Le Bouguéneq; Servin, 2006).

As DAEC induzem um efeito citopático caracterizado por lesões nas microvilosidades e desenvolvimento de extensões celulares longas, as quais envolvem a bactéria aderente. Também são capazes de provocar reação inflamatória nas células intestinais através da indução de secreção de IL-8, citocina capaz de estimular migração de leucócitos polimorfonucleares. No entanto, algumas estirpes de DAEC não induzem esta secreção em culturas de células de epitélio humano. Isto provavelmente deve-se ao fato do grupo de DAEC ser composto por organismos heterogêneos que diferem entre si quanto a sua patogenicidade (Bernet-Camard *et al.*, 1996; Betis *et al.*, 2003; Arikawa *et al.*, 2005).

As infecções por DAEC causam diarreia aquosa sem sangue / muco. O grupo mais suscetível são as crianças entre 4-5 anos de idade em países subdesenvolvidos, sendo que as crianças amamentadas têm imunidade passiva, uma vez que o leite materno humano contém proteínas que impedem a aderência das DAEC aos enterócitos (Nataro e Kaper, 1998; Fratamico e Smith, 2006).

2.3.7. ESCHERICHIA COLI PATOGENICA AVIÁRIA (APEC)

Uma das primeiras bactérias a colonizar o intestino das aves é a *E. coli*, sendo que após o nascimento é possível encontrar concentrações mais elevadas que $1,0 \times 10^6$ UFC / g de fezes. Esta colonização é desejável, uma vez que a presença deste agente no intestino permite exercer um efeito protetor contra a colonização de bactérias patogênicas como *Salmonella* spp., assim como auxiliar em processos de digestão de alimentos e absorção de alguns nutrientes sendo, portanto, designadas de AFEC (*Avian Fecal E. coli*) (Zanatta *et al.*, 2004; Ferreira e Knöbl, 2009).

A manifestação de APEC, que exhibe fatores de virulência ao contrário da AFEC, leva à ocorrência de várias manifestações clínicas através de diferentes tipos de processos infecciosos que são denominados por colibacilose aviária. Nas aves, a colibacilose inicia-se no epitélio traqueal, em contraste com a maioria das enfermidades causadas por *E. coli* em mamíferos, que têm afetado inicialmente o epitélio intestinal e urinário. A interação da bactéria com o hospedeiro e o ambiente podem assim estar associados a quadros de colisepticemia, peritonite, aerossaculite, pericardite, perihepatite, coligranuloma, salpingite, onfalite, celulite, doença respiratória crônica, pleuropneumonia, síndrome da cabeça inchada, sinovite, osteomielite e panoftalmia. O tratamento da colibacilose tradicionalmente é feito com antimicrobianos tais como ampicilina,

CAPÍTULO II

ESTADO DA ARTE

espectinomomicina, quilononas, cloranfenicol, neomicina, tetraciclina, trimetropim. Contudo, além da administração de antibióticos, é necessário corrigir o processo de criação das aves aplicando boas práticas de higiene, com o objetivo de diminuir o *stress* e prevenir novas infecções, uma vez que a superpopulação, ventilação precária, acumulação excessiva de amônia no ambiente, alimentação inadequada, avitaminoses e hipovitaminoses, presença de coccidioses e verminoses em geral, micoplasmas e viroses respiratórias, manuseio incorreto dos ovos férteis e incubadoras, são fatores que podem predispor a colibacilose aviária. Quando o produtor não inicia o seu tratamento ocorre a morte da ave por septicemia (Vidotto *et al.*, 1997; Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Kaper *et al.*, 2004; Dziva e Stevens, 2008; Knöbl *et al.*, 2012).

O controle da infecção provocada pelas estirpes APEC é difícil devido à falta de um método confiável para as identificar, bem como devido à falta de vacinas eficazes. Contudo, esta falha de método deve-se à grande variedade e diversidade das linhagens de APEC, que mesmo pertencendo claramente ao grupo filogenético ExPEC apresentam uma ampla diversidade sorológica (Blanco *et al.*, 1998; Moulin-Schouler *et al.*, 2007; Moriel *et al.*, 2010).

Vários genes de virulência estão ligados a colibacilose aviária, incluindo as adesinas, fatores de defesa anti-hospedeiro, sistemas de aquisição de ferro, autotransportadores, sistemas de transporte de fosfato, metabolismo do açúcar e a proteína IbeA. Diferentes isolados podem ter diferentes associações, codificadas por vários genes, e cada um induzir colibacilose aviária (Babai *et al.*, 1997; Cortes *et al.*, 2008; Dziva e Stevens, 2008; Rouquet *et al.*, 2009; Antao *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010)

Johnson *et al.* (2008) estudaram a epidemiologia molecular dos genes de virulência em isolados de *E. coli* de aves com doença clínica e isolados de aves saudáveis e verificaram que 5 genes de virulência transportados por plasmídeos (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* e *ompT*) eram comuns às estirpes de APEC com alta patogenicidade. Através da presença desses marcadores, chamados de preditores mínimos de virulência para aves, as estirpes comensais foram distinguidas de isolados de APEC altamente patogênicos.

Em 2012, Schouler *et al.*, conduziram os seus estudos tendo por base a serotipagem e genotipagem de virulência em isolados que originaram colibacilose aviária e isolados de animais saudáveis. Verificaram que 6 serogrupos (O1, O2, O5, O8, O18 e O78) eram predominantes em 57% dos isolados APEC e 13 genes de virulência surgiam com maior frequência, mas que nenhum deles de forma individual poderá transmitir informação relativamente à estirpe de APEC. Com estes resultados, foi elaborado um teste estatístico, método de modelo em árvore, que permitiu

CAPÍTULO II ESTADO DA ARTE

validar um teste de diagnóstico de PCR com base em quatro associações diferentes de fatores de virulência. Este método permite uma identificação de 70,2% das estirpes de APEC com uma margem de erro de 4,3%. O método de genotipagem descrito permite identificar com maior confiança os APEC do que os métodos clássicos de serotipagem usados.

Alguns estudos de fatores de virulência apontam para uma grande semelhança genética entre algumas estirpes do patotipo APEC e os restantes patotipos do grupo das ExPEC, o que reúne ainda estirpes de *E. coli* uropatogénicas (UPEC) e de meningite neonatal (NMEC) (Smith *et al.*, 2007).

2.4. Predominância dos patotipos DEC

De acordo com o boletim epidemiológico mais atualizado número especial 1, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (Silveira *et al.*, 2013), entre 2002 e 2012, em Portugal, foram detetadas as prevalências de patotipos identificados em 497 amostras de 1038 analisadas, sendo identificadas as suas percentagens na figura 4.

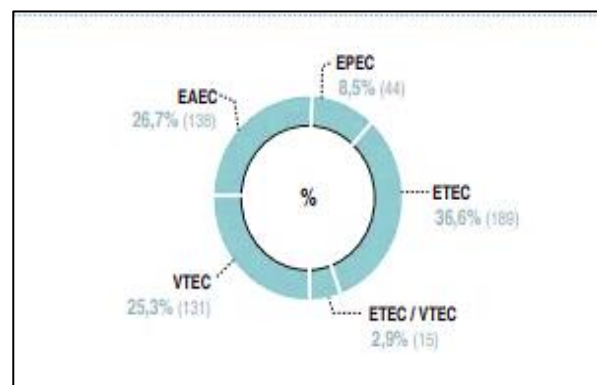


Figura 4: Percentagem total dos vários patotipos (DEC) de *Escherichia coli* detetados (Silveira *et al.*, 2013)

Inicialmente, nos anos 2002 e 2003, o patotipo mais comum era EAEC, seguido dos patotipos STEC (VTEC) e ETEC. Essa tendência inverteu em 2004 e manteve-se até 2012, sendo o patotipo mais frequente o ETEC, com exceção dos anos 2003 e 2008, como pode ser verificado nas figuras 5 e 6.

CAPÍTULO II ESTADO DA ARTE

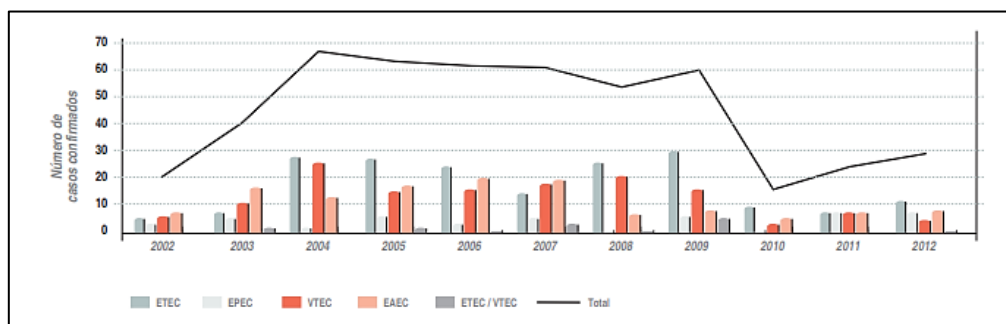


Figura 5: Número de casos confirmados dos vários patótipos de *Escherichia coli*, durante o período de 2002 e 2012 (Silveira *et al.*, 2013)

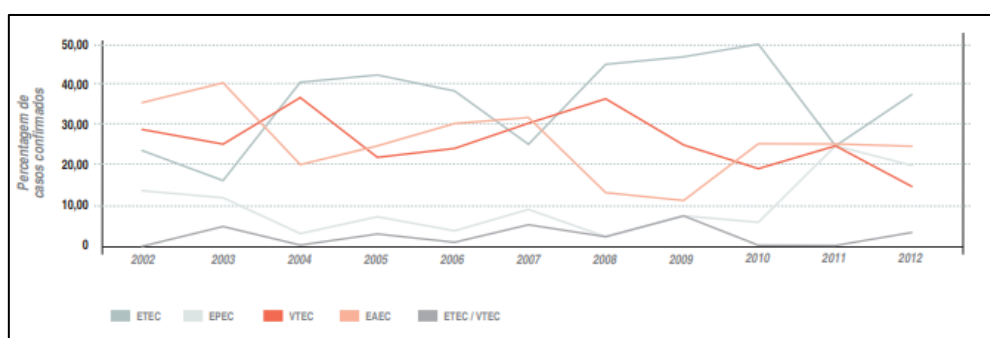


Figura 6: Número de casos confirmados dos vários patótipos de *Escherichia coli*, durante o período de 2002 e 2012 (Silveira *et al.*, 2013)

2.5. Surtos

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são definidas como aquelas usualmente de natureza infecciosa ou tóxica causada por agentes que invadem o organismo através da ingestão de alimentos. Existem aproximadamente 250 tipos de doenças alimentares, muitas são causadas por microrganismos patogênicos, os quais são responsáveis por sérios problemas de saúde pública e expressivas perdas econômicas (Buzby e Robert 2009).

De acordo com o Centro De Controle e Prevenção de Doenças (CDC), quando duas pessoas têm a mesma doença provocada pelo mesmo alimento ou bebida contaminada, o evento é designado de surto. Em 2006, o ECDC era a principal agência de saúde pública, investigando os surtos com a finalidade de os controlar, assim como de fornecer informação para impedir o seu surgimento no futuro. Analisando a tabela 2, é possível verificar os surtos descritos pela ECDC entre 2016 e 2019 (FDA, 2019).

De acordo com o ECDC, os fatores que contribuem para a ocorrência das DTA podem ser agrupados como: a) aqueles que influenciam na contaminação dos alimentos, b) os que permitem

CAPÍTULO II ESTADO DA ARTE

a proliferação dos patogénicos e c) os que permitem a sobrevivência dos patogénicos nos alimentos.

Tabela 2: Surtos provocados por *Escherichia coli* entre 2016 e 2019 (FDA, 2019)

Ingrediente	Patotipo	Casos reportados	Nº de hospitalizações	Nº de Mortes	Ano
Produtos de carne de bezerro	STEC	33	18	0	2019
Farinha	STEC	21	3	0	2019
Carne picada	STEC	209	29	0	2019
Alface Romana	STEC	62	25	0	2018
Carne picada	STEC	18	6	1	2018
Alface Romana	STEC	25	9	1	2018
<i>Leafy greens</i>	STEC	25	9	1	2018
Manteiga de soja	STEC	32	12	0	2017
Produtos de carne de bovino	STEC	11	7	0	2016
Farinha	STEC	63	17	0	2016
Brotos de alfafa	STEC	11	2	0	2016

2.6. Prevenção das doenças de origem alimentar

Existem três importantes linhas de defesa contra doenças de origem alimentar, nomeadamente melhorar a qualidade higiénica dos alimentos crus, utilizar tecnologias de processamento de alimentos e, a educação de todos os manipuladores de alimentos, incluindo os consumidores em casa. Apesar dos surtos ocorridos em casa serem menos notificados do que os que acontecem a nível comercial e coletivo, e serem também menos investigados pelos serviços de saúde, na Europa a FAO/WHO (2002) concluiu que “as casas privadas são o local onde a maior parte das toxinfecções alimentares ocorrem” (Viegas, 2014).

Os erros mais comuns na manipulação e preparação de alimentos em casa estão relacionados com a temperatura e tempos incorretos utilizados na conservação e confeção dos alimentos e todas as ações que resultam na contaminação cruzada. Durante a preparação de alimentos crus, os microrganismos patogénicos são espalhados a partir dos alimentos contaminados para as superfícies de contacto na cozinha durante a preparação da refeição,

CAPÍTULO II

ESTADO DA ARTE

aumentando o risco de doenças de origem alimentar. Se estes microrganismos persistirem vivos podem levar a um aumento de risco de contaminação cruzada entre manipuladores, alimentos prontos a comer e outras superfícies de contato com alimentos. As boas práticas do consumidor podem influenciar o impacto da alimentação na saúde (Viegas, 2014).

2.7. ANTIBIÓTICOS

Em 1928, Alexander Fleming descobriu uma substância natural (penicilina) produzida por um fungo dotada de propriedades antibacterianas, foi uma grande descoberta da altura, uma vez que permitiu erradicar muitas das doenças causadas por bactérias. Estas substâncias naturais apenas em 1942 é que tiveram uma designação de antibiótico por Waksman (Sousa, 2006; Ribeiro *et al.*, 2009).

Os antibióticos e agentes antimicrobianos são medicamentos que matam ou retardam o crescimento das bactérias, de forma a tratar as infeções. Existem mais de 15 classes diferentes de antibióticos que se diferenciam entre si pela sua estrutura química e pelo seu modo de ação contra as bactérias, figura 7. Os modos de ação para as diferentes classes de antibióticos estudadas são diferentes, como é possível verificar na tabela 3. Cada antibiótico tem um espectro de atividade que define quais os microrganismos que são combatidos eficazmente. Quanto mais amplo for o seu espectro mais espécies de microrganismos ele consegue atingir. A sua ação pode ser bactericida no caso dos antibióticos que matam o microrganismo e bacteriostático quando impedem o desenvolvimento / crescimento dos microrganismos. A seleção do antibiótico no tratamento das infeções deve seguir alguns critérios tais como o seu espetro de ação, os órgãos e tecidos onde a sua difusão é facilitada, as limitações do organismo do animal ou pessoa, assim como o seu grau de toxicidade e a facilidade na utilização do antibiótico (Sousa, 2006; Kester *et al.*, 2008; Gumz *et al.*, 2015).

CAPÍTULO II
ESTADO DA ARTE

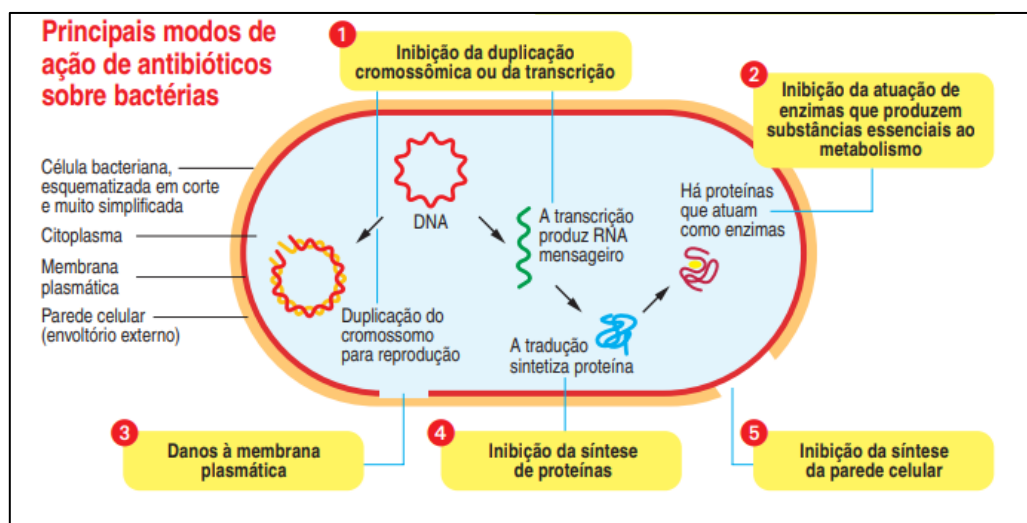


Figura 7: Principais modos de ação de antimicrobianos sobre as bactérias (Retirada de Canto, 2010)

Tabela 3: Exemplos de famílias de antibióticos e o seu modo de ação (adaptado de INFARMED, 2019)

	Beta	Amin	Tet	Mac	Clor	Quin	Piri	Sul
Inibidores da parede celular	+	-	-	-	-	-	-	-
Inibidores de síntese proteica	-	+	+	+	+	-	-	-
Inibidores de síntese de ácidos nucleicos	-	-	-	-	-	+	-	-
Inibidores de processos metabólicos	-	-	-	-	-	-	+	+

*Beta (B-lactâmicos); Amin (Aminoglicosídeos); Tet (tetraciclina); Mac (Macrólidos); Clor (Cloranfenicol); Quin (Quinolonas); Piri(Pirimidinas); Sul (Sulfonamidas).

* (+) Modo de ação; (-) Não associado ao modo de ação

De acordo com os diferentes grupos de antimicrobianos os β -Lactâmicos são os antibióticos que têm uma importância elevada, uma vez que são bastante eficientes e apresentam uma baixa toxicidade para os animais, incluindo o Homem. Estes antibióticos atuam na fase final da síntese do peptidoglicano, inibindo a transpeptidação. Neste grupo de antibióticos incluem-se as penicilinas, cefalosporinas (1^a, 2^a, 3^a e 4^a geração), monobactâmicos e carbapenemos. Os aminoglicosídeos constituem um grupo bastante heterogêneo quanto à sua composição química, propriedades antibacterianas e propriedades farmacológicas. De forma geral estes antibióticos interferem na síntese proteica. Entre os representantes deste grupo destacam-se a neomicina, a gentamicina, tobramicina, ampicilina e a estreptomicina. As tetraciclina apresentam um espectro alargado atuando sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas. Este antibiótico liga-se à subunidade ribossomal 30S e inibe a ligação do aminoacyl-tRNA ao local A do ribossoma. O seu

CAPÍTULO II

ESTADO DA ARTE

baixo custo faz com que seja bastante usado em medicina humana e animal, contudo, é necessário algum cuidado na sua administração devido à sua capacidade de quelatar o íon cálcio, assim como apresenta outros efeitos adversos a nível de reações de hipersensibilidade, fototoxicidade, irritações gástricas, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. As tetraciclinas impedem o crescimento dos microrganismos, atuando como bacteriostáticas. Quanto aos macrólidos, são antibióticos inibidores da síntese proteica, ligam-se de forma reversível à subunidade 50S dos ribossomas. De acordo com o seu número de átomos, estes são caracterizados em diferentes famílias. Podem atuar como bacteriostáticos e bactericidas, de acordo com sua concentração, densidade populacional bacteriana e a fase de crescimento. São antibióticos mais usados para bactérias Gram-positivas, contudo, podem também ser usados em bactérias Gram-negativas. Entre os fenicóis, o cloranfenicol foi utilizado na terapêutica como um antibiótico de largo espectro, atuando sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Este é um antibiótico inibidor da síntese proteica bacteriostático, atuando na subunidade 50S. As quinolonas, são antibióticos de síntese química que derivam do ácido nalidíxico. Inibem a topoisomerase IV e a DNA girase interferindo assim com o enrolamento do DNA bacteriano, impedindo a replicação e a transcrição do DNA. Sendo assim, a estrutura química das quinolonas determina o seu modo de ação bacteriano. Existem quatro gerações de quinolonas: 1ª geração que apresenta moderada atividade contra bactérias Gram negativas, mas praticamente baixa atividade para as bactérias Gram-positivas, que é o exemplo do ácido nalidíxico; 2ª geração com boa atividade para bactérias Gram-negativas, contra patogénicos atípicos intracelulares e com ação limitada para bactérias Gram-positivas, como por exemplo, ciprofloxacina; 3ª geração é constituída por antibióticos com boa atividade contra bactérias Gram negativas, contra patogénicos atípicos intracelulares e uma boa ação contra bactérias Gram-positivas, como por exemplo, levofloxacina; finalmente, a 4ª geração é constituída por moléculas com boa atividade contra bactérias Gram negativo, com muita boa ação contra bactérias Gram-positivas, contra bactérias atípicas e com boa atividade contra anaeróbios estritos, como por exemplo, trovafloxacina. As quinolonas apresentam efeito prolongado, permitindo assim, intervalos de dose de 12 horas, o que favorece a adesão ao tratamento. Para o grupo das pirimidinas, encontra-se o trimetropim, que impede a conversão do ácido di-hidrofólico em ácido tetra-hidrofólico. É utilizado em infeções urinárias, disenteria bacilar e infeções de trato respiratório inferior, e atua tanto em bactérias Gram-negativas como Gram-positivas. Finalmente, relativamente as sulfonamidas, é dos grupos mais utilizados devido ao seu baixo custo e à sua relativa eficácia em algumas doenças bacterianas comuns, As sulfonamidas são análogos estruturais do ácido *p*-

CAPÍTULO II

ESTADO DA ARTE

aminobenzoico (PABA) e impedem a sua incorporação na molécula de ácido fólico, dificultando assim, a sua biossíntese que é essencial para o crescimento e multiplicação bacteriana. Assim, as sulfonamidas têm um efeito bacteriostático, impedindo o crescimento bacteriano por carência do ácido fólico. Estas inibem tanto as bactérias Gram-positivas como as Gram-negativas (Chopra *et al.*, 2001; Marin *et al.*, 2003; Mascaretti *et al.*, 2003; Jain e Danziger, 2004; Sousa, 2006; Robles *et al.*, 2008)

2.7.1. RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Define-se uma bactéria resistente a um determinado antibiótico, quando a bactéria mantém as suas funções e divide-se, dando origem a novas gerações de bactérias, na presença do mesmo antibiótico (Castanheira, 2013).

Sendo a resistência aos antibióticos uma realidade nos animais da cadeia alimentar, são os agricultores, os médicos veterinários, os trabalhadores das explorações e dos matadouros, bem como os seus coabitantes, os grupos mais expostos à colonização por bactérias resistentes. A consequente disseminação da resistência à comunidade e a ambientes hospitalares, e posterior propagação às bactérias patogénicas, torna a resistência aos antibióticos um fenómeno que flui entre o homem, os animais e o meio ambiente. (Amaro *et al.*, 2019).

De acordo com o relatório *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe* de 2018 descrito pelo ECDC (2019) sobre a resistência aos diferentes grupos de antibióticos por diferentes bactérias, foi possível verificar que na União Europeia, mais da metade (58,3%) dos isolados de *E. coli* relatados em 2018 apresentaram resistência a pelo menos um dos grupos antimicrobianos sob vigilância regular (aminopenicilinas, fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos e carbapenemos). A maior percentagem média de resistência da população foi relatada para aminopenicilinas (57,4%), seguida por fluoroquinolonas (25,3%), cefalosporinas de terceira geração (15,1%) e aminoglicosídeos (11,1%). Já a resistência aos carbapenemos permaneceu rara. Além disto, foi detetado também resistências a múltiplos grupos antimicrobianos. As tendências entre 2015 e 2018 na União Europeia, apresentaram-se favoráveis, uma vez que houve um ligeiro decaimento, mas significativo, para as aminopenicilinas, aminoglicosídeos e carbapenemos, mas para as fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira geração as resistências aumentaram significativamente durante o mesmo período. Relativamente a Portugal, a tendência a nível dos grupos antibióticos sob vigilância regular entre 2015 e 2018 está com uma representatividade favorável, uma vez que as percentagens encontradas estão a

CAPÍTULO II

ESTADO DA ARTE

decrecer, com exceção dos carbapenemos, que apesar de variar entre os 0% e os 0,5%, esta está a subir. Apesar destes valores, o problema ainda está em voga, pois as questões de saúde pública continuam a aparecer, e com isto é necessária uma redução das infeções causadas por esta bactéria (ECDC, 2019).

2.7.2. MULTIRRESISTÊNCIA

Diferentes definições para bactérias multirresistentes (MDR) estão a ser usadas na literatura médica para caracterizar os diferentes padrões de resistência encontrados em bactérias. Assim, um grupo de especialistas internacionais reuniu-se por meio de uma iniciativa conjunta do ECDC e do Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), para criar uma terminologia internacional padronizada com a qual descrever perfis de resistência. Categorias de antimicrobianos epidemiologicamente significativas foram construídas para cada bactéria de acordo com documentos e *breakpoints* do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), do Comité Europeu de Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST) e da *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos. MDR foi definido como suscetibilidade não adquirida a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos (Magiorakos *et al.*, 2011).

2.7.3. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Os mecanismos de resistência bacterianas são um fenómeno que pode ser intrínseco (natural) do microrganismo ou adquirido por transmissão de material genético ou mutação. A capacidade natural de resistência é uma capacidade inata de determinada espécie bacteriana, que ocorre sem a exposição prévia ao antibiótico. Já a resistência adquirida está associada a mecanismos de aquisição de genes através de dois grandes mecanismos: mutação num *loci* do cromossoma (reposição, deleção, inserção ou inversão) ou por aquisição de genes por transferência horizontal de genes (transformação, transdução, conjugação e transposição) (Veiga, 1984; Neihardt, 2004; Rice e Bonomo, 2005; Dzidic *et al.*, 2008).

De acordo com o tipo de antibiótico utilizado, os mecanismos de resistência vão variando, de acordo com a tabela 4.

CAPÍTULO II ESTADO DA ARTE

Tabela 4: Mecanismos de resistência para as diferentes classes de antibiótico (Batista, 2013)

	Beta	Amin	Tet	Mac	Clor	Quin	Piri	Sul
Alteração das PBP	+	-	-	-	-	-	-	-
Produção enzimática	+	+	+	+	+	+	-	+
Alteração da permeabilidade	+	+	+	+	+	+	-	+
Bombas de efluxo	+	-	+	+	+	+	+	-
Alteração do alvo	-	+	+	+	+	-	+	+
Proteção do alvo	-	-	-	-	-	+	-	-

*Beta (B-lactâmicos); Amin (Aminoglicosídeos); Tet (tetraciclinas); Mac (Macrólidos); Clor (Cloranfenicol); Quin (Quinolonas); Piri (Pirimidinas); Sul (Sulfonamidas).

* (+) Associado; (-) Não associado

As ESBL associadas a agentes patogênicos tornam-se um grande problema para a saúde pública. Nos últimos tempos, a sua disseminação na comunidade, é uma realidade que pode condicionar a terapêutica empírica. A colonização fecal de pessoas saudáveis com bactérias produtoras ESBL é uma realidade que pode comprometer o controlo de infeção nos cuidados de saúde hospitalares e na prestação cuidados continuados. Os animais domésticos e selvagens poderão contribuir para esta disseminação assim como produtos alimentares (Lima e Ferreira, 2013).

A produção de β -lactamases é o mecanismo de resistência a antibióticos dentro dos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas. As principais enzimas desta subclasse são as TEM e SHV, codificadas pelos genes *bla*TEM e *bla*SHV, veiculados por plasmídeos. Estes são suscetíveis aos antibióticos inibidores de β -lactamases, como ácido clavulânico. (Drawz e Bonomo, 2010).

Para caracterizar as β -lactamases mediadas por plasmídeos capazes de hidrolisar cefalosporinas de largo espectro, surgiu o termo ESBL. A enzima responsável é a SHV-2, derivada da TEM e SHV por mutação. Em *E. coli* também foi identificado o gene CTX-M que não deriva desses genes, e é caracterizado pela sua alta capacidade de hidrolisar a cefotaxima (Harada *et al*, 2008).

Duas estratégias têm sido utilizadas para superar a resistência dos β -lactâmicos à β -lactamase. A primeira é a modificação da estrutura do antibiótico de forma que não haja mais substrato para a enzima hidrolisar, e a segunda pela inibição da enzima por um composto que seja estruturalmente relacionado ao substrato beta-lactâmico. Os inibidores de β -lactamase são estruturalmente semelhantes às penicilinas, retendo a ligação amida do grupo β -lactâmico, mas possuem uma cadeia lateral modificada. Tais aspetos estruturais permitem aos inibidores ligar-se irreversivelmente às β -lactamases como substratos suicidas, mantendo-as inativas. Atualmente,

CAPÍTULO II

ESTADO DA ARTE

três inibidores de β -lactamase são frequentemente usados na clínica médica, sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico (Moosdeen, 1996; Williams, 1999).

2.7.4. BACTÉRIAS HETERORRESISTENTES

A heterorresistência é reconhecida desde pelo menos 1947 e pode ocorrer tanto em bactérias Gram-positivas como Gram-negativas. Este termo ao longo dos tempos foi usado de forma inadequada devido à falta de métodos não padronizados, devido à elevada mão de obra e custo, para definir bactérias heterorresistentes. De forma mais global, uma bactéria heterorresistente descreve um fenómeno onde subpopulações de bactérias aparentemente isogénicas exibem uma gama de suscetibilidades a um determinado antibiótico. O estudo destas bactérias é importante, uma vez que no tratamento clínico de infeções poderá haver uma seleção de subpopulações mais resistentes aos antibióticos administrados (El-Halfawy e Valvano, 2015).

CAPÍTULO III
MATERIAL E MÉTODOS

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAGEM

Os isolados estudados neste trabalho provêm de fezes de galinhas poedeiras e reprodutoras, e fezes de bovinos armazenadas na coleção de culturas do INIAV.

Relativamente aos isolados de galinhas reprodutoras e poedeiras, num estudo anterior das amostras recolhidas das fezes ou botas dos produtores, em 61 amostras foram seleccionadas aquelas que em meio TBX apresentavam colónias de *E. coli*, e seguidamente apresentavam na fase inicial resistência a ampicilina e resistência a enrofloxacina. As que apresentaram resistência nesses meios, foram as estirpes seleccionadas para conduzir este estudo, num total de 79 isolados (37 isolados apresentaram resistência à ampicilina (Amp) e 42 isolados apresentaram resistência para enrofloxacina (Enro), sendo 30 isolados provenientes de fezes de galinhas poedeiras e 50 isolados de fezes de galinhas reprodutoras. Os isolados foram obtidos de amostras enviadas para o Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do INIAV – Polo de Vairão para controlo de *Salmonella* spp., de diferentes locais: Viseu, Aveiro, Gouveia, Coimbra, Leiria, Castelo Branco, Tomar, Caldas da Rainha e Lisboa e Vale Tejo. As amostras obtidas correspondem a períodos de recolha entre o final de março até ao final de maio de 2019.

Os isolados de fezes de bovino predominantemente da raça Holstein Frísia foram recolhidos em 4 explorações leiteiras de Barcelos (L1, L2 e L4) e de Ponte de Lima (L3). Com exceção da L2, todas as amostras foram recolhidas de vacas de lactação. A L2 foi de novilhas com idades entre os 6 e 24 meses. A colheita foi realizada em períodos diferentes: a exploração L1 em novembro, a L2 em dezembro, a L3 em janeiro e a L4 em fevereiro (L1 e L2 de 2017 e L3 e L4 de 2018). Num estudo anterior, estas amostras foram rastreadas relativamente à presença de STEC. Todos os isolados conservados que não foram considerados STEC, foram utilizados neste estudo (14 isolados de L1, 11 isolados de L2, 19 isolados de L3 e 17 isolados de L4).

A identificação dos isolados de fezes de bovinos e fezes de galinha encontram-se descritos com maior pormenor no anexo A.

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

3.2. REAGENTES, MEIOS DE CULTURA E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Na tabela 5 estão listados os meios de cultura, utilizados para a realização do trabalho experimental.

Tabela 5: Meios de cultura, marca e referência e finalidade de utilização

Meio	Marca e referência	Finalidade de utilização
<i>Heart Infusion Agar</i> (HIA)	Difco, BD, Ref: 24400	Repicagem e armazenamento das culturas conservadas em crioviais
MacConkey Sorbitol (SMac)	Liofilchem, Ref: 610108	Verificar a ocorrência da fermentação do sorbitol
Columbia 5% sangue Carneiro	Biogerm, Ref: MP020.1276	Verificar a presença ou ausência de hémolise
Caldo triptofano	Liofilchem, Ref: 620197	Verificar a produção de Indol
<i>Tryptone bile X-glucuronide</i> (TBX)	Biokar Diagnostics, Ref: BK146HA	Pesquisa de B - glucoronisase
<i>MacConkey</i> (MAC)	Biolife, Ref: 4016702	Verificar se ocorre a fermentação da lactose
<i>SIM Medium</i>	BD, Ref:211578	Aferir a ocorrência de mobilidade, produção de Indol e produção de H ₂ S
<i>Simmons Citrate Agar</i>	BD, Ref:211620	Aferir se ocorre a utilização do citrato de sódio como única fonte de carbono
<i>Triple Sugar Iron Agar</i> (TSI)	OXOID, Ref:CM0277	Aferir se ocorre a fermentação da glicose, glucose, lactose e produção de H ₂ S.
<i>Tryptic Soy Agar</i> (TSA)	Merck, Ref: VM856858844	Repicagem dos isolados para extração
Tryptic Soy Broth (TSB)	Biolife, Ref: IB6601	Crescimento dos isolados para extração
<i>Muller-Hinton Agar</i>	Mueller-Hinton Broth (VWR, Ref: 84648.0500) Agar Granulated (nzytech, Ref: MB02902)	Elaborar os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

Todos os meios foram preparados seguindo as instruções do fabricante, e foram autoclavados (Trade RAYPA) com a finalidade de esterilizar os meios de cultura a 121 °C durante 15 min.

3.3. CRESCIMENTO DOS ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* CONSERVADOS A – 80 °C

As culturas de *E. coli* dos crioviais armazenados a – 80 °C foram isoladas em meio HIA e incubadas a 37 °C durante 20 ± 4 h. Após incubação verificou-se a existência de colônias isoladas e a pureza das mesmas). Seguidamente, para preparar culturas de trabalho repicaram-se para tubos com meio HIA inclinado, incubaram-se a 37 °C durante 20 ± 4 h. Após incubação conservaram-se em refrigeração.

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

3.4. TESTES BIOQUÍMICOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI*

3.4.1. FERMENTAÇÃO DO SORBITOL

Para verificar o comportamento dos isolados relativamente à fermentação do sorbitol repicou-se a cultura do tubo HIA para SMac. Incubou-se a 37 °C durante 20 ± 4 h. Os isolados que não fermentam sorbitol do meio, apresentam-se incolores, e os que fermentam o sorbitol do meio apresentam-se com uma cor rosa.

3.4.2. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Para aferir o comportamento dos isolados quanto à sua capacidade hemolítica repicou-se a cultura do tubo HIA para meio de gelose com sangue de carneiro. Incubou-se a 37 °C durante 20 ± 4 h. Considerou-se um resultado positivo quando se obtinha uma zona cinza-esverdeada no meio de cultura ao redor da colónia, ou uma zona transparente ao redor da colónia.

3.4.3. PRODUÇÃO DE INDOL

Repicou-se uma colónia de cada isolado para tubos com caldo triptofano e incubou-se a 37 °C durante 20 ± 4 horas. Após o tempo de espera, acrescentou-se uma gota de reagente de Kovacs (OXOID, Ref: MB0209A) e leu-se os resultados. O aparecimento de um anel avermelhado indica a presença da enzima triptofanase.

3.4.4. PESQUISA DE B-GLUCORONIDASE

Após o teste do Indol, quando se obteve resultado negativo para determinados isolados, e aquando a repicagem elaborada para HIA a partir dos crioviais não apresentava colónias puras, repicou-se as estirpes em meio TBX, incubou-se a 37 °C durante 20 ± 4 h e verificou-se se existiam, e quais as colónias que se apresentaram típicas de *E. coli* neste meio (cor azul esverdeada), para os próximos passos do estudo. Depois deste procedimento realizou-se novamente o teste do Indol.

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

3.4.5. FERMENTAÇÃO DA LACTOSE MACCONKEY

Para as estirpes que continuaram a aparecer como Indol negativo, repicou-se em meio MacConkey para verificar se fermentavam ou não a lactose. As mesmas foram incubadas a 37 °C durante 20 ± 4 h. Um resultado positivo para *E. coli* corresponde a colónias avermelhadas.

3.4.6. IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA POR BBL™ CRYSTAL™

Para complementar os resultados de MacConkey, bem como para caracterizar as estirpes em dúvida após o PCR, realizou-se um teste de BBL Crystal (BD, Ref 245920) para aferir se as estirpes isoladas são ou não *E. coli*. Assim, recolheu-se 3 a 4 colónias da estirpe, colocou-se no caldo salino triptona (diluyente de recuperação máxima), espalhou-se sobre a galeria do BBL CRYSTAL e incubou-se 37 °C durante 20 ± 4 h. No fim, leram-se os resultados, conforme o código obtido.

3.4.7. TESTES ADICIONAIS EM MEIO SIM, CITRATO E TSI

Para a estirpe que continuou a aparecer como Indol negativo, procedeu-se a três testes bioquímicos: um por picada central no tubo com meio SIM para aferir a sua mobilidade, produção de Indol e produção de H₂S; outro por repicagem em tubo inclinado com meio Citrato de forma a aferir se ocorria a utilização do citrato de sódio como única fonte de carbono juntamente com sais de amónia como fonte de azoto; e finalmente outro por repicagem em tubo inclinado com meio TSI, para aferir se ocorre a fermentação da glicose, glucose, lactose e produção de H₂S. Incubou-se todos os tubos com diferentes meios a 37 °C durante 20 ± 4 horas. Um resultado positivo para *E. coli* no meio SIM corresponde a apresentação de mobilidade, indol positivo e não ocorrer a produção de H₂S; para o meio de Citrato, não ocorrer alteração de cor do meio e, finalmente no meio de TSI, ocorre a fermentação dos componentes descritos acima e também não pode ocorrer a produção de H₂S tal como no meio SIM.

3.5. CONSERVAÇÃO DE CULTURAS EM CRIOVIAS

Para conservar os isolados inicialmente contaminadas, prepararam-se novos crioviais. Inicialmente preparou-se tubos *falcon* com 5 ml de TSB. De seguida, extraiu-se uma colónia do isolado puro em placa e incubou-se com agitação (SKI 4 Shaking Incubator) a 37 °C durante 20 ±

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

4 h. De seguida, colocou-se 20% glicerol esterilizado num *ependorf* (210 μ l) e 790 μ l da solução anterior. Posteriormente conservou-se a -80 °C.

3.6. EXTRAÇÃO DO DNA

A extração de DNA utilizado para a determinação dos grupos filogenéticos, patotipos e genes resistência a antibióticos por PCR foi realizada a partir da cultura obtida em TSB. Após o crescimento retirou-se 1 ml do tubo para um *ependorf* e centrifugou-se (BIO RAD: Model 16 Microcentrifuge) a 14 rpm durante 5 min. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 ml de H₂O ultrapura esterilizada e colocou-se a 95 °C durante 15 minutos (VWR: Digital Healthblock), seguidamente elaborou-se uma nova centrifugação. Finalmente, procedeu-se à separação do sobrenadante, retirando aproximadamente 800 μ l para um novo *ependorf* esterilizado. Por último, congelou-se o DNA dos isolados a -20 °C, figura 8.

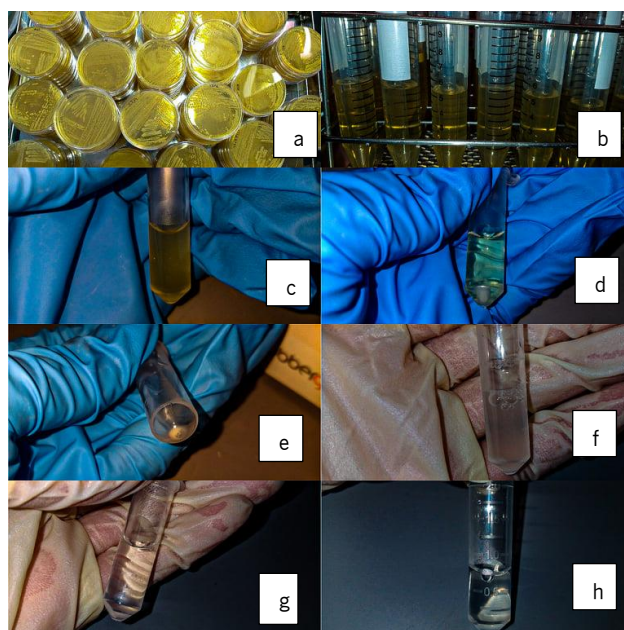


Figura 8: Processo de extração: a) Isolados após crescimento em meio TSA; b) Crescimento de uma colônia em meio TSB; c) 1 ml do isolado de TSB d) Centrifugação; e) Descarte do sobrenadante; f) tubo com H₂O após 95 °C; g) centrifugação e h) armazenamento do sobrenadante

3.7. RESSUSPENSÃO E DILUIÇÃO DOS PRIMERS

A cada tubo contendo o *primer* adicionou-se a quantidade de água ultrapura estéril indicada pelo fornecedor (Eurofins Genomics) por forma a obter uma concentração de 1000 μ mol/ μ l. De seguida, diluíram-se conforme as concentrações pretendidas para o PCR.

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

3.8. PCR

3.8.1. DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS-FILOGENÉTICOS DE ESCHERICHIA COLI

Para elaboração e determinação dos grupos filogenéticos foram utilizados os *primers* designados por Clermont *et al.*, 2013.

A solução de amplificação foi preparada com PCR *master mix multiplex* PCR NZTYtaq 2x Green Master mix (NZYTech, Ref: MB335), e os seguintes *primers*: *arpA* (2 µM), *chuA* (1 µM), *yjaA* (1 µM) e *TspE4.C2* (1 µM) (Eurofins Genomics) (*forward* e *reverse*) descritos na tabela 6.

Tabela 6: *Primers* utilizados para a determinação dos grupos filogenéticos

Primer	Alvo	Sequência (5'–3')	Produto de PCR (bp)
<i>chuA fwd</i>	<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288
<i>chuA rev</i>		TGCCGCCAGTACCAAAGAC	
<i>yjaA fwd</i>	<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211
<i>yjaA rev</i>		AATGCGTTCCTCAACCTGTG	
<i>TspE4C2 fwd</i>	<i>TspE4.C2</i>	CACTATTTCGTAAGGTCATCC	152
<i>TspE4C2 rev</i>		AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC	
<i>Acek fwd</i>	<i>arpA</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400
<i>ArpA rev</i>		TCTCCCCATACCGTACGCTA	

Na preparação da mistura de PCR, considerou-se o número de amostras a ser validadas, três controlos positivos para os genes a ser estudados (O11; O157:H7 e K12) e um controlo negativo (sem DNA) por reação de PCR. O volume de reação utilizado foi de 20 µl usando 2,4 µl do DNA extraído como *template*. As condições de PCR foram as seguintes: 3 minutos a 95 °C, seguidamente 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 58 °C, 30 segundos a 72 °C, durante 39 ciclos, e finalmente, 5 min a 72 °C. A partir da elaboração deste PCR obteve-se os seguintes filogrupos descritos na tabela 7.

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 7: Caracterização dos filogrupos dos isolados de *Escherichia coli* (Clermont *et al.*, 2013).

	<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE4.C2</i>
A	+	-	-	-
A ou C	+	-	+	-
B1	+	-	-	+
B2	-	+	+	-
B2	-	+	-	+
B2	-	+	+	+
E ou D	+	+	-	-
E ou D	+	+	-	+
E ou Clade I	+	+	+	-
F	-	+	-	-
(a)	+	-	+	+

(a) Necessário recorrer ao MLST para identificação do grupo filogenético

(b) (+) presença de bandas e (-) ausência de bandas

Para a separação dos grupos filogenéticos, onde poderiam ser do grupo A ou C, E ou D, ou E ou *clade* I utilizaram-se outros dois pares de *primers*.

Para a distinção do grupo E ou D, ou E ou *clade* I, colocou-se PCR *master mix multiplex* PCR NZTYtaq 2x *Green Master Mix* (nzytech, Ref: MB335), *arpA* (2 µM), tabela 8 e H₂O ultrapura. Para a preparação da mistura de PCR, considerou-se o número de amostras a ser validadas para estes grupos filogenéticos, um controlo positivo para o gene a ser estudado (O157:H7) e um controlo negativo (sem DNA) por reação de PCR. Após a preparação da mix de acordo com o número de amostras, os controlos e o branco, colocou-se 17,4 µl da mix preparada e 2,4 µl de DNA extraído como *template*. Finalmente, amplificou-se as amostras de acordo com as condições do ciclo de PCR (5 minutos a 95 °C, seguidamente 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 57 °C, 9 segundos a 72 °C, durante 30 ciclos, e finalmente, 5 min a 72 °C).

Tabela 8: *Primers* utilizados para a distinção do filogrupo E, D ou *Escherichia clade* I

<i>Primer</i>	<i>Alvo</i>	<i>Sequência (5'–3')</i>	<i>Produto de PCR (bp)</i>
ArpAgpE.f	arpA	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301
ArpAgpE.r		GAAAAGAAAAGAATTCCCAAGAG	

Para a distinção do grupo A ou C preparou-se a solução de amplificação de forma diferente das restantes já mencionadas, devido ao elevado cloreto de magnésio na *master mix* usada, pois provoca a amplificação de bandas inespecíficas. Assim, colocou-se MgCl₂ (1,5 mM), Taq buffer (1x), *trpA fwd* e *rev* (0,25 µM), Taq (1U), (NZYtaq II Dna polymerase, ref: MB354) dNTPs (NZYSet, ref:

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

MB08701) (0,25 μM) e H_2O ultrapura. Para a preparação da mistura de PCR, considerou-se o número de amostras a ser validadas para este grupo filogenético, um controlo positivo para o gene a ser estudado (FV19459) e um controlo negativo (sem DNA) por reação de PCR, tabela 9. Após a preparação do volume de reagente de acordo com o número de amostras, os controlos e o branco, colocou-se 19 μl da mix elaborada e 1 μl de DNA extraído como *template*. Finalmente, amplificou-se as amostras de acordo com as condições do ciclo de PCR (5 minutos a 95 °C, seguidamente 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 59 °C, 6 segundos a 72 °C, durante 30 ciclos, e finalmente, 5 min a 72 °C).

Tabela 9: *Primers* utilizados para a distinção do grupo A ou C

Primer	Alvo	Sequência (5'-3')	Produto de PCR (bp)
<i>trpAgpC.1 fwd</i>	trpA	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	219
<i>trpAgpC.2 rev</i>		TCTGCGCCGGTCACGCC	

3.8.2. Determinação dos Patotipos de ESCHERICHIA COLI,

Para elaboração e determinação dos patotipos: ETEC, EIEC, EAEC, EPEC, EHEC/STEC foram utilizados os *primers* designados por Schmidt *et al.* (1995) Aranda *et al.* (2007) e a ISO/TS 13136 (2012), descritos na tabela 10. A determinação de EHEC corresponde à presença do gene *eae* e pelo menos um *stx*.

CAPÍTULO III
MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 10: *Primers* utilizados para a determinação dos patótipos

Patotipo	Primer	Sequência (5'–3')	Autor
ETEC	<i>est (ST) fwd</i>	ATTTTMTTCTGTATRTCTT	Aranda <i>et al.</i> (2007)
	<i>est (ST) rev</i>	CACCCGGTACARGCAGGATT	Aranda <i>et al.</i> (2007)
	<i>elt (LT) fwd</i>	GGCGACAGATTATACCGTGC	Aranda <i>et al.</i> (2007)
	<i>elt (LT) rev</i>	CGGTCTCTATATCCCTGTT	Aranda <i>et al.</i> (2007)
EIEC	<i>ipaH fwd</i>	GTTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	Aranda <i>et al.</i> (2007)
	<i>ipaH rev</i>	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	Aranda <i>et al.</i> (2007)
EAEC	<i>aggr fwd</i>	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	Aranda <i>et al.</i> (2007)
	<i>aggr rev</i>	ACAGAATCGTCAGCATCAGC	Aranda <i>et al.</i> (2007)
	<i>cvd432 Fwd</i>	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	Schmidt <i>et al.</i> (1995)
	<i>cvd432 rev</i>	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	Schmidt <i>et al.</i> (1995)
EPEC	<i>bfpA fwd</i>	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	Aranda <i>et al.</i> (2007)
	<i>bfpA rev</i>	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	Aranda <i>et al.</i> (2007)
	<i>eae fwd</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC	ISO 13136(2012)
	<i>eae rev</i>	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	ISO 13136(2012)
STEC	<i>stx1 fwd</i>	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	ISO 13136(2012)
	<i>stx1 rev</i>	AGAACGCCCACTGAGATCATC	ISO 13136(2012)
	<i>stx 2 fwd</i>	CGCACTGTCTGAAACTGCTCC	ISO 13136(2012)
	<i>stx 2 rev</i>	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	ISO 13136(2012)

De acordo com a tabela 11, todas as amplificações dos genes *eae*, *stx1* e *stx2* e *ST* e *LT* foram obtidas por *multiplex* PCR, os restantes foram feitos em *simplex*. Para todos os ensaios a *master mix* utilizada foi a multiplex PCR NZTYtaq 2x *Green Master mix* (NZYTech, Ref: MB335). Na preparação da mistura de PCR, considerou-se o número de amostras a ser validadas, controlo positivo, um controlo negativo e um branco por reação de PCR. Para todos os PCR'S apresentados, o volume total de reação é de 20 µl, com exceção do (*eae* + *stx1* + *stx2*) que corresponde a 25 µl, obtendo os seguintes resultados conforme a figura 9

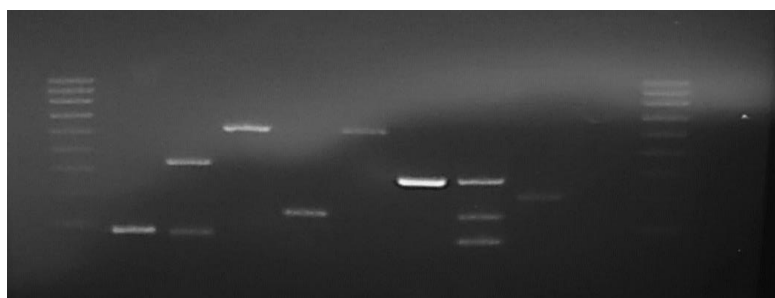


Figura 9: Perfis obtidos em gel de 2% agarose dos produtos de genes de patogenicidade DEC por PCR simplex ou multiplex. Linha 1 e 11– Marcador de Peso Molecular V (1000 bp): Linha 2- *est*; Linha 3- *est* e *elt*; Linha4- *ipaH*; Linha 5- *aggr*; Linha 6 CVD432; Linha 7- *eae*; Linha 8 *stx1*, *stx2* e *eae*; Linha 9- *bpfA*; Linha 10 - controlo negativo

CAPÍTULO III
MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 11: Tabela resumo do produto de PCR para cada par de *primers*, as suas concentrações iniciais, condições de amplificação e o volume por reação

Primers	Produto do PCR (bp)	Concentração do primer	Condições da reação
<i>est (St)</i> <i>elt (LT)</i>	190 450	0,5 µM (ambos)	95 °C - 5 min (95 °C - 30 s; 55 °C - 60s; 72 °C- 14s) x 35 72 °C- 5 min
<i>lpaH</i>	600	0,2 µM	95 °C - 5 min (95 °C - 30 s; 60 °C - 1 min; 72 °C- 18s) x 30 72 °C- 5 min
<i>aggr</i>	254	0,2 µM	95 °C - 5 min (95 °C - 30 s; 60 °C - 1 min; 72 °C- 8s) x 30 72 °C- 5 min
<i>cvd432</i>	630	0,2 µM	95 °C - 5 min (95 °C - 30 s; 55 °C - 1 min; 72 °C- 19s) x 10 (95 °C - 30s; 60 °C - 1 min; 72 °C-19s) X 20 72 °C- 5 min
<i>bfpA</i>	326	0,2 µM	95 °C - 5 min (95 °C - 30 s; 55 °C - 1 min; 72 °C- 10s) x 10 (95 °C - 30s; 60 °C - 1 min; 72 °C-10s) x 20 72 °C- 5 min
<i>eae</i> <i>stx1</i> <i>stx2</i>	384 180 255	0,8 µM 2,4 µM 0,8 µM	95 °C - 5 min (95 °C - 60 s; 65 °C - 120 s; 72 °C- 90s) x 9 95 °C - 60 s; 64 °C - 120 s; 72 °C- 90s ; 95 °C - 60 s; 63 °C - 120 s; 72 °C- 90s ; 95 °C - 62 s; 64 °C - 120 s; 72 °C- 90s ; 95 °C - 60 s; 61 °C - 120 s; 72 °C- 90s ; (95 °C - 60 s; 60 °C - 120 s; 72 °C- 90s) x10 (95 °C - 60 s; 60 °C - 120 s; 72 °C- 150s) x 9 72 °C - 5 min

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

3.8.3. Detecção de genes de resistência para ESBL e AmpC

Procedeu-se à deteção de genes de resistência para ESBL e para AmpC. A deteção de genes foi feita em 2 multiplex's: ESBL (*bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M), tabela 12, e AmpC (*bla*CMY-2, *bla*DHA e *chromosomal* AmpC), tabela 13. Preparou-se a mistura do PCR com com MgCl₂ (1,5 mM), *Taq* buffer (1x), *primers* (0,25 µM), *Taq* (1, 25 U), (NZYTaq II Dna polymerase, ref: MB354) dNTPs (NZYSet, ref: MB08701) (0,25 µM) e H₂O ultrapura. Para a preparação da mistura de PCR, considerou-se o número de isolados a ser estudados, controlos positivos e um controlo negativo (sem DNA) por reação de PCR. Após a preparação do volume de reagente de acordo com o número de amostras, os controlos e o branco, colocou-se 18 µl do volume preparado e 2 µl de DNA. Finalmente, amplificou-se as amostras de acordo com as condições do ciclo de PCR (5 minutos a 95 °C, seguidamente 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C, 40 segundos a 72 °C, durante 30 ciclos, e finalmente, 5 min a 72 °C).

Tabela 12: *Primers* utilizados para a determinação de genes indicadores de β-lactamases de largo espectro (Arlet *et al.*, 2006; Montsein *et al.*, 2007; Dallene *et al.*, 2010)

	Primer	Sequência (5'–3')	Produto de PCR (bp)
ESBL	<i>bla</i> TEM <i>fwd</i>	CATTTCCGTCGCCCTTATTC	800
	<i>bla</i> TEM <i>rev</i>	CGTTCATCCATAGTTGCCGTGAC	
	<i>bla</i> SHV <i>fwd</i>	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713
	<i>bla</i> SHV <i>rev</i>	ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
	<i>bla</i> CTX-M <i>fwd</i>	ATGTGCAGYACCGTAARGTKATGC	593
	<i>bla</i> CTX-M <i>rev</i>	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG	

Tabela 13: *Primers* utilizados para a determinação de genes de resistência AmpC (Kojima *et al.*, 2012; Dallene *et al.*, 2010; Ozer *et al.*, 2012)

	Primer	Sequência (5'–3')	Produto de PCR (bp)
AmpC	<i>bla</i> CMY-2 <i>fwd</i>	ATGATGAAAAAATCGTTATGCT	1145
	<i>bla</i> CMY-2 <i>rev</i>	TTATTGCAGCTTTTCAAGAATGCG	
	<i>bla</i> DHA <i>fwd</i>	TGATGGCACAGCAGGATATTC	997
	<i>bla</i> DHA <i>rev</i>	GCTTTGACTCTTTCGGTATTTCG	
	Chromosomal AmpC <i>fwd</i>	CGGCTCGGTGAGCAAGACCTTC	218
	Chromosomal AmpC <i>rev</i>	AGTCGCGGATCTGTGCCTGGTC	

3.9. Separação por eletroforese dos fragmentos de DNA

Preparou-se um gele de agarose a 2% (nyztech, Ref. MB14402) – UltraPure™ em TAE 1x (TAE 50x: nyztech, Ref: MB20901). contendo 5ul/100ml de GreenSafe Premium (NZYTech, Ref:

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

MB13201). O gel foi carregado com os produtos da reação: aos amplificadores que não contêm *loading dye*, após a amplificação foi adicionado 4 µl de 6x NZYDNA loading dye (NzyTech, ref: MB13101). Carregou-se cada poço correspondente com 8 µl da reação obtida após a amplificação e com 5 µl marcador V (NzyTech, Ref. MB061) e marcador IV para ampC V (NzyTech, Ref. MB089), e finalmente fez-se correr o gel em TAE 1x (TAE 50x: NzyTech, Ref. MB20901) a 90 volts ± 10 volts durante 1 hora e visualizou-se o resultado usando UV ou luz led azul (Syngene® GeneFlash system).

3.10. Sequenciação

Inicialmente, preparou-se a solução de amplificação adicionando-se 25 µl de 2 x master mix HIFI DNA Polymerase (VWR, Ref: 733-2619P), 1 µl de 27 *forward* e 1 µl de 1392 *reverse* (euofins Geomics) (10 µM) especificado na tabela 14, 21 µl de H₂O ultrapura estéril e 2 µl de DNA. Após a preparação da mix de acordo com o número de isolados adicionou-se a cada tubo de PCR 48 µl do reagente preparado e 2 µl de DNA. Finalmente, amplificou-se as amostras de acordo com as condições do ciclo de PCR (5 minutos a 95 °C, seguidamente 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C, 90 segundos a 72 °C, durante 30 ciclos, e finalmente, 5 min a 72 °C).

Tabela 14: *Primers* utilizados para a sequenciação dos isolados L01V17 e L03V12 (Lane, 1991)

Primer	Sequência (5'–3')	Produto de PCR (bp)
27 F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1365
1392 R	ACGGGCGGTGTGTRC	

Seguidamente, após a amplificação, verificou-se os resultados (aparecimento de banda) através da separação dos fragmentos de DNA por eletroforese. Quando a confirmação da presença das mesmas, recorreu-se à purificação do produto amplificado de acordo com as instruções do KIT NZYGelpure (NzyTech, Ref: MB801101) utilizado, e foram enviados para a Eurofins Genomic.

3.11. DISTINÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI*, *SHIGELLA* SPP. E *CITROBACTER FREUNDII*

Para a distinção de isolados de *E. coli*, *Shigella* spp. e *Citrobacter freundii* de acordo com Pavlovic *et al.* (2010), utilizou-se os *primers uidA* e *lacY*. Para a *E. coli* tem de haver a presença dos dois genes. Já para *Shigella* spp e *C. freundii*, apenas há a presença de um dos genes, mais especificamente, *uidA* positivo para *Shigella* spp. e *lacY* positivo para *C. freundii*. Uma vez que o produto de PCR é bastante pequeno provocando inespecificidades, utilizou-se *Sybr Green*,

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

verificando se existia ou não curvas de amplificação. Inicialmente, preparou-se a solução de amplificação adicionando-se 10 µl de Itaq™ Universal SYBr Green Supermix (BioRad, Ref: 1725120) 1 µl de (*uidA* ou *lacY*) *fwd* e 1 µl (*uidA* ou *lacY*) *rev* (*euofins Geomics*) (10 µM) especificado na tabela 15, 4 µl de H₂O ultra-pura estéril e 4 µl de DNA. Amplificou-se os isolados de acordo com as condições do ciclo de PCR (6 minutos a 95 °C, seguidamente 20 segundos a 95 °C, 30 segundos a 58 °C, durante 30 ciclos, e finalmente leitura da placa).

Tabela 15: *Primers* utilizados para a distinção de *Escherichia coli*, *Shigella* spp. e *Citrobacter freundii*

Primer	Alvo	Sequência (5'–3')	Produto de PCR (bp)
<i>uidA fwd</i>	UidA	GTGTGATATCTACCCGCTTCGC	82
<i>uidA rev</i>		AGAACGGTTTGTGGTTAATCAGGA	
<i>EC/pma (1) fwd</i>	LacY	ACCAGACCCAGCACCAGATAAG	101
<i>lacY_t_rev1 rev</i>		CTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGA	

3.12. DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO DE DISCO

O método elaborado foi baseado em parâmetros de CLSI (2020) e EUCAST (2020), e consistiu na verificação da presença ou ausência de uma zona de inibição de crescimento bacteriano à volta do disco que contém antibiótico. Inicialmente, antes da verificação da suscetibilidade antimicrobiana dos isolados em estudo, realizou-se um teste ao meio *Muller Hinton Agar* e aos discos com antibiótico usando uma estirpe de referência de controlo: *E. coli* ATCC 25922, verificando se que os valores dos halos se encontram dentro dos limites de (CLSI e EUCAST).

Para os isolados em estudo, procedeu-se à repicagem dos mesmos para placas de TSA e incubaram-se a 37 ° C durante 20 ± 4 h. Após o crescimento, preparou-se uma suspensão 0,5 *McFarland* no *densimat* (SmartSpec™3000) em solução salina estéril, NaCl a 0, 85%, a partir de colónias isoladas morfológicamente similares. Através de zaragatoa estéril inocularam-se placas de *Muller Hinton Agar* por espalhamento. Deixaram-se secar por entre 3 a 5 min e colocaram-se os discos com os antibióticos à superfície do meio distribuídos de forma a que a distância de centro a centro seja no mínimo 24 mm e do bordo da placa de cada disco 15 mm (4 discos por placa). Após a aplicação dos discos as placas foram invertidas e incubadas a 35 ° C ± 1 °C, durante 18 a 20 h. Ao fim da incubação procedeu-se à leitura das mesmas medindo os halos de inibição com uma régua.

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

Os antimicrobianos selecionados para o trabalho experimental foram os seguintes: ampicilina (10 µg), azitromicina (15 µg), cefotaxima (5 µg), ceftazidima (10 µg), ácido nalidixico (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), meropenem (10 µg), sulfonamidas (300 µg), tetraciclina (30 µg) e trimetoprim (5 µg). A ampicilina, azitromicina, cefotaxima, ceftazidima, cloranfenicol, gentamicina e trimetoprim pertencem à marca *Bio Rad*, os restantes à Oxoid. A escolha de antibióticos foi baseada no relatório *The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018* da EFSA (2020).

3.12.1. SUBPOPULAÇÕES RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS

O aparecimento de colónias nas zonas do halo de inibição pode corresponder a subpopulações resistentes a esse antimicrobiano. Nestas ocasiões, procedeu-se a uma repicagem das mesmas para TSA e incubou-se a 37 ° C durante 20 ± 4 h. De seguida retirou-se uma colónia e colocou-se em BHI com 2 discos do antibiótico onde apareceu essas subpopulações e incubou-se a 37 ° C durante 20 ± 4 h. Finalmente procedeu-se novamente à elaboração do método de difusão em disco.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS

4.1. COMPORTAMENTO FENOTÍPICO

Os resultados obtidos para todas as características fenotípicas para todos os isolados encontram-se em anexo A

4.1.1. Fermentação do sorbitol

Considerando todos os isolados de *E. coli* provenientes de fezes de galinha e bovinos (140 isolados) existentes na coleção de culturas do INIAV, verificou-se que apenas um isolado de bovino (L01V3) e cinco isolados de galinhas (A26, A27, A28, A48 e A51) não apresentaram capacidade de fermentar o sorbitol. Os isolados que não fermentam sorbitol, são incolores e os que fermentam o sorbitol produzem colônias rosas, como é possível verificar na figura 10.

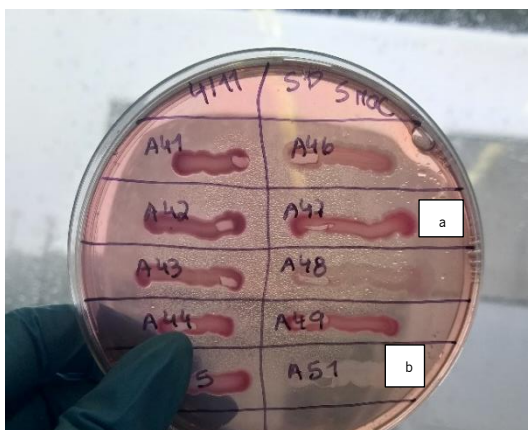


Figura 10: Comportamento dos isolados face à capacidade de fermentar o sorbitol. (a) Estirpe que fermenta o sorbitol (b) Estirpe que não fermenta o sorbitol

4.1.2. Hémolise

Verificou-se que todos os 140 isolados em estudo apresentavam hemólise, β -hemolítica, destacando-se (uma hemólise maior) 7 isolados provenientes de fezes de bovinos da exploração L4 (L04V1, L04V2, L04V3, L04V13, L04V14, L04V15, L04V16), como se pode verificar na figura 11.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

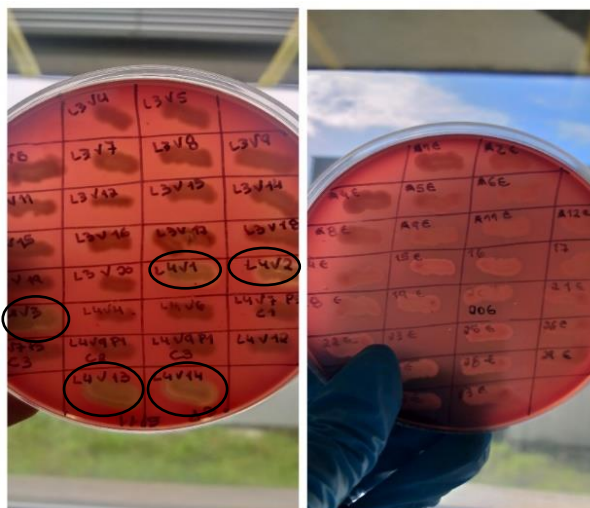


Figura 11: Comportamento dos isolados face à presença de sangue de carneiro no meio: estirpes destacadas com circunferência apresentam uma hemólise maior que as restantes

4.1.3. Indol

Inicialmente na produção de indol a partir do triptofano, resultados positivos apresentam uma cor rosa/ avermelhada, enquanto que resultados negativos não alteram a cor do caldo (figura 12 (a) apenas um isolado de fezes de bovino, L01V17, e um isolado de fezes de galinha, A30, não produziram indol. Após repicar os isolados em meio TBX (colónias que se apresentaram azuis esverdeadas, figura 12 (b) e elaborado o teste do Indol, o isolado A30 deu resultado positivo, contudo o L01V17 voltou a dar negativo.

O isolado de bovino foi colocado inicialmente em meio MAC (sendo positivo para *E. coli* colónias avermelhadas, e testado em BD BBL™ CRYSTAL™, que consiste na degradação dos substratos presentes pelo microrganismo submetido ao teste, resultando na alteração do pH do meio e mudança da coloração dos substratos. O isolado fermentou a lactose figura 12 (c), e o resultado obtido no segundo teste, após a leitura visual e identificação utilizando o software *Crystal Mind*, figura 12 (d) sugeriu a possibilidade da estirpe ser *E. coli* ou *C. freundii*. Para permitir a sua determinação recorreu-se a mais testes bioquímicos utilizando o meio de cultura SIM (resultado para a *E. coli*: mobilidade positiva, Indol positivo e não existir produção de H₂S), Citrato Simmons (resultado para *E. coli*: não apresentar alteração do pH, ou seja, não pode ocorrer mudança de cor para azul) e TSI (resultado para *E. coli*: fermentação da glicose, lactose e glucose e não haver a produção de H₂S). Relativamente ao primeiro mencionado, verificou-se que L01V17 apresentou mobilidade, não produziu H₂S e não metabolizou o triptofano em Indol, figura 12 (e). Para o Citrato *Simmons* o meio manteve a sua cor, figura 12 (f) e finalmente para o TSI, apresentou capacidade

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

para fermentar glicose, lactose, glucose e não houve a produção de H₂S, figura 12 (g). Assim, permitiu afastar a ideia da possibilidade de *C. freundii* uma vez que esta tem de apresentar produção de H₂S e citrato positivo, o que não foi o caso. Contudo, para uma fiabilidade de aprovação deste isolado recorreu-se à sua sequenciação, porém não foi possível obter resultados, devido à má qualidade do DNA. Através do método descrito por Pavlovic *et al.* (2010), este isolado amplificou ambos os genes em estudo (*uidA* e *lacY*) concluindo-se assim que este isolado apesar de ser indol negativo se trata de uma *E. coli*.

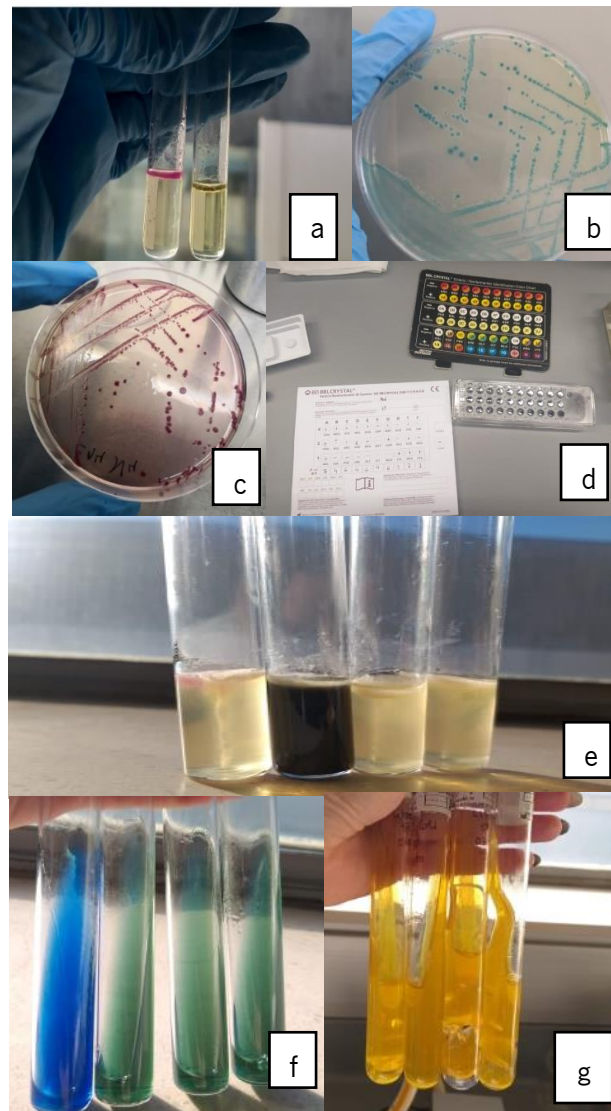


Figura 12: Comportamento dos isolados: (a) controlo positivo e negativo face à presença de indol; (b) colónias tipicamente esverdeadas para *Escherichia coli* em meio TBX; (c) colónias tipicamente avermelhadas para *Escherichia coli* em *MacConkey*; (d) Teste bioquímico BBL *Crystal*; (e) teste em SIM; (f) teste em citrato *Simmons* e (g) teste em TSI

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2. GRUPOS FILOGENÉTICOS

No anexo B contém a informação sobre a presença ou ausência de genes para a caracterização dos filogrupos. Dos 140 isolados provenientes de fezes de galinhas e de bovino estudados verificou-se a predominância em percentagem de cada filogrupos detetado, conforme a figura 15. A maioria dos isolados pertencem ao filogrupos B1 (68%), seguidamente com 23% aparecem os isolados pertencentes ao filogrupos A. Já para grupo D e E, as percentagens foram de 1% e 2%, respetivamente. A percentagem de isolados não associados a nenhum dos filogrupos correspondeu a 6%, pelo que seria necessário recorrer ao MLST., de acordo com a figura 13.

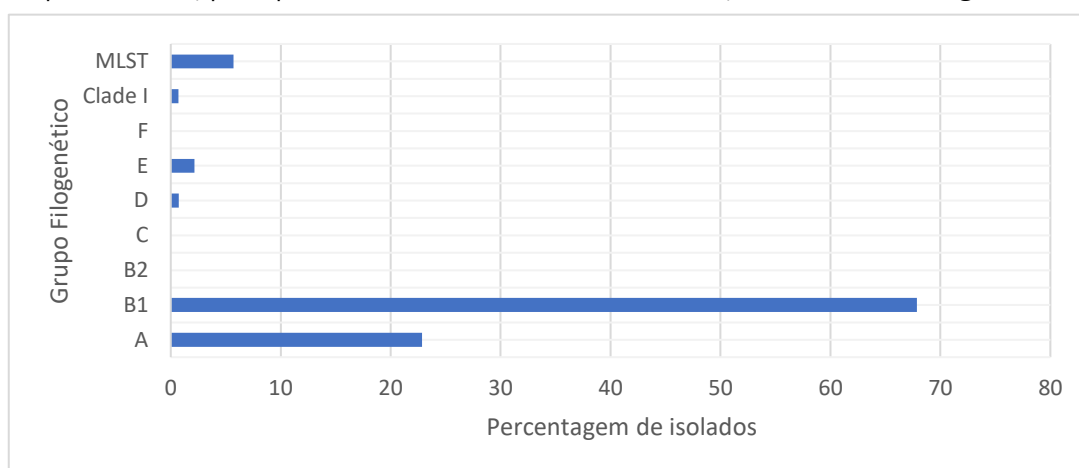


Figura 13: Distribuição dos isolados provenientes de fezes de galinhas e bovinos pelos grupos filogenéticos encontrados e os não associados

Pelos resultados encontrados o isolado L01V13 pertence ao *Clade I*, como se pode ver na figura 14. De acordo com a divisão sugerida por *Clermont et al.*, 2013, no grupo predominantemente DEC e comensais foram incluídos 127 isolados (53 isolados de bovino e 74 isolados de galinhas) e no grupo onde predominam as mais patogénicas de ExPEC encontraram-se 4 isolados (apenas provenientes de fezes de galinhas).

Numa distinção entre isolados provenientes de fezes de galinha e isolados provenientes de fezes de bovino verificou-se que a predominância para ambos os isolados de diferentes origens incide sobre o filogrupos B1, e destacou-se a caracterização de isolados D e E para isolados de fezes de galinha, como se pode verificar na figura 14.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

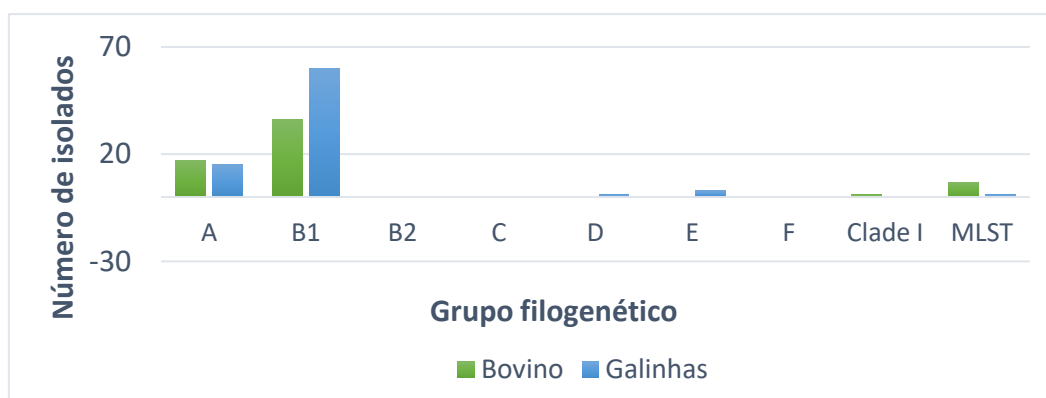


Figura 14: Número de isolados para cada filogrupos para isolados provenientes de fezes de bovino e isolados provenientes de fezes de galinha

4.2.1. ISOLADOS PROVENIENTES DE FEZES DE GALINHA

Dos 79 isolados provenientes de fezes de galinhas, 18 pertencem a Leiria, 1 a Castelo Branco, 30 a Viseu, 6 a NAV Oeste Caldas da Rainha, 1 a Lisboa Vale Tejo (Oeste), 8 a Coimbra, 9 a DAVR/NAV Tomar, 3 a Gouveia, 2 a NAVG centro de Gouveia e 1 a Aveiro. Devido a um número reduzido de isolados provenientes dos diferentes locais mencionados, estes foram agrupados em três províncias Beira Litoral (Aveiro, Coimbra e Leiria), Beira Interior (Gouveia, NAVG centro de Gouveia, Viseu e Castelo Branco), e Ribatejo e Estremadura (Lisboa Vale do Tejo Oeste, DAVR/NAV Tomar e NAV Oeste Caldas da Rainha). Analisando os dados apresentados na figura 15, verificou-se que para a Estremadura e Ribatejo apenas existiam isolados pertencentes ao filogrupos A e B1. Tanto para a Beira Litoral como para a Beira Interior, isolados foram caracterizados no filogrupos E, contudo, só o filogrupos D foi encontrado na Beira Litoral. Todos os isolados, onde não foi possível a obtenção de uma caracterização (recorrer ao MLST) provinham da Beira Litoral.

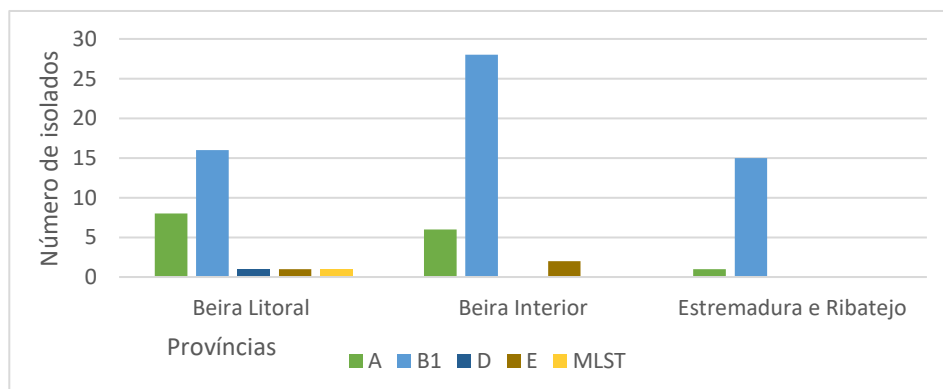


Figura 15: Número de isolados de filogrupos detetados para os isolados de fezes de galinhas conforme o seu local de recolha

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 79 isolados provenientes de fezes de galinhas, 30 isolados são provenientes de fezes de galinhas poedeiras e 49 de isolados de fezes de galinhas reprodutoras. Analisando a figura 16, verificou-se que mais de 80% dos isolados provenientes de fezes de galinhas reprodutoras pertencem ao grupo filogenético B1, enquanto que nos isolados de fezes de galinhas poedeiras apenas 60% são identificados como grupo filogenético B1. Alguns isolados de galinhas poedeiras como isolados de galinhas reprodutoras foram identificados no filogrupos A e E. Também houve isolados que são identificados como pertencentes no filogrupos D, mas apenas para isolados de galinhas poedeiras. Apenas em isolados provenientes de fezes de galinhas poedeiras não foi possível a caracterização de 3% dos isolados num grupo filogenético.

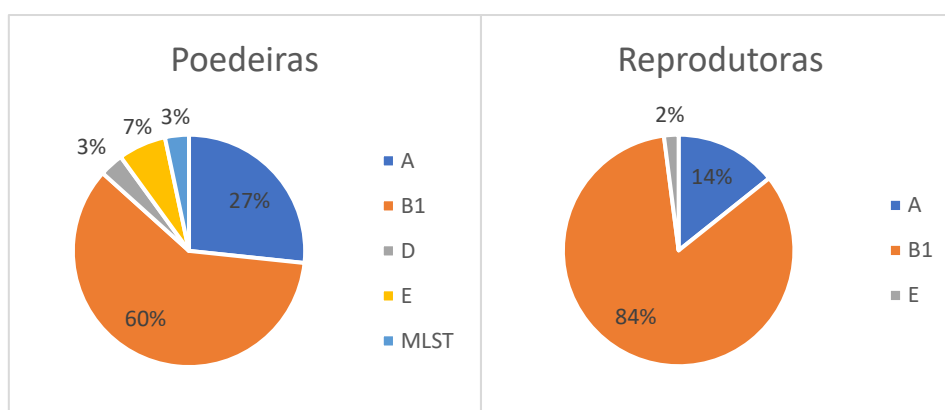


Figura 16: Percentagens de filogrupos detetados em isolados provenientes de fezes de galinha de acordo com o seu tipo

Na tabela 16 são apresentadas as percentagens de isolados face ao número total de isolados de cada filogrupos, verificou-se que quanto à caracterização do filogrupos A, os isolados predominantes são de galinhas poedeiras da Beira Litoral. Quanto ao filogrupos B1, os isolados com maior destaque foi nas galinhas de reprodução da Beira Interior. Quanto ao grupo D e a falta de caracterização de filogrupos, incidiram sobre isolados de galinhas poedeiras da Beira Litoral e finalmente, quanto ao filogrupos E, foi encontrado nas fezes de galinhas poedeiras da Beira Litoral e nas fezes de galinha de reprodução e poedeiras na Beira Interior.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 16: Percentagens/número de isolados provenientes de fezes de galinha de acordo com o seu local de recolha e o tipo de bando, em relação ao total de isolados encontrados em cada grupo filogenético

	A (%/nº)	B1 (%/nº)	D (%/nº)	E (%/nº)	MLST (%/nº)	TIPO
Beira Litoral	40,0 (6)	13,6 (8)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	Reprodução
	13,3 (2)	13,6 (8)	100,0 (1)	33,3 (1)	100,0 (1)	Poedeiras
Beira Interior	6,7 (1)	30,5 (18)	0,0 (0)	33,3 (1)	0,0 (0)	Reprodução
	33,3 (5)	16,9 (10)	0,0 (0)	33,3 (1)	0,0 (0)	Poedeiras
Estremadura e Ribatejo	0,0 (0)	25,4 (15)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	Reprodução
	6,7 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	Poedeiras

Como foi inicialmente mencionado, os isolados obtidos para este estudo resultaram de um estudo anterior de 61 amostras de fezes de galinhas em que se obteve isolados que conferiam resistência à ampicilina (37 isolados) e à enrofloxacina (42 isolados). Dessas 61 amostras, apenas em 26 se obtiveram isolados resistentes à ampicilina e à enrofloxacina e uma comparação do grupo filogenético. Não foi possível a inserção de Aveiro, Gouveia, NAVG, Castelo Branco, e Lisboa nas zonas selecionadas para o estudo, uma vez que não existia isolados com o mesmo número de amostra a partir da seleção feita inicialmente num estudo anterior. Das 26 amostras onde era possível uma comparação verificou-se que 12 amostras apresentavam isolados que não pertenciam ao mesmo grupo filogenético, como se pode verificar na tabela 17. Também foi possível aferir que na Beira Litoral para a amostra 1 e 12, assim como para a Beira interior a amostra 5 apresentavam diferenças nos grupos caracterizados por *Clermont et al.*, 2013.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 17: Resultados dos grupos filogenéticos dos isolados de *Escherichia coli* entre detetados com o mesmo número de amostra de acordo com o local e a tipo de bando

Província	Local	Amostra	Galinha	Ampicilina	Enrofloxacina	
Beira Litoral	Leiria	1	Poedeira	A	D	
	Leiria	12	Poedeira	B1	E	
	Leiria	19	Reprodutora	B1	B1	
	Leiria	20	Reprodutora	A	B1	
	Leiria	21	Reprodutora	A	B1	
	Leiria	29	Poedeira	B1	B1	
	Leiria	39	Poedeira	B1	B1	
	Coimbra	25	Reprodutora	A	B1	
	Coimbra	26	Reprodutora	A	B1	
	Coimbra	27	Reprodutora	A	B1	
	Coimbra	28	Reprodutora	A	B1	
	Beira Interior	Viseu	4	Poedeira	A	B1
		Viseu	5	Reprodutora	E	B1
		Viseu	8	Poedeira	B1	B1
Viseu		23	Poedeira	A	B1	
Viseu		41	Reprodutora	B1	B1	
Viseu		42	Reprodutora	B1	B1	
Viseu		43	Reprodutora	B1	B1	
Viseu		44	Reprodutora	B1	B1	
Viseu		46	Reprodutora	B1	B1	
Viseu		47	Reprodutora	B1	B1	
Viseu		51	Reprodutora	A	B1	
Estremadura e Ribatejo	NAV	15	Reprodutora	B1	B1	
	DAVR	33	Reprodutora	B1	B1	
	DAVR	34	Reprodutora	B1	B1	
	DAVR	37	Reprodutora	B1	B1	

De acordo com o local verificou-se que para Estremadura e Ribatejo as amostras onde é possível uma comparação, apenas pertencem a isolados de fezes de galinhas poedeiras e ambos os isolados da mesma amostra correspondem ao mesmo filogruppo. Para os isolados de fezes de galinhas reprodutoras encontrou-se predominantemente diferenças entre a sua caracterização na Beira Litoral e para as Poedeiras na Beira Interior. Na tabela 18 é possível verificar de modo mais sucinto os resultados conforme a incidência: local e o tipo de bando.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 18: Percentagem/ número de amostras que apresentam ou não o mesmo grupo filogenético de acordo com o local e o tipo de bando

Resultados	Beira Litoral (%/nº)	Beira Interior (%/nº)	Estremadura e Ribatejo (%/nº)	Tipo
Igual	9,1 (1)	54,5 (6)	100,0 (4)	Reprodução
	18,2 (2)	9,1 (1)	0,0 (0)	Poedeiras
Diferente	54,5 (6)	9,1 (1)	0,0 (0)	Reprodução
	18,2 (2)	27,3 (3)	0,0 (0)	Poedeiras

4.2.2. ISOLADOS PROVENIENTES DE FEZES DE BOVINO

Dos 61 isolados provenientes de fezes de bovino, conforme o local de recolha (42 isolados de Barcelos e 19 isolados de Ponte de Lima), verificou-se que para Barcelos a predominância do filogrupos encontrado foi B1, e para Ponte de Lima foi o grupo A. Também se verificou o aparecimento de um *Clade I* na zona de Ponte de Lima, e isolados para os quais não foi possível classificar o filogrupos, sendo necessário recorrer ao MLST, como se pode ver na figura 17.

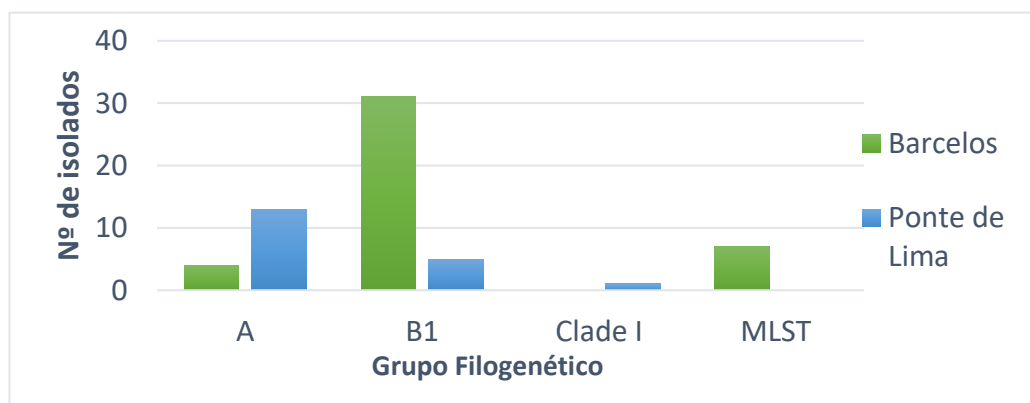


Figura 17: Grupos filogenéticos encontrados nos isolados provenientes de fezes de bovino conforme o seu local de recolha

O isolado que na deteção de um grupo filogenético (L03V12) foi classificado como *clade I*, foi sujeito a testes bioquímicos, nomeadamente ao teste BD BBL™ CRYSTAL™ e foi posteriormente enviado para sequenciar. Para o primeiro mencionado, o isolado foi caracterizado como sendo *E. coli*. Contudo, na literatura é referido que os clades encontrados são impossíveis de distinguir de *E. coli* através de testes bioquímicos. Relativamente aos resultados da sequenciação, conclui-se que este isolado poderia ser caracterizado como *E. coli* ou como *Shigella* spp. Através do método descrito por Pavlovic *et al.* (2010), este isolado amplificou ambos os genes em estudo (*uidA* e *lacY*) concluindo-se assim que este isolado se trata de uma *E. coli*.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a exploração de bovinos em estudo, L1 com 14 isolados, L2 com 11 isolados, L3 com 19 isolados e L4 com 17 isolados, inicialmente verificou-se que para L1 e L4 o filogrupos encontrado foi o B1, apresentando também uma percentagem de 7% e 18% de isolados para os quais não foi possível agrupar um filogrupos, sendo, portanto, necessário recorrer ao MLST. Para a exploração L2 e L3 não só foi detetado o filogrupos B1, bem como o A. Em L2, os isolados são maioritariamente pertencentes ao filogrupos B1 e correspondem a percentagens encontradas para o grupo filogenético A. Já para L3, a predominância de deteção é B1. Relativamente às explorações que pertencem a Barcelos (L1, L2 e L4) foram encontrados resultados semelhantes em L1 e L4, como se pode verificar na figura 18.

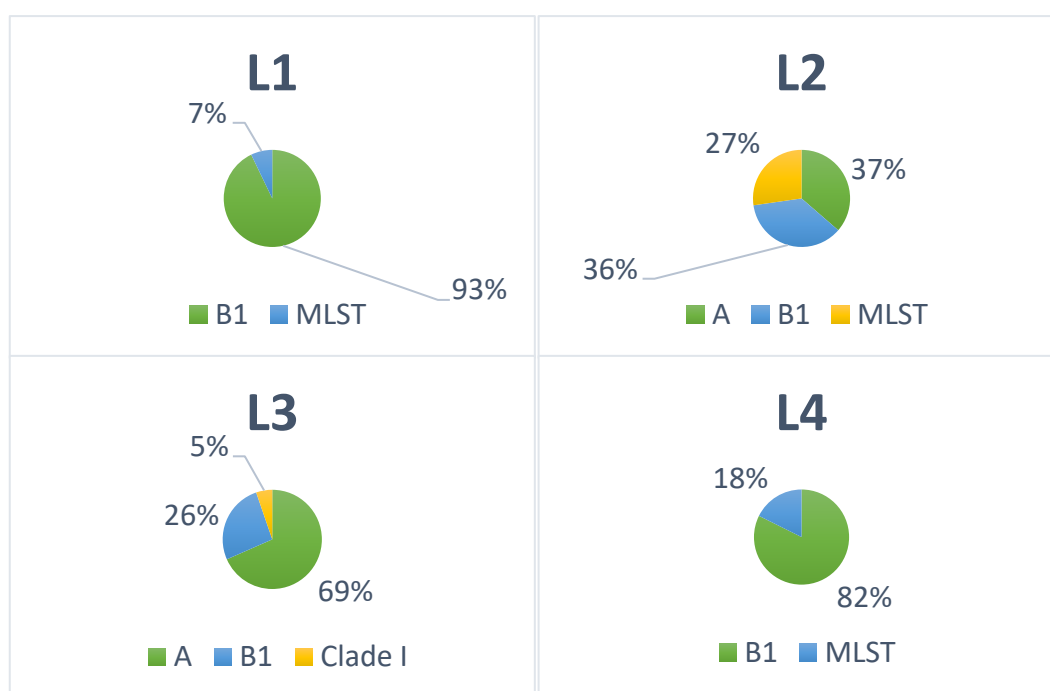


Figura 18: Percentagem dos grupos filogenéticos encontrados e os não associados nos isolados provenientes de fezes de bovino nas diferentes explorações estudadas (L1, L2, L3 e L4)

Finalmente, comparando os isolados de bovinos em vacas de lactação (L1, L3, L4) e as novilhas (L2), verificou-se que nas novilhas as percentagens entre o filogrupos A e B1 são semelhantes, e nas vacas de lactação a diferença percentual entre os dois filogrupos é evidenciada, como pode ser observado na figura 19

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

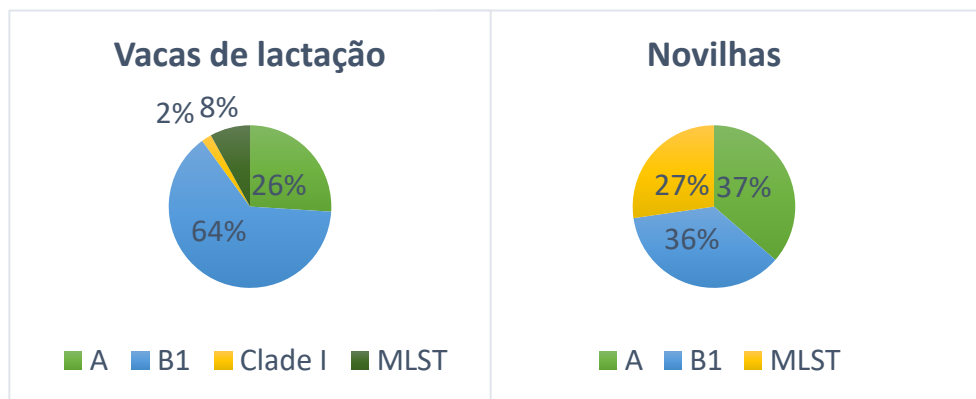


Figura 19: Grupos filogenéticos encontrados nos isolados provenientes de fezes de vacas de lactação e novilhas

Em suma, de acordo com todos os resultados evidenciados à cerca de isolados provenientes de fezes de bovino conclui-se que o filogrupo predominante para região de Barcelos é o B1, e para Ponte de Lima é o A. De acordo com o tipo de exploração na zona de Barcelos, apenas a L2, apresentou mais do que um grupo filogenético (A e B1) tal como para Ponte de Lima (L3). Quando se verificou os filogrupo numa divisão de isolados de vacas de lactação *vs* isolados de novilhas, para os isolados de vacas de lactação: L1, L4, e L3 o predominante foi B1, e para os isolados de novilhas: L2 o grupo predominante foi A. Contudo, para os isolados de novilhas a diferença entre filogrupo A e B1 foi de 1%, e para os isolados de vacas de lactação foi de 38%. Se apenas nos focarmos nas explorações de Barcelos (L1, L2 e L4) na diferenciação entre isolados de vacas de lactação e isolados de novilhas verificou-se que a diferença percentual entre o filogrupo A e B1 para isolados de vacas de lactação é de 52%.

4.2.3. ESTUDOS SEMELHANTES

Um estudo elaborado por Tomazi *et al.* (2018) baseou-se na determinação de grupos filogenéticos de 100 isolados *E. coli* provenientes de leite de vacas de lactação. Das 19 explorações onde decorreu o estudo o grupo filogenético A (52%) foi o que se apresentou com maior predominância entre os sete filogrupos estudados (em 15 das 19 explorações). Contudo, o grupo filogenético B1 também apresentou uma incidência alta com 38%. Em menores percentagens e num número reduzido de explorações, encontrou-se o filogrupo B2 (2%), C (4%), D (3%) e finalmente o E (1%).

Carlos *et al.* (2010) determinaram os quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D) de isolados de *E. coli* (241 isolados) de diferentes origens (humanos (94 isolados), bovinos (50 isolados),

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

galinhas (13 isolados), porcos (39 isolados), ovelhas (29 isolados) e cabras (16 isolados) e a sua aplicação na identificação da principal fonte de contaminação fecal. Verificaram que a nível geral a predominância incide sobre o grupo filogenético A (37,4%), de seguida filogrupo B1 (33,6%). Com menor percentagem detetou-se o filogrupo D com 22,8% e filogrupo B2 com 6,2%. Incidindo em cada origem dos isolados de acordo com estudo elaborado, estes investigadores detetaram que para os isolados de bovino o filogrupo com maior número de isolados (29) com 58% foi o filogrupo B1. Não foram detetados isolados para o filogrupo B2, e para o filogrupo A (14 isolados) foi de 14% e filogrupo D com 7% (7 isolados). Já para os isolados de galinhas o grupo filogenético predominante foi o A com 76,9% (10 isolados) e o filogrupo B1 (2 isolados) e B2 (1 isolado) apenas com 15,4% e 7,7%, respetivamente.

De acordo com Coura *et al.* (2016) onde estudaram grupos filogenéticos de estirpes de *E. coli* obtidos de fezes de borrego com e sem diarreia (336 isolados), verificaram que a predominância incidia sobre o filogrupo B1 com 228 isolados (67,85%). Para o filogrupo A encontraram 21 isolados (6,25%), para B2 2 isolados (0,6%), 5 isolados para filogrupo C (1,49%), 57 isolados para filogrupo E (16,96%) e 2 isolados para filogrupo F (0,9%). O filogrupo D não foi encontrado e para 20 isolados (5,95%) não foi possível a identificação do filogrupo (recorrer ao MLST).

Um estudo elaborado por Escobar-Páramo *et al.* (2006) onde pretendiam identificar as forças que moldam a estrutura ecológica intraespécie de *E. coli* a partir da classificação dos grupos filogenéticos (A, B1, D e B2) de uma coleção de 1898 isolados comensais originários de 387 animais (mamíferos e aves) amostrados nas décadas de 1980 e 2000 e comparar com isolados humanos verificaram que a diferença percentual entre o filogrupo A (34,1%) e B1 (33,1%) era ligeira, sendo os grupos mais predominantes. Para B2 foram classificados 12,4% dos isolados e para D correspondeu a 20,4%. Verificaram também que entre mamíferos, pássaros e humanos os grupos predominantes não eram iguais, sendo que para mamíferos é o A e B1, pássaros é o A e B2, e finalmente, para humanos é o B1 e D. Para os mamíferos concluíram que entre 1980 e 2000 o número de isolados caracterizados em B2 e D subiu de 10,3% para 21,4%, e ocorreu um decaimento no filogrupo A de 53,8% para 28,6%. Finalmente conclui-se que isolados de animais selvagens apresentam-se classificados mais nos grupos filogenéticos B2 e D. Assim a microbiota de *E. coli* de animais de fazenda é caracterizada, em comparação com animais selvagens, por uma maior proporção de estirpes A e B1 e uma proporção menor de estirpes B2 e D. Foi relatado também que as estirpes do grupo B2 (Johnson *et al.*, 2001; Skurnik *et al.*, 2005) são menos

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

propensas a serem resistentes a antibióticos do que estirpes não B2. Esta ligação entre a filogenia e a resistência a antibióticos poderia explicar que em animais de fazenda submetidos a uma pressão antibiótica mais alta do que em animais selvagens, as estirpes A e B1 são selecionadas e as estirpes B2 contra-selecionadas.

De acordo com os estudos mencionados, verificou-se que de forma geral os grupos filogenéticos predominantes são A e B1 tal como neste estudo. Contudo, contrariamente a este estudo a predominância do filogrupo E é detetado em menor percentagem que o filogrupo D. Tal como Carlos *et al.* (2010) a predominância de isolados de bovinos incidem maioritariamente sobre B1, mas isolados de galinhas incide sobre filogrupo A, o que não acontece neste estudo. Coura *et al.* (2016) mostra que para as novilhas o grupo predominante é B1 existindo grande diferença percentual entre A e B1, contudo para os isolados de novilhas deste estudo não se pode afirmar um grupo predominante apenas, estando em grande destaque 2 filogrupos (A e B1). Finalmente, em similaridade com os resultados obtidos com Escobar-Páramo *et al.* (2006) verificou-se que existem forças que moldam a sua estrutura ecológica da *E. coli* desde o local dos isolados, o tipo, a sua estrutura, o que leva a existir diferenças na diversidade dos isolados estudados.

4.3. PATOTIPOS

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que os isolados não pertenciam a nenhum patotipo DEC estudado. Uma vez que os isolados provieram de fezes de animais saudáveis, estes resultados já seriam esperados. É importante salientar que os isolados provenientes de fezes de bovino caracterizados como STEC/EHEC não foram incluídos neste estudo. Comumente isolados de fezes, na maioria das vezes são comensais, não causando doença em seus hospedeiros. Entretanto, em animais debilitados, imunocomprometidos ou com a barreira gastrointestinal alterada estirpes de *E. coli* não patogênicas presentes no intestino podem causar infeção (Nataro e Kaper 1998).

4.4. ANTIBIOGRAMAS

Dos antimicrobianos selecionados para o trabalho experimental os *breakpoints* para ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, meropenem e trimetoprim foram enquadrados no perfil de suscetibilidade de acordo com os parâmetros da EUCAST (2020) e CLSI (2020). A cefotaxima e a ceftazidima apenas para EUCAST (2020) uma vez que as concentrações

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

dos discos usadas pela CLSI (para ambos de 30 µg) são diferentes em relação à EUCAST (cefotaxima de 5 µg e ceftazidima de 10 µg). Para o ácido nalidíxico, as sulfonamidas e a tetraciclina apenas para CLSI (2020), uma vez que a EUCAST não apresenta valores de *breakpoints*. Finalmente, a Azitromicina é baseada em Gomes *et al.* (2019), uma vez para a CLSI os *breakpoints* estabelecidos são apenas para *Salmonella enterica*. É importante destacar que para a CLSI o perfil de suscetibilidade apresenta intervalos de interrupção definidos em três categorias (suscetível, intermédio e resistente), enquanto que na EUCAST há antimicrobianos tais como a ampicilina, cloranfenicol, trimetropim e gentamicina, onde não existe a categoria I.

Para os antimicrobianos onde é possível uma comparação entre os *breakpoints* estabelecidos pela EUCAST e pela CLSI, para a análise dos isolados na sua globalidade (140 isolados) apenas verificou-se diferenças percentuais para a ciprofloxacina, cloranfenicol e gentamicina, podendo ser observados os halos de inibição no anexo C.

Cusack *et al.* (2019) basearam o seu estudo na comparação da interpretação da suscetibilidade entre EUCAST e CLSI, e, regra geral, verificaram discrepâncias significativas devido a uma redução nas taxas de suscetibilidade e/ou aumento nas taxas de resistência ao aplicar os *breakpoints* da EUCAST. Contudo, com uma mínima probabilidade, o contrário também acontece, ou seja, pela CLSI, pode-se encontrar taxas percentuais de suscetibilidade mais reduzidas que na EUCAST. Através da tabela 19, verificou-se, que para a ciprofloxacina, as taxas percentuais de suscetibilidade são mais reduzidas quando se aplica os critérios de interpretação de CLSI. Já para o cloranfenicol e a gentamicina, estes antimicrobianos seguem a regra geral, destacando a gentamicina com uma percentagem de resistentes pela EUCAST de 31,4 % e pela CLSI de 3,6%.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 19: Percentagem de suscetibilidade e exibição de resistência para os isolados provenientes de fezes de galinhas e de bovinos.

	S (%/ nº)	I (%/ nº)	R (%/ nº)	
Ampicilina (AMP)	46,4 (65)	0,0 (0)	53,6 (75)	
Azitromicina (AZM)	97,1 (136)	0,0 (0)	2,9 (4)	
Cefotaxima (COX)	99,6 (139)	0,0 (0)	0,7 (1)	
Ceftazidima (CZD)	98,6 (134)	0,0 (0)	1,4 (2)	
Ácido nalidíxico (NA)	60,0 (84)	1,4 (2)	38,6 (54)	
Ciprofloxacina (CIP)	EUCAST	65,7 (92)	0,0 (0)	34,4 (48)
	CLSI	61,4 (86)	4,4 (6)	34,4 (48)
Cloranfenicol (CHL)	EUCAST	91,4 (128)	0,0 (0)	8,6 (12)
	CLSI	91,4 (128)	2,1 (3)	6,4 (9)
Gentamicina (GMN)	EUCAST	68,6 (96)	0,0 (0)	31,4 (44)
	CLSI	86,4 (121)	10,0 (14)	3,6 (5)
Meropenem (MEM)	100,0 (140)	0,0 (0)	0,0 (0)	
Sulfonamidas (S)	63,6 (89)	2,9 (4)	33,6 (47)	
Tetraciclina (TE)	53,6 (75)	2,1 (3)	44,3 (62)	
Trimetoprim (TRM)	77,9 (109)	0,0 (0)	22,1 (31)	

É possível concluir também que na globalidade, os antibióticos ampicilina (53,6%) e a tetraciclina (44,3%) foram aqueles para os quais um maior número de isolados de *E. coli* exibiram resistência. Opostamente para a azitromicina, cefotaxima, ceftazidima, cloranfenicol e meropenem com uma percentagem de suscetibilidade acima dos 90%, destacando-se o meropenem com 100%, sendo expectável este resultado uma vez que o meropenem é de uso exclusivo em humanos. Para os restantes antimicrobianos os isolados, apresentaram uma taxa de suscetibilidade entre os 60% e os 70%, com exceção do trimetoprim com 77,9%.

De acordo com a tabela 20, os isolados que se destacaram com uma exibição de resistência com mais de 50% foi para os seguintes antimicrobianos: ampicilina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina e a tetraciclina, para os isolados provenientes de fezes de galinha. Contrariamente, verificou-se que esses isolados são 100% suscetíveis apenas para o meropenem, como era esperado. Para as sulfonamidas os isolados apresentaram uma percentagem na categoria de suscetibilidade próxima de 50%. Já para os isolados provenientes de fezes de bovinos, onde não houve uma pré-seleção através de meio de isolamento contendo antimicrobianos, as percentagens de resistências associadas aos antimicrobianos em estudo foram bastante mais baixas, nunca ultrapassando os 18%, com exceção da gentamicina quando é interpretada pelos *breakpoints* da EUCAST com uma resistência de 67,2%. Verificou-se também que contrariamente aos isolados de

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

fezes de galinha, para a cefotaxima e ceftazidima, houve isolados que para um, ou ambos os antimicrobianos, apresentaram resistência, sendo antimicrobianos associados às ESBL's.

Tabela 20: Percentagem de isolados suscetíveis aos diferentes antimicrobianos em estudo de acordo com o tipo de animal: isolados provenientes de fezes de galinhas *vs* isolados provenientes de fezes de bovino

ANTIBIÓTICO	Galinhas			Bovinos			
	S (%/nº)	I (%/nº)	R (%/nº)	S (%/nº)	I (%/nº)	R (%/nº)	
Ampicilina (AMP)	19,0 (15)	0,0 (0)	81,0 (64)	82,0 (50)	0,0 (0)	18,0 (11)	
Azitromicina (AZM)	96,2 (76)	0,0 (0)	3,8 (3)	98,4 (60)	0,0 (0)	1,6 (1)	
Cefotaxima (COX)	100,0 (79)	0,0 (0)	0,0 (0)	98,4 (60)	0,0 (0)	1,6 (1)	
Ceftazidima (CZD)	96,2 (76)	3,8 (3)	0,0 (0)	95,1 (58)	1,6 (1)	3,3 (2)	
Ácido nalidíxico (NA)	34,2 (27)	0,0 (0)	65,8 (52)	93,4 (57)	3,3 (2)	3,3 (2)	
Ciprofloxacina (CIP)	EUCAST	40,5 (32)	0,0 (0)	59,5 (47)	98,4 (60)	0,0 (0)	1,6 (1)
	CLSI	32,9 (26)	7,6 (6)	59,5 (47)			
Cloranfenicol (CHL)	EUCAST	88,6 (32)	0,0 (0)	11,4 (9)	95,1 (58)	0,0 (0)	4,9 (3)
	CLSI	88,6 (32)	3,8 (3)	7,6 (6)			
Gentamicina (GMN)	EUCAST	96,2 (76)	0,0 (0)	3,8 (3)	32,8 (20)	0,0 (0)	67,2 (41)
	CLSI				72,1 (44)		
Meropenem (MEM)	100,0 (79)	0,0 (0)	0,0 (0)	100,0 (61)	0,0 (0)	0,0 (0)	
Sulfonamidas (S)	64,4 (43)	0,0 (0)	45,6 (36)	75,4 (46)	6,6 (4)	18,0 (11)	
Tetraciclina (TE)	25,3 (20)	3,8 (3)	70,9 (56)	90,2 (55)	0,0 (0)	9,8 (6)	
Trimetoprim (TRM)	68,4 (54)	0,0 (0)	31,6 (25)	90,2 (55)	0,0 (0)	9,8 (6)	

4.4.1. ISOLADOS PROVENIENTES DE FEZES DE GALINHA

Os 79 isolados provenientes de fezes de galinha das diferentes localidades foram agrupados em três províncias. De acordo com a figura 20, verificou-se que tanto para os isolados provenientes da Beira Litoral, como para os isolados da Beira Interior, 100% de suscetibilidade apenas para a cefotaxima e o meropenem. Já para os isolados de Estremadura e Ribatejo, apresentou 100% de suscetibilidade para os antimicrobianos referidos anteriormente, assim como para a azitromicina e gentamicina. Na generalidade para as três províncias para a azitromicina, a ceftazidima e a gentamicina as taxas percentuais de suscetibilidade encontram-se acima dos 90%. Destacou-se também que apesar dos isolados não terem dado 100% de suscetibilidade, a ceftazidima nas três províncias, não houve caracterização de isolados resistentes, mas apenas na categoria de Intermédio. O mesmo aconteceu para os isolados da Beira Litoral para o cloranfenicol analisado pela CLSI

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conclui-se que para a Beira Litoral os antimicrobianos que se destacaram em relação às outras duas províncias estudadas foram a ampicilina e o trimetoprim, para a Beira Interior foram a azitromicina e a gentamicina, e finalmente para a Estremadura e Ribatejo foram a ceftazidima, o ácido nalidíxico, a ciprofloxacina, o cloranfenicol as sulfonamidas e finalmente a tetraciclina

Verificou-se também, que para a Estremadura e Ribatejo, não houve a presença de isolados com exibição de resistência na categoria I e R, para a azitromicina e a gentamicina, contrariamente às províncias da Beira.

Para a ampicilina, ácido nalidíxico e ciprofloxacina mais de 50% dos isolados de todas as zonas exibiram resistência. Também, acima dessa percentagem, os isolados provenientes da Beira Interior, da Estremadura e do Ribatejo exibiram resistência para a tetraciclina. A azitromicina, a gentamicina e a ceftazidima foram os antimicrobianos para os quais ocorreu uma menor percentagem de isolados resistentes. Em comparação entre a Beira Litoral e a Beira Interior, verificou-se que a ampicilina (+ 12%), a ceftazidima (+ 0,9%), as sulfonamidas (+ 2,8%) e o trimetoprim (+ 6,5%) foram os antimicrobianos que obtiveram maior percentagem de resistência para a Beira Litoral. Para a azitromicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina os isolados apresentaram maior percentagem de resistência foi os da Beira Interior.

Finalmente é importante ressaltar que, caso não fosse dada importância à categoria I, para a ceftazidima, sendo um antimicrobiano importante para a deteção de ESBL's, os isolados não apresentariam resistência e seriam descartados da possibilidade de serem de risco elevado (Beira Litoral isolado A29; Beira Interior isolado A5 e, finalmente Estremadura e Ribatejo isolado A15).

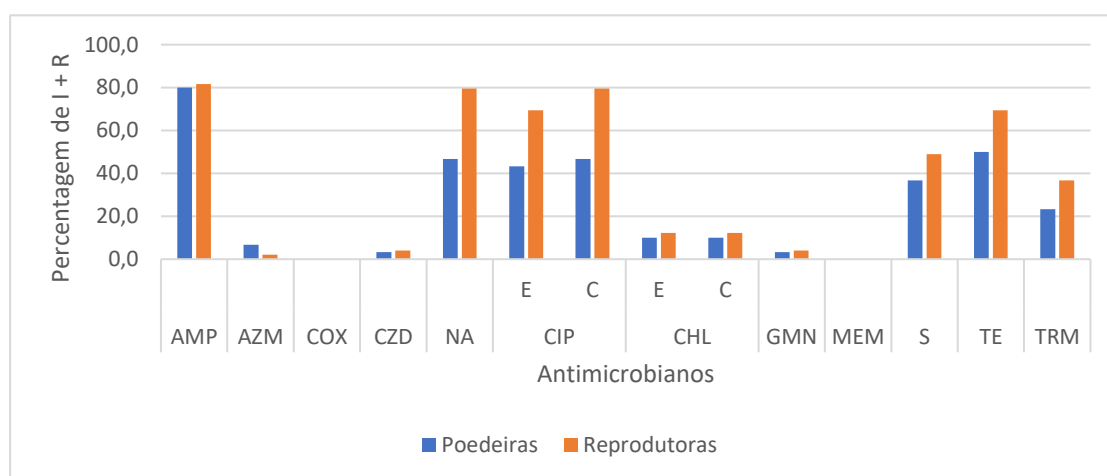


Figura 20: Percentagem de exibição de resistência (categoria Intermédio + Resistente) face aos antimicrobianos em estudo, para os isolados provenientes de fezes de galinha de acordo com o seu tipo

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 79 isolados provenientes de fezes de galinhas derivam de duas funções diferentes: poedeiras e reprodutoras. Verificou-se que os isolados de fezes de galinhas reprodutoras como poedeiras, não apresentaram resistência (categoria R) para a cefotaxima, ceftazidima e meropenem. Contudo, para os isolados de galinhas poedeiras (isolado E29) como reprodutoras (isolados A5 e A15), manifestaram resistência intermédia (categoria I) para a ceftazidima.

Numa abordagem onde se engloba a categoria I mais a categoria R, de acordo com a figura 21, verificou-se que há um aumento percentual para os seguintes antimicrobianos: ceftazidima, ciprofloxacina (CLSI), cloranfenicol (CLSI) e sulfonamidas para os isolados de galinhas poedeiras e ceftazidima, ácido nalidíxico, ciprofloxacina (CLSI) e cloranfenicol (CLSI) para os isolados de galinhas reprodutoras. Destes antimicrobianos, destacou-se a ciprofloxacina (CLSI) para as galinhas reprodutoras, com uma adição percentual de 10,2% para exibição de resistência. Tal como anteriormente, na análise em províncias, verificou-se que, se não se englobasse a categoria I como uma categoria de risco, os isolados que se caracterizaram como intermédios à ceftazidima não iriam ter ênfase neste estudo (0% para a categoria R). Conclui-se também que apesar de os isolados provenientes de fezes de galinhas reprodutoras apresentam maior exibição de resistência aos diferentes antimicrobianos, o destaque incidu sobre o ácido nalidíxico com uma diferença percentual de 32,9% em comparação com os isolados de galinhas poedeiras. Acima dos 20% o destaque incide sobre a ciprofloxacina e acima dos 10% a tetraciclina, as sulfonamidas e o trimetoprim.

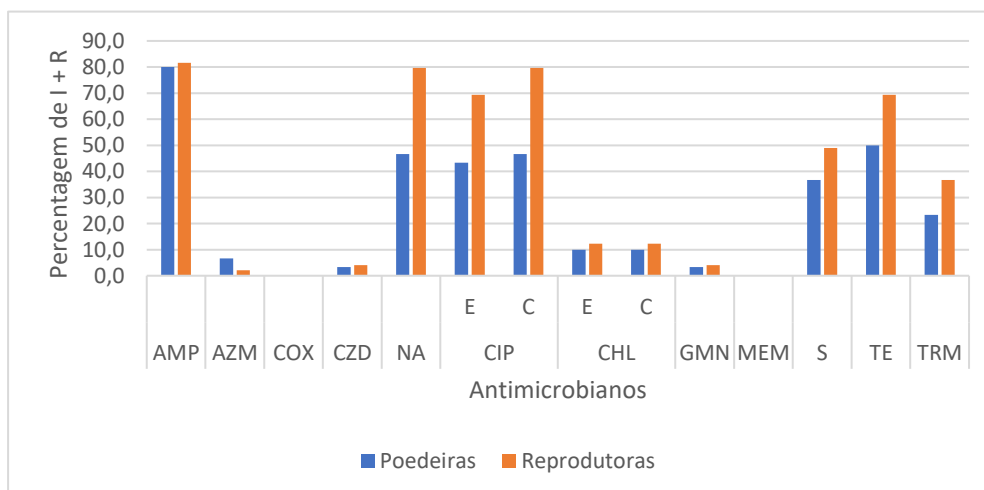


Figura 21: Percentagem de exibição de resistência (categoria Intermédio + Resistente) face aos antimicrobianos em estudo, para os isolados provenientes de fezes de galinha de acordo o seu tipo

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em suma, através da tabela 21, onde é apresentada as percentagens de isolados que exibem resistência aos diferentes antimicrobianos (categoria I + R), face ao número total de isolados que exibem resistência a cada antibiótico, verificou-se que para a ampicilina, ácido nalidixico, ciprofloxacina (CLSI), gentamicina, sulfonamidas e tetraciclina, o destaque foi em isolados de reprodutoras da Beira Interior. Para a ciprofloxacina (EUCAST) e cloranfenicol a exibição de resistência centra-se em isolados de galinhas reprodutoras da Estremadura e Ribatejo. A azitromicina exhibe as mesmas percentagens para isolados de reprodutoras para a Beira Litoral e isolados de reprodutoras e poedeiras para a Beira Interior. A ceftazidima, segue a mesma linha de exibição de resistência como para a azitromicina, mas para isolados de poedeiras da Beira Litoral e isolados de reprodutoras para a Beira Interior e Estremadura e Ribatejo. Finalmente para o trimetoprim, com destaque (a mesma percentagem) estão os isolados de reprodutoras da Beira Litoral e Beira Interior. Tanto para a cefotaxima, como para o meropenem, nenhum isolado exibiu resistência.

Tabela 21: Percentagens de isolados provenientes de fezes de galinha de acordo com o seu local e tipo, que exibem resistência (categoria Intermédio + Resistente) face aos antimicrobianos em estudo

Províncias	Beira Litoral (%/nº)		Beira Interior (%/nº)		Estremadura e Ribatejo (%/nº)	
	Reprodutoras	Poedeiras	Reprodutoras	Poedeiras	Reprodutoras	Poedeiras
Ampicilina (AMP)	0,0 (0)	22,0 (11)	34,0 (17)	24,0 (12)	18,0 (9)	2,0 (1)
Azitromicina (AZM)	0,0 (0)	33,3 (1)	33,3 (1)	33,3 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)
Cefotaxima (COX)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Ceftazidima (CZD)	0,0 (0)	33,3 (1)	33,3 (1)	0,0 (0)	33,3 (1)	0,0 (0)
Ácido nalidixico (NA)	20,8 (11)	11,3 (6)	28,3 (15)	15,1 (8)	24,5 (13)	0,0 (0)
Ciprofloxacina (CIP) (EUCAST)	16,3 (8)	12,2 (6)	26,5 (13)	14,3 (7)	30,6 (15)	0,0 (0)
Ciprofloxacina (CIP) (CLSI)	16,4 (9)	12,7 (7)	30,9 (17)	12,7 (7)	27,3 (15)	0,0 (0)
Cloranfenicol (CHL) (EUCAST)	0,0 (0)	11,1 (1)	22,2 (2)	22,2 (2)	44,4 (4)	0,0 (0)
Cloranfenicol (CHL) (CLSI)	0,0 (0)	11,1(1)	22,2 (2)	22,2 (2)	44,4 (4)	0,0 (0)
Gentamicina (GMN)	0,0 (0)	33,3 (1)	66,7 (2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Meropenem (MEM)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Sulfonamidas (S)	20,0 (7)	14,3 (5)	28,6 (10)	14,3 (5)	20,0 (7)	2,9 (1)
Tetraciclina (TE)	26,5 (13)	14,3 (7)	24,5 (12)	14,3 (7)	18,4 (9)	2,0 (1)
Trimetoprim (TRM)	28,0 (7)	12,0 (3)	28,0 (7)	16,0 (4)	16,0 (4)	0,0 (0)
TIPO	Reprodutoras	Poedeiras	Reprodutoras	Poedeiras	Reprodutoras	Poedeiras

4.4.2. ISOLADOS PROVENIENTES DE FEZES DE BOVINO

Dos 61 isolados provenientes de fezes de bovino, conforme o local de recolha verificou-se que existe diferenças percentuais entre a EUCAST e a CLSI, na interpretação dos resultados,

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

apenas para a gentamicina. Numa análise mais geral verificou-se que os isolados provenientes de fezes de bovino de Barcelos apenas apresentaram 100% de suscetibilidade para o meropenem, enquanto que os isolados provenientes de fezes de bovino de Ponte de Lima apresentaram 100% de suscetibilidade não só ao meropenem mas também à azitromicina, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina e finalmente ao trimetoprim.

De acordo com a figura 22, onde apresenta a percentagem de isolados caracterizados na categoria R + I, aos diferentes antimicrobianos estudados, averiguou-se que para os antimicrobianos que exibiram resistência em ambas as categorias, para as duas localidades, apenas a gentamicina foi o antimicrobiano que se manifestou com uma maior percentagem para Ponte de Lima, sendo que a diferença entre localidades desse antimicrobianos quando analisado pela EUCAST é de + 40%, e pela CSLI apenas de + 7,8%. O cloranfenicol foi o antibiótico que manifestou menos diferença percentuais entre as duas localidades. Destacou-se também os isolados de fezes de bovinos provenientes de Barcelos com uma exibição acima dos 10% em relação a Ponte de Lima para as sulfonamidas, tetraciclina e trimetoprim. Finalmente, conclui-se que tal como aconteceu anteriormente na análise das fezes de galinhas, caso houvesse o descarte da categoria I, a percentagem de exibição de resistência para o ácido nalidíxico para isolados de Ponte de Lima seria de 0%.

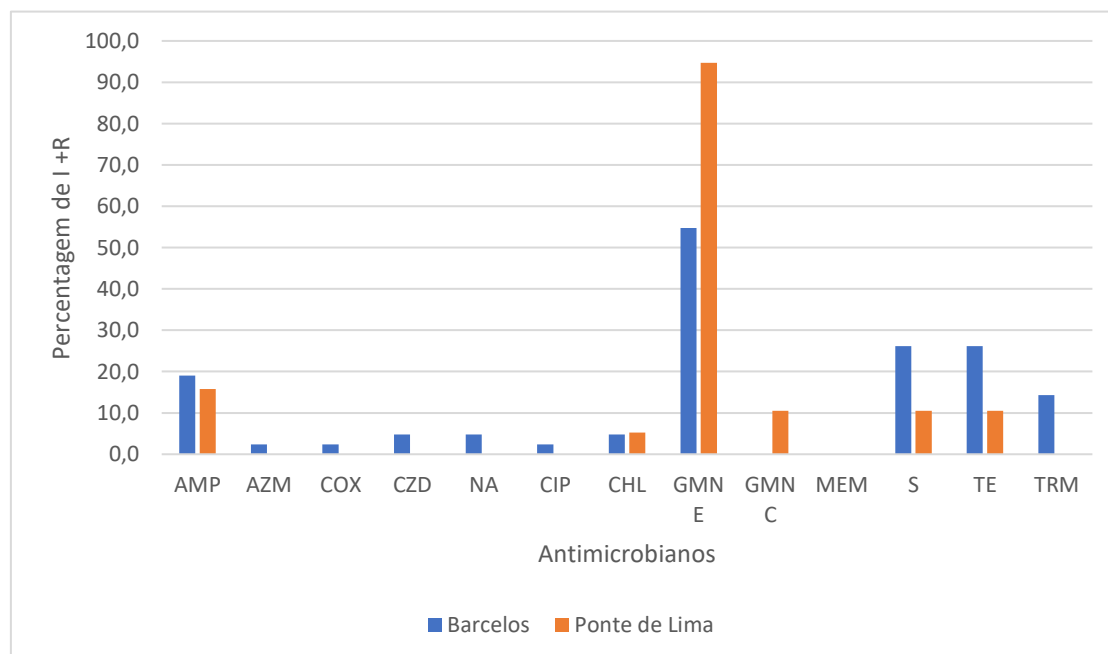


Figura 22: Percentagem de exibição de resistência (categoria Intermédio + Resistente) face aos antimicrobianos em estudo, para os isolados provenientes de fezes de bovino, face ao seu local de recolha

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 61 isolados provenientes de fezes de bovino, não exibiram resistência ao Meropenem. Outros antimicrobianos usados, também não exibiram resistência (isolados 100% suscetíveis) nos diferentes isolados das diferentes explorações em estudo, nomeadamente: a azitromicina, a cefotaxima e ceftazidima para os isolados da exploração L1, a ciprofloxacina para os isolados da exploração L2, a azitromicina, a cefotaxima, a ceftazidima, a ciprofloxacina e o trimetoprim para os isolados da exploração L3, e finalmente a ampicilina, a azitromicina, a cefotaxima, a ciprofloxacina e o cloranfenicol para os isolados da exploração L4. É importante destacar que as percentagens obtidas para os isolados da exploração L2 tanto para a cefotaxima como para a ceftazidima foi na categoria R, e os isolados da exploração L4 para a ceftazidima foi na categoria I.

Quando é analisado os isolados na categoria R+I, conforme a figura 23, verificou-se que das 4 explorações, a que apresentou a nível global, com exceção das sulfonamidas e a gentamicina, uma maior percentagem de exibição de resistências foi a exploração L2. Para a gentamicina, a predominância teve foco na exploração L3 e para as sulfonamidas a exploração L1. Perto dos 10%, os isolados que manifestaram resistência à azitromicina e cefotaxima foram da exploração L2, e para a ciprofloxacina a exploração L1. Acima dos 50 % de resistência para a L2, L3 e L4 o antimicrobiano que se destacou foi a gentamicina. Quase metade dos isolados da exploração L2 exibiram resistência à ampicilina e tetraciclina.

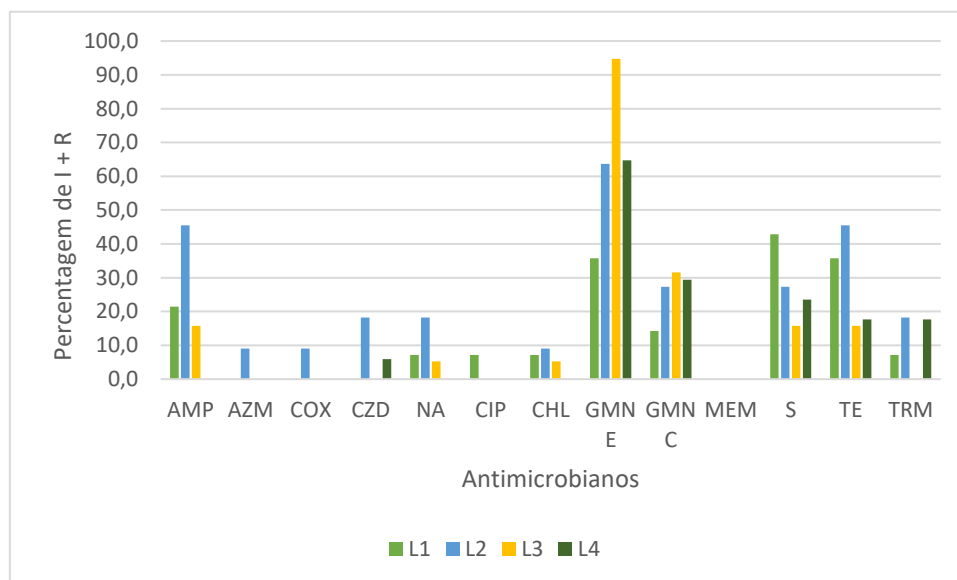


Figura 23: Exibição de resistência (categoria Intermédio + Resistente) face aos diferentes antimicrobianos em estudo de acordo com a exploração dos isolados provenientes de fezes de bovino

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 61 isolados provenientes de fezes de bovino em vacas de lactação e novilhas, verificou-se que para os isolados de vacas de lactação, taxas de 100% de suscetibilidade foram encontradas para a azitromicina, cefotaxima e meropenem, e para as novilhas a ciprofloxacina e o meropenem. Inicialmente pela figura 24, onde está expressa em percentagens a exibição de resistência da categoria I + R, verificou-se que as taxas na categoria R para a ceftazidima serem de 0%, há exibição de resistência intermédia para os isolados de fezes de vacas de lactação, e o mesmo acontece para as novilhas na gentamicina (E). Seguidamente averiguou-se que com exceção da ciprofloxacina e a gentamicina (E) as novilhas foram o grupo que apresentou maior exibição de resistência aos restantes antimicrobianos em estudo, destacando-se a ampicilina com uma diferença de 33,5% seguida da tetraciclina com 23%.

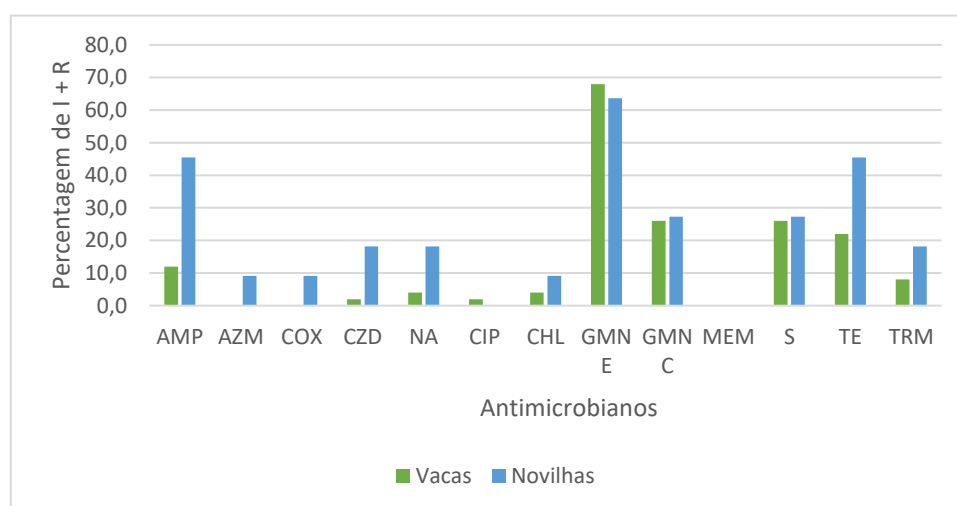


Figura 24: Exibição de resistência (categoria Intermédio + Resistente) face aos diferentes antimicrobianos em estudo dos isolados provenientes de fezes de bovino de acordo com o seu tipo: vacas em lactação *vs* novilhas

Em suma, através da tabela 22, onde é apresentada as percentagens de isolados que exibem resistência aos diferentes antimicrobianos (categoria I + R), face ao número total de isolados que exibem resistência a cada antibiótico, verificou-se que para as novilhas o antibiótico que se destacou com exibição de resistência por parte dos isolados foi a azitromicina e a cefotaxima com 100%. Em comparação entre novilhas e vacas de lactação os isolados de vacas de lactação assumem o seu índice de resistência superior à gentamicina na L4 e L3. Na análise apenas de isolados de vacas de lactação, para a ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina CLSI, Sulfonamidas, tetraciclina e trimetoprim, o maior foco de exibição de resistência foi nos isolados

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

de Barcelos. Quanto às diferenças entre explorações o foco com maior exibição de resistência aos antimicrobianos foi a L2 de Barcelos de isolados de fezes de novilhas.

Tabela 22: Percentagens de isolados provenientes de fezes de bovino de acordo com o seu local e tipo, que exibem resistência (categoria Intermédio + Resistente) face aos antimicrobianos em estudo

	Barcelos (BCL)			Ponte de Lima (PTL)
	L1 (%/nº)	L2 (%/nº)	L4 (%/nº)	L3 (%/nº)
Ampicilina (AMP)	27,3 (3)	45,5 (5)	0,0 (0)	27,3 (3)
Azitromicina (AZM)	0,0 (0)	100,0 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)
Cefotaxima (COX)	0,0 (0)	100,0 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)
Ceftazidima (CZD)	0,0 (0)	66,7 (2)	33,3 (1)	0,0 (0)
Ácido nalidíxico (NA)	25,0 (1)	50,0 (2)	0,0 (0)	25,0 (1)
Ciprofloxacina (CIP)	100,0 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Cloranfenicol (CHL)	33,3 (1)	33,3 (1)	0,0 (0)	33,3 (1)
Gentamicina (GMN) EUCAST	12,2 (5)	17,1 (7)	26,8 (11)	43,9 (18)
Gentamicina (GMN) CLSI	12,5 (2)	18,8 (3)	31,3 (5)	37,5 (6)
Meropenem (MEM)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Sulfonamidas (S)	37,5 (6)	18,8 (3)	25,0 (4)	18,8 (3)
Tetracilina (TE)	31,3 (5)	31,3 (5)	18,8 (3)	18,8 (3)
Trimetoprim (TRM)	16,7 (1)	33,3 (2)	50,0 (3)	0,0 (0)
	Vacas de Lactação	Novilhas	Vacas de lactação	Vacas de lactação

4.4.3. ESTUDOS SEMELHANTES

Um dos problemas mais atuais e alertado em todo mundo, incide sobre a resistência bacteriana aos antibióticos, uma vez que muitas bactérias anteriormente suscetíveis aos antibióticos usualmente utilizados deixaram de responder a esses mesmos agentes. Desde a introdução da utilização dos antibióticos que o nível de resistência microbiana tem crescido progressivamente, tendo aumentado acentuadamente nos últimos 15 anos. A introdução massiva de antimicrobianos para combater bactérias patogénicas tanto em humanos como em animais de produção tem levado a que as bactérias comensais que são constantemente expostas à ação dos antimicrobianos, principalmente as do trato digestivo, desenvolvam mecanismos de resistência para sobreviverem. *E. coli* sendo um microrganismo constantemente excretado no ambiente pelas fezes, vai-se disseminando para outros ecossistemas e propaga-se na comunidade e dissemina genes de resistências que podem ser adquiridos por outras bactérias comensais ou patogénicas.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo de Stella *et al.* (2013) que tinha como objetivo determinar os níveis de resistência das populações bacterianas de *E. coli* comensais em bovinos e aves saudáveis, foram recolhidas amostras de 45 bovinos leiteiros e de 80 frangos de corte, obtendo um total de 179 estirpes de *E. coli*, 91 de aves e 88 de bovino. Relativamente aos isolados de aves mostraram-se mais resistentes à ampicilina (84,6%), a sulfa+trimetoprim (68,1%) e a tetraciclina (67%). Já os isolados de bovinos mostraram-se mais resistentes a ampicilina (73,9%) e tetraciclina (38,6%). As maiores diferenças de resistência entre as populações foram observadas nos antimicrobianos sulfa+trimetoprim (aves: 68,1%, bovinos: 10,2%) e tetraciclina (aves: 67,0%, bovinos: 38,6%). As populações de *E. coli* provenientes do trato digestório das aves, mostraram-se mais resistentes aos antimicrobianos que as populações oriundas dos bovinos.

Tal como Stella *et al.* (2013), a ampicilina e a tetraciclina foram os antimicrobianos para os quais os isolados de fezes de galinhas exibiram maior número de resistências. Contudo para os isolados de fezes de bovino houve diferenças nos antimicrobianos destacados (ampicilina, gentamicina e sulfonamidas). Destacou-se também que onde é possível uma comparação (ampicilina) entre o estudo elaborado e Stella *et al.* (2013) obtiveram + 55,9% de exibição de resistência. Finalmente foi possível concluir também que para os isolados provenientes de fezes de galinha apresentam uma maior percentagem de exibição de resistências comparativamente aos isolados de bovino. Isto também pode dever-se uma vez que os isolados de fezes de galinha num estudo anterior já tivessem sido selecionados através da exibição de resistência a ampicilina e/ou enrofloxacina.

Através de um estudo brasileiro realizado por Souto (2011) onde foi verificado o perfil de suscetibilidade de 62 amostras de *E. coli* provenientes de fezes de novilhas, verificaram que havia alta resistência ao ácido nalidíxico (53,2%), a ampicilina (75,8%), a tetraciclina (91,9%) e a sulfametoxazol/trimetoprim (66,1%) Em comparação com os resultados obtidos verificou-se que para os isolados de novilhas apenas a gentamicina era o antimicrobiano que apresentava maior número de resistência. Próximo a 50% os isolados resistentes correspondiam à ampicilina e tetraciclina. O ácido nalidíxico apenas apresentou uma percentagem de 9,1%.

De acordo com a EFSA (2019), os antimicrobianos que se destacaram com elevada resistência foram a ampicilina, sulfametoxazol, trimetoprim e tetraciclina, havendo grandes diferenças percentuais entre os diferentes países em estudo. Verificaram também que para mais de metade dos países, para frangos de corte, elevada resistência dos isolados para a ciprofloxacina e ácido nalidíxico. Contudo dentro destes dois antimicrobianos, as percentagens de isolados

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

resistentes à ciprofloxacina foi mais elevado que para o ácido nalidíxico. Já o cloranfenicol de maneira geral foi relatado em níveis baixos de resistência, com exceção de alguns países. Para a gentamicina, cefotaxima, ceftazidima e azitromicina a resistência era rara. A resistência ao meropenem não foi detetada em nenhum isolado dos países em estudo. A ciprofloxacina, cefotaxima e ceftazidima, meropenem e azitromicina, são substâncias consideradas de prioridade máxima pela OMS. Monitorar a resistência a antibióticos a animais produtores de alimentos é importante devido à sua facilidade de disseminação até ao humano. Assim a nível da União Europeia as exibições de resistência para a cefotaxima e ceftazidima foram relativamente baixas, contudo há relatos de isolados que já se apresentam resistentes a estes antimicrobianos, mais em bezerros que em aves. Contudo a resistência à ciprofloxacina ácido nalidíxico foi bastante alta em frangos de corte. Finalmente a azitromicina manifestou-se com uma percentagem bastante reduzida de resistência a nível geral (países em estudo), sendo muito baixos para bezerros e um pouco mais altos para frangos de corte.

De forma geral verificou-se que tal como acontece no estudo realizado pela EFSA, que a ampicilina e a tetraciclina são os antimicrobianos em que os isolados deste estudo exibem maior resistência. Também seguem a mesma lógica aquando se verifica a suscetibilidade dos isolados ao meropenem (100% suscetíveis). Quando se analisa nos diferentes grupo de animais, para isolados de galinhas o destaque está para isolados resistentes à ampicilina, ciprofloxacina e ácido nalidíxico. Contudo contrariamente ao relatório apresentado pela EFSA, a percentagem de isolados resistentes ao ácido nalidíxico é superior aos isolados resistentes à ciprofloxacina. Relativamente aos isolados de bovinos, o caso muda de figura, sendo que mantém uma percentagem elevada para a ampicilina, mas neste grupo destacam-se outros antimicrobianos tais como a gentamicina (quando analisada pelos *breakpoints* da EUCAST) e a tetraciclina. Tal como ocorre diferenças entre países, neste estudo também foi possível verificar que existe diferenças percentuais na exibição de resistência para os diferentes isolados e antimicrobianos. Para a cefotaxima e ceftazidima também se obteve uma percentagem de exibição de resistência baixa, mas maior também em isolados de fezes de bovino. Finalmente para a azitromicina os valores detetados também foram muito baixos contrariamente aos dados do relatório, houve maior exibição de resistência em isolados de galinha do que em isolados de bovinos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.4. ISOLADOS MULTIRRESISTENTES

De acordo com Magiorakos *et al.* (2011) para a caracterizar bactérias multirresistentes (MRD) é necessário que a bactéria apresente uma não suscetibilidade adquirida a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos. Assim, dos antimicrobianos em estudo, foi possível uma divisão em 10 categorias: aminoglicosídeos (gentamicina), carbapenemos (meropenem), cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (cefotaxima e ceftazidima), penicilinas (ampicilina), quinolonas (ciprofloxacina e ácido nalidíxico), fenicóis (cloranfenicol), tetraciclina (tetraciclina), macrólidos (azitromicina), pirimidinas (trimetoprim), e finalmente, sulfonamidas (sulfonamidas).

Dos 140 isolados em estudo (de acordo com os dados descritos no anexo D e E), a nível global verificou-se que a taxa de 100% suscetível foi de 7,9% e 20,0 %, para os resistentes de 49,3% e 40% e MRD de 42,9% e 40%, relativamente à EUCAST e CLSI respetivamente. Quando se distingue os dois grupos de animais em trabalho (bovinos *vs* galinhas) verificou-se que tal como era esperado apenas se encontrou isolados 100% suscetíveis nos isolados provenientes de fezes de bovino com 18% (EUCAST) e 45,9% (CLSI). Relativamente ao MRD, os isolados de bovinos exibiram menos multirresistências (24,6% pela EUCAST e 19,7% pela CLSI) que os isolados das galinhas (57,0% pela EUCAST e 55,7% pela CLSI).

Ao analisar pelo número de categorias que manifestaram resistência, verificou-se que os grupos predominantes são: 3 categorias e de 5 categorias. Para exibição de 7 categorias, apenas obteve-se um isolado de fezes de galinha. As diferenças entre EUCAST e CLSI são ligeiras de acordo com a tabela 23.

Tabela 23: Número de isolados resistentes a três ou mais categorias de antibióticos para serem considerados multirresistentes

	Galinhas		Bovinos		Galinhas + Bovinos		Galinhas + Bovinos (%)	
	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI
3	15	13	8	7	23	20	38,3	35,7
4	7	9	2	1	9	10	15,0	17,9
5	17	17	4	2	21	19	35,0	33,9
6	5	4	1	2	6	6	10,0	10,7
7	1	1	0	0	1	1	1,7	1,8
Total	45	44	15	12	60	56	100	100

Conforme na tabela 24, na análise apenas de isolados de bovino, verificou-se que para Barcelos a exibição de MRD é superior comparativamente aos isolados de Ponte de Lima. A nível

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

das explorações dentro de Barcelos a que se destacou com maior percentagem de MRD foi a L2. Das três explorações de Barcelos a que obteve menor percentagem de isolados multirresistentes foi a L4. Finalmente na distinção entre vacas de lactação e novilhas no geral, as novilhas apresentaram taxas de MRD superior em comparação com os isolados provenientes de fezes de vacas em lactação. Quando se compara apenas as explorações de Barcelos quanto aos isolados de vacas de lactação e isolados de novilhas o aumento percentual é de 17,5 (EUCAST) e de 16,4 (CLSI) para os isolados de novilhas. Já na tabela 25, verificou-se que nos isolados provenientes de fezes de galinhas da Beira Litoral e Estremadura e Ribatejo ambas de poedeiras, são os isolados que se caracterizam por ser maioritariamente MRD. Quando se analisa apenas os isolados de galinhas reprodutoras, o destaque incide sobre os isolados provenientes da Estremadura e Ribatejo. Verificando apenas o local de recolha, o isolado com maior percentagem de multirresistência incide sobre a Estremadura e Ribatejo, de seguida Beira Interior, e com quase metade da percentagem a Beira Litoral.

Finalmente verificou-se que de forma geral que as categorias que mais estão presentes na representação de um isolado multirresistente quando se analisa pela entidade EUCAST são as tetraciclinas (93,0%), as penicilinas (82,5%), as sulfonamidas e as fluoroquinolonas (71,9%) e finalmente as pirimidinas (52,6%). Também pela mesma entidade das 27 combinações encontradas, a mais prevalentes (pelo menos 5 isolados) para os isolados em estudo são: penicilinas + fluoroquinolonas + sulfonamidas + tetraciclinas + pirimidinas; penicilinas + fluoroquinolonas + tetraciclinas; e finalmente penicilina + fluoroquinolonas + sulfonamidas + tetraciclinas. Onde se obteve pelo menos 3 isolados de fezes de bovino foi na combinação aminoglicosídeos + sulfonamidas + tetraciclina. Relativamente a entidade CLSI, as categorias predominantes mantêm-se as mesmas, havendo ligeiras diferenças percentuais (tetraciclinas com 92,9%; penicilinas com 85,7%; sulfonamidas com 75%; fluoroquinolonas com 71,4%, e finalmente, pirimidinas com 53,6%. Quanto às diferentes combinações de categorias verificou-se que apenas existiam 24 combinações possíveis, destacando-se com mais de 5 isolados, apenas duas: penicilinas + fluoroquinolonas + sulfonamidas + tetraciclinas + pirimidinas e penicilinas + fluoroquinolonas + sulfonamidas + tetraciclinas.

De acordo com *European Medicines Agency* (EMA), no relatório de vendas de agentes antimicrobianos veterinários em 31 países europeus em 2017 em Portugal o uso de antimicrobianos para o uso veterinário sofreu amplas variações, ou seja de 2010 a 2012 a quantidade de antimicrobianos em uso em mg/PCU foi diminuindo (2010 – 177,9/ 2011- 161,8/

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

2012- 1569,8), subiu em 2013 e 2014 (2013- 187,2/ 2013- 201,6) voltou a diminuir em 2015 (170,3), sobe em 2016 (208,0) e em 2017 atinge o valor mais reduzido em 7 anos com 134,8 mg/PCU. A PCU para cada categoria de animal é calculada multiplicando-se o número de animais de criação (vacas leiteiras, ovelhas, porcas e cavalos) e animais abatidos (gado, cabras, porcos, ovelhas, aves, coelhos e perus) pelo peso teórico o mais provável hora de tratamento. Dos antimicrobianos que são possíveis administrar para tratamento animal, as tetraciclina, penicilinas, macrólidos e aminoglicosídeos, são os grupos de antimicrobianos mais usados em Portugal. Finalmente os dados mostraram que é nos porcos que há uma maior administração de antibióticos (344) e de seguida aves e gado (223, e 224) de PCU estimado por 1000 toneladas.

Num estudo elaborado por Barour *et al.* (2019) a 198 isolados de *E. coli* provenientes de fezes de bovino verificaram que que 63 isolados (31,82%) eram suscetíveis de todos os antibióticos usado no estudo, 42 isolados (21,21%) eram resistentes a um antibiótico, 43 isolados (21,72%) eram resistentes a dois antibióticos, 24 isolados (12,12%) resistentes a três antibióticos, 26 isolados (13,13%) foram resistentes a mais de três agentes, e 45 isolados (22,73%) eram MDR

Em relação ao nosso estudo, de forma geral é possível verificar que os isolados provenientes das fezes de galinhas e bovinos encontram-se com quase o dobro da percentagem de MRD comparativamente ao Barour *et al.* (2019).

De acordo com o relatório da EFSA, a ocorrência de isolados MDR é mais comum em frangos de corte (42,2%) em relação a bezerros (27,7%). Verificaram também que a ocorrência de MRD é superior no sul e leste da Europa. Nos padrões de MRD as categorias mais evidenciadas foram as tetraciclina, a penicilina, sulfonamidas e as pirimidinas. Evidenciaram também que a resistência as quinolonas era comum em isolados de MRD de frangos de corte (78,9%) e bezerros (28,9%). A ocorrência frequente destas diferentes categorias em padrões de isolados MRD, provavelmente reflete um uso extenso destas substâncias ao longo de muitos anos e normalmente os genes que estão ligados a estas substâncias geralmente estão ligados a elementos genéticos móveis, resultando numa co-seleção.

Em comparação ao estudo elaborado verificou-se que tal como pelo relatório elaborado pela EFSA, os isolados provenientes de fezes de galinha apresentam maior exibição de multirresistência em comparação com isolados provenientes de bovinos. No padrão de isolados de MRD, além daqueles mencionados como mais característicos pela EFSA, nestes isolados também foi bastante característico nesse padrão as fluoroquinolonas, destacando-se em isolados de fezes de galinhas.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 24: Percentagens de isolados multirresistentes provenientes de fezes de bovino de acordo com o local de recolha, a exploração e o seu tipo

	Barcelos				Ponte de Lima				Barcelos e Ponte de Lima		Barcelos	
	L1 (%/n ^a)		L2 (%/n ^a)		L4 (%/n ^a)		L3 (%/n ^a)		L1+L3+L4 (%/n ^a)		L1+L4 (%/n ^a)	
	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI
Suscetível	35,7 (5)	50,0 (7)	0,0 (0)	18,2 (2)	29,4 (5)	52,9 (9)	5,3 (1)	52,6 (10)	22,0 (11)	52,0 (26)	24,0 (6)	68,0 (17)
Resistente	35,7 (5)	21,4 (3)	54,5 (6)	45,5 (5)	52,9 (9)	29,4 (5)	78,9 (15)	42,1 (8)	58,8 (29)	32,0 (16)	80,0 (20)	44,0 (11)
Multirresistente	28,6 (4)	28,6 (4)	45,5 (5)	36,4 (4)	17,6 (3)	17,6 (3)	15,8 (3)	5,3 (1)	20,0 (10)	16,0 (8)	28,0 (7)	20,0 (5)
Multirresistente (REGIÃO)	28,6% - EUCAST 23,7% - CLSI				15,8% - EUCAST 5,3% - CLSI				-		-	
	Vacas de lactação		Novilhas		Vacas em lactação		Vacas de lactação		Vacas em lactação		Vacas em lactação	

Tabela 25: Percentagens de isolados multirresistentes provenientes de fezes de galinha de acordo com o local de recolha e o seu tipo

	Beira Litoral (%/n ^a)				Beira Interior (%/n ^a)				Estremadura e Ribatejo (%/n ^a)			
	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI
Suscetível	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Resistente	69,2 (9)	69,2 (9)	7,1 (1)	7,1 (1)	68,8 (11)	68,8 (11)	35,0 (7)	35,0 (7)	40,0 (6)	46,7 (7)	0,0 (0)	0,0 (0)
Multirresistente	30,8 (4)	30,8 (4)	92,9 (13)	92,9 (13)	31,3 (5)	31,3 (5)	65,0 (13)	65,0 (13)	60,0 (7)	53,3 (8)	100,0 (1)	100,0 (1)
Multirresistente (REGIÃO)	23,3% (EUCAST e CLSI)				50% (EUCAST e CLSI)				52,5% - EUCAST 56,3% - CLSI			
	Reprodutoras		Poedeiras		Reprodutoras		Poedeiras		Reprodutoras		Poedeiras	

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.5. SUBPOPULAÇÕES

Ao longo da realização dos antibiogramas, foram encontradas algumas subpopulações resistentes aos antimicrobianos testados. Os isolados que apresentaram estas características foram: L04V9PIC2 (AMP e NA), L04V14 (AMP), L04V17 (AMP, COX, NA, CIPRO) e A23 (AMP). Após a realização de uma seleção desses isolados para os diferentes antimicrobianos, ou seja, só os mais resistentes é que irão sobreviver às altas concentrações do antimicrobiano e realizado novo teste de suscetibilidade por difusão em disco verificou-se que conforme o isolado inicial para L04V9PIC2 tanto para as subpopulações de ampicilina como para as subpopulações de ácido nalidíxico apresentaram exibição de resistência à ampicilina. As subpopulações do ácido nalidíxico não se apresentaram resistente a esse antimicrobiano, e finalmente as subpopulações de ampicilina apresentaram exibição de resistência à cefotaxima, ciprofloxacina e gentamicina (E), e exibição intermediária ao ácido nalidíxico. Para o L04V14 as diferenças encontradas entre o isolado inicial e a subpopulação foi a exibição de resistência à ampicilina e a perda de exibição de resistência à gentamicina (categoria R – EUCAST; categoria I – CLSI). Para o isolado L04V17, verificou-se que as subpopulações de COX, NA e CIPRO exibiram resistência à ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, sulfonamidas, tetraciclina, trimetoprim e gentamicina (E) e apenas para o L04V17 CIPRO gentamicina (C). Para L04V17 AMP apenas se verificou exibição de resistência para a ciprofloxacina (categoria R), ácido nalidíxico (categoria I) e Gentamicina (E) (categoria R). Finalmente para o isolado E23 AMP verificou-se que de acordo com o inicial, exibiu resistência à ampicilina, a cefotaxima e gentamicina (E), e perdeu a exibição de resistência para a ciprofloxacina. Apesar de continuar a ter exibição de resistência para o ácido nalidíxico, esta subpopulação não se encaixa na categoria R tal como a inicial, mas sim na categoria I.

4.4.6. GENES DE RESISTÊNCIA

A partir dos isolados que exibiram resistência (L02V2C2, L02V17, L04V9PIC2 AMP, L04V16PIC3, L04V17 COX, A5, A15, E23 AMP e E29) (categoria R ou I) para a cefotaxima e ceftazidima, verificou-se quais os genes de resistência encontrados para ESBL e AmpC. Nenhum dos isolados manifestou os genes estudados para AmpC. Já para ESBL, detetou-se apenas o gene *bla*Tem e o *bla*CTX-M, como se pode ver na figura 25, com exceção dos isolados de L02V2C2 e L04V16PIC3 onde não foi atribuído nenhum gene em estudo.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

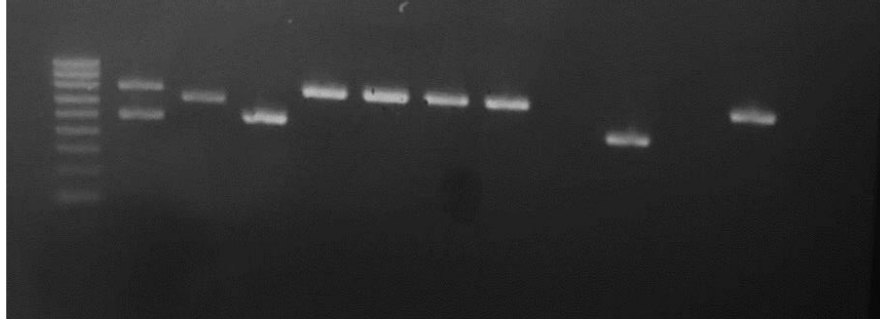


Figura 25: Perfis obtidos em gel de 2% agarose dos produtos de genes de resistência à ESBL por PCR multiplex. Linha 1 – Marcador de Peso Molecular V (1000 bp): Linha 2 – 3: Perfis obtidos das estirpes de controlo: *bla*TEM, *bla*CTX-M e *bla*SHV respetivamente; Linha 4-11: Perfis obtidos de isolados; e Linha 12 - controlo negativo.

Um estudo elaborado por Borzi (2019), onde pretendia caracterizar a *E. coli* proveniente de galinhas, verificaram que dos 21 isolados consideradas APEC, foram encontrados 5 isolados portadores do gene *bla*TEM e 2 isolados com *bla*SHV. O facto de alguns isolados serem portadores de genes ESBL é preocupante visto o potencial de transmissão de isolados ESBL entre humanos e outras espécies.

Num estudo elaborado por Palmeira (2018), onde analisaram a presença de isolados multirresistentes e genes de resistência de ESBL de bovinos saudáveis verificaram que que 66,5% dos bovinos analisados estavam colonizados por bacilos de Gram negativos resistentes aos antibióticos. Foi ainda detetado que 18,3% dos animais albergavam pelo menos um isolado de *Enterobacteriaceae* produtora de ESBL (73 isolados no total e 71 estes correspondiam a *E. coli*), apresentando perfil de resistência à cefotaxima superior que à de ceftazidima. As ESBL detetadas foram do tipo das CTX-M e SHV. A presença de *E. coli* produtoras de ESBL nas fezes dos bovinos como colonizador intestinal não é algo novo, existem diversos estudos que relatam, sendo que cada vez são mais reportadas como agentes patogénicos MDR responsáveis por graves infeções humanas ao redor do mundo (Palmeira, 2018).

CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conhecer o ambiente em que os animais de domesticação para produção de alimentos se encontram é um fator importante para permitir não só a qualidade de alimento para os seres humanos, assim como proporcionar uma qualidade de vida aos vários animais, e por sua vez, evitar que ocorram contaminações ambientais e levar a problemas de saúde pública. Fazer um estudo da diversidade de microrganismos das fezes dos animais, desde características fenotípicas, genotípicas, resistência a antibióticos permite-nos verificar se nas diferentes explorações de gado ou aves há a presença de estirpes altamente patogénicas e estirpes altamente resistentes a diferentes antimicrobianos que ao longo das vidas destes animais são administrados.

O estudo de fezes de animais saudáveis também é importante, pois permite-nos uma maior obtenção e caracterização de estirpes comensais, ou seja, permite-nos principalmente aferir as resistências a antimicrobianos, que mesmo não provocando malefícios ao animal, poderão transmitir genes de resistência a estirpes patogénicas levando a problemas maiores. O estudo de fezes também se torna relevante pois o estrume pode levar a uma disseminação de microrganismos resistentes no ambiente ou de genes resistentes que podem ser passados inter-espécie, o que pode levar à chegada destes a casa das pessoas e por sua vez ao microbioma humano.

Neste estudo o grupo filogenético predominante é o B1 que corresponde a *E. coli* comensais ou patogénicas DEC. A diversidade de isolados de fezes de galinha no respeitante aos grupos filogenéticos é diferente conforme a região de proveniência e conforme o tipo de bando. Verificou-se que na mesma amostra poderiam existir isolados pertencentes a filogrupos diferentes. O filogrupo predominante nos isolados provenientes de bovinos foi diferente conforme a origem / exploração. Quanto aos patótipos DEC não foram encontrados os genes. Os isolados provenientes de fezes de galinha apresentaram um maior índice de resistências aos diferentes antimicrobianos estudados. Foram encontrados isolados multirresistentes provenientes das fezes de ambos animais, assim como isolados portadores de genes de ESBL tanto nos isolados provenientes de fezes de bovino como de fezes de galinha. É importante enfatizar a necessidade de uma harmonização entre a EUCAST e a CLSI para as tomadas de decisões, e para que os resultados a nível mundial possam ser comparáveis sem margens de erro.

Após uma implementação de métodos para caracterização fenotípica e genotípica da *E. coli*, seria importante dar continuidade a este estudo de forma mais massiva para obtenção de mais conhecimento sobre toda a microbiologia envolvida nas explorações portuguesas de bovinos e de

CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES FINAIS

aves. Ou seja, a possibilidade de recolha de fezes destes animais de outras zonas do país, e com um maior número de isolados; e a obtenção de fezes de animais saudáveis e animais não saudáveis para possível comparação entre as estirpes patogénicas DEC, e estirpes comensais DEC. Seria também relevante o estudo não só de fezes de bovinos leiteiros mas também bovinos para alimentação e finalmente o estudo de isolados clínicos e comparar entre a *E. coli* patogénica animal e a *E. coli* patogénica clínica.

Também seria importante numa fase seguinte a elaboração do MLST para os isolados onde não foram possíveis serem caracterizados num grupo filogenético; obter controlos positivos para avaliar os isolados no patotipo DAEC, assim como avaliar os isolados quanto à sua patogenicidade fora do intestino.

CAPÍTULO
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, M. J. (1996). Epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection in Bangladesh. *Revista de Microbiologia*, 17–20.
- Albert, M. J., Faruque, S. M., Faruque, A. S. G., Neogi, P. K. B., Ansaruzzaman, M., Bhuiyan, N. A., Alam, K., & Akbar, M. S. (1995). Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. *Journal of Clinical Microbiology*, 973–977
- Alves, A. R. D. F. (2012). Doenças Alimentares de Origem Bacteriana. *Universidade Fernando Pessoa*, 1–87.
- Amaro, A., Correia, I., & Clemente, L. (2019). Resistência aos antibióticos em bactérias com origem em animais de cadeia alimentar. *Dossier técnico de Vida Rural*, 42–45.
- Andrade, C. I. (2005). Histopatologia e identificação da *Escherichia coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte, 1–65.
- Antão, E. M., Wieler, L. H., & Ewers, C. (2009). Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*, 1 (1) , 22.
- Aranda, K. R. S., Fabbriotti, S. H., Fagundes-Neto, U. & Scaletsky, I. C. A. (2007). Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. *Federation of European Microbiological Societies*, 145–150.
- Arikawa, K., Meraz, I. M., Nishikawa, Y., Ogasawara, J., & Hase, A. (2005). Interleukin-8 secretion by epithelial cells infected with diffusely adherent *Escherichia coli* possessing *afa* adhesin-coding genes. *Microbiology and Immunology*, 493–503.
- Arlet, G., Rouveau M., Philippon A. (2006). Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum β -lactamase. *FEMS Microbiology Letters*, (152), 163–167.
- ASAE (Autoridade de segurança alimentar e económica). (2019). *Escherichia coli*. <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/escherichia-coli.aspx> Consultado a 20 de Outubro de 2019.
- Babai, R., Blum-Oehler, G., Stern, B. E., Hacker, J., & Ron, E. Z. (1997). Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiology Letters*, 149(1), 99–105.
- Barour, D., Berghiche, A., & Boulebda, N. (2019). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from cattle in Eastern Algeria. *Veterinary World*, 12 (8), 1195–1203.
- Batista, M. G. F. M. (2013). Mecanismos de resistência a antibióticos. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1–51.
- Beraldo, L. G., Borges, C. A., Maluta, R. P., Cardozo, M. V., Rigobelo, E. C., & de Ávila, F. A. Ô. (2014). Detection of Shiga toxigenic (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in dairy buffalo. *Veterinary Microbiology*, 170 (1–2), 162–166.
- Berchieri, J. A. Macari M, (2000). Doenças das aves. Campinas. *Campina: Facta*, 1–490.
- Berg, R. D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology*, 4 (11), 430–435.
- Bernet-Camard, M. F., Coconnier, M. H., Hudault, S., & Servin, A. L. (1996). Pathogenicity of the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 1918–1928.
- Bétis, F., Brest, P., Hofman, V., Guignot, J., Bernet-Camard, M. F., Rossi, B., Servin, A., & Hofman, P. (2003). The *Afa/Dr* adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* stimulate interleukin-8 secretion, activate mitogen-activated protein kinases, and promote polymorphonuclear transepithelial migration in T84 polarized epithelial cells. *Infection and Immunity*, 71 (3),

CAPÍTULO IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1068–1074.
- Bilge, S. S., Clausen, C. R., Lau, W., & Moseley, S. L. (1989). Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Journal of Bacteriology*, 4281–4289.
- Biscola, F. T., Abe, C. M., & Guth, B. E. C. (2011). Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 2201–2208.
- Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A., Jansen, W. H., García, V., Vázquez, M. L., & Blanco, J. (1998). Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Veterinary Microbiology*, 61 (3), 229–235.
- Borges, C. A., Beraldo, L. G., Maluta, R. P., Cardozo, M. V., Guth, B. E. C., Rigobelo, E. C., & De Ávila, F. A. (2012). Shiga toxigenic and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in the feces and carcasses of slaughtered pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9 (12), 1119–1125.
- Borzi, M. M. (2019). Caracterização de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) isoladas de galinhas de Angola (Numida meleagris). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1–53.
- Brooks, G. F. & Carroll K. C. (2011). Patogenicidade de la Infección bacteriana. *Microbiología médica*, (25) 1–158.
- Buzby, J. C., & Roberts, T. (2009). The economics of enteric infections: human foodborne disease costs. *Gastroenterology*, 136 (6), 1851–1862.
- Canto, E. (2010). Em dia com as ciências. *Aids*, 1–3.
- Carlos, C., Pires, M. M., Stoppe, N. C., Hachich, E. M., Sato, M. I. Z., Gomes, T. A. T., Amaral, L. A., & Ottoboni, L. M. M. (2010). *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BioMedCentral Microbiology*, 1–11.
- Castanheira, B. A. M. G. (2013). Mecanismos de resistência a antibióticos. *Dissertação de Mestrado, Lisboa, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia Faculdade de Ciências e Tecnologias Da Saúde*, 42.
- Chaudhuri, R. R., & Henderson, I. R. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. In *Infection, Genetics and Evolution*, 12 (2), 214–226.
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65 (2), 232–260.
- CLSI. (2020). EM100 Connect - CLSI M100 ED30:2020 <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED30:2020&scope=user>. Consultado a 10 de Agosto de 2020.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 4555–4558.
- Clermont, Olivier, Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylogenetic groups. *Environmental Microbiology Reports*, 58–65.
- Cortes, M. A. M., Gibon, J., Chanteloup, N. K., Moulin-Schouleur, M., Gilot, P., & Germon, P. (2008). Inactivation of *ibeA* and *ibeT* results in decreased expression of type 1 fimbriae in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908. *Infection and Immunity*, 76 (9), 4129–4136.
- Coura, F. M., de Araújo Diniz, S., Mussi, J. M. S., Silva, M. X., Lage, A. P., & Heinemann, M. B. (2016). Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. *Folia*

CAPÍTULO IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Microbiologica*, 62 (2), 139–144.
- Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (1), 26–38.
- Cusack, T. P., Ashley, E. A., Ling, C. L., Rattanavong, S., Roberts, T., Turner P., Wangrangsimakul, T. e Dance D. A. B. (20019). Impact of CLSI and EUCAST breakpoint discrepancies on reporting of antimicrobial susceptibility and AMR surveillance. *Clinical Microbiology and Infection*, 910–911
- Czeczulin, J. R., Balepur, S., Hicks, S., Phillips, A., Hall, R., Kothary, M. H., Navarro-Garcia, F., & Nataro, J. P. (1997). Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 4135–4145.
- Dallene, C., da Costa, A., Decré, D., *et al.* (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, (65), 490–495.
- Damerow, G. (1995). Criação de galinhas - criação, alimentação, saúde. *Euroagro*, 1–350.
- Dho-Moulin, M., & Fairbrother, J. M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research EDP Sciences*, 2-3, (30), 299–316.
- DECO (Defesa do Consumidor). (2016). *Bactérias: por que são tão resistentes?* <https://www.deco.proteste.pt/saude/medicamentos/dossies/resistencia-a-antibioticos-problema-de-saude-publica-a-combater/porque-sao-tao-resistentes> Consultado a 10 Fevereiro de 2020
- Donnenberg, M. S. (2013). *Escherichia coli*: pathotypes and principles of pathogenesis. *Elsevier*, (2).
- Drawz, S. M. & Bonomo R. A. (2010). Three decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, (23), 160–201.
- DuPont, H. L., Formal, S. B., Hornick, R. B., Snyder, M. J., Libonati, J. P., Sheahan, D. G., LaBrec, E. H., & Kalas, J. P. (1971). Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *New England Journal of Medicine*, 285 (1), 1–9.
- Džidić, S., Šušković, J., & Kos, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology*, (46), 11–21.
- Dziva, F., & Stevens, M. P. (2008). Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. In *Avian Pathology*, 4 (37), 255–255.
- (ECDC) European Centre for Disease Prevention and Control. (2019). Antimicrobial consumption in the EU/EEA, annual epidemiological report for 2018. *Ecdc*.
- Edwards, P. R. & Ewing, W. H. (1986). Edwards e Ewing's - identification of Enterobacteriaceae. *Elsevier Science Publishing*, 1–536.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2020). The european union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018, 1–166.
- El-Halfawy, O. M., & Valvano, M. A. (2015). Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clinical Microbiology Reviews*, 28 (1), 191–207
- EMA (European Medicines Agency). (2019). Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2017: Trends from 2010-2017. Ninth ESVAC Report - EMA/294674/2019, 106.
- EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). (2020). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, 1–116.
- Escobar-Páramo, P., Le Menac'h, A., Le Gall, T., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Skurnik, D., & Denamur, E. (2006). Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environmental Microbiology*, 8 (11),

CAPÍTULO IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1975–1984.
- Fagundes-Neto, U., & Scaletsky, I. C. (2000). The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. In *São Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*, 1806–1812.
- Faundez, G., Figueroa, G., Troncoso, M., & Cabello, F. C. (1988). Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Chile. *Journal of Clinical Microbiology*, 26 (5), 928–932.
- FDA. (2019). *Outbreaks of Foodborne Illness / FDA*. Retrieved November 11, 2020, from https://www.fda.gov/food/recalls-outbreaks-emergencies/outbreaks-foodborne-illness?fbclid=IwAR3d_Tmy-EyH-4rPOlPttcOyc8LpOZriPfbU_mEYjPZqwroUX7i6WRYpl-8
Consultado a 15 de dezembro de 2019.
- Ferreira, A. J. P., Knöbl, T. (2009). Colibacilose aviária. *Doenças das Aves*, (2), 1–1102
- Forsythe, S. J. (2002a). Doenças de origem alimentar. *Microbiologia da segurança alimentar. Artmed*, 65–108.
- Forsythe, S. J. (2002b). Microorganismos causadores de doenças de origem alimentar. *Microbiologia da segurança alimentar. Artmed*, 164–168.
- Forsythe, S. J. (2010). Foodborne infections and intoxications. *The Microbiology of Safe Food. Oxford*, (2), 1–51.
- Fratamico, P. M. & Smith, J. L. (2006). *Escherichia coli: Foodborne infections and Intoxications. Elsevier*, (3), 205–258.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., & Ohno, H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 543–547.
- García-Aljaro, C., Muniesa, M., Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., Jofre, J., & Blanch, A. R. (2005). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiology Letters*, 1–8.
- 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), 1–10.
- Gordon, D. M., Clermont, O., Tolley, H., & Denamur, E. (2008). Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*, 2484–2496.
- Gould, L. H., Mody, R. K., Ong, K. L., Clogher, P., Cronquist, A. B., Garman, K. N., Lathrop, S., Medus, C., Spina, N. L., Webb, T. H., White, P. L., Wymore, K., Gierke, R. E., Mahon, B. E., & Griffin, P. M. (2013). Increased recognition of Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: Epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10 (5), 453–460.
- Griffin, P. M., & Tauxe, R. V. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic Reviews*, 60–98.
- Gumz, E., Schoneweg, N., & Arcanjo, S. (2015). uso irracional de drogas antimicrobianas e a resistência bacteriana-antibióticos. *Academicos de Enfermagem Do Terceiro Período Das Faculdades Integradas Santa Cruz*, 4, 1–2.
- Harada, S., Ishii, Y., & Yamaguchi, K. (2008). Extended-spectrum- β -lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, (28), 401–412.
- Harrington, S. M., Dudley, E. G., & Nataro, J. P. (2006). Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiology Letters*, 254 (1), 12–18.
- Hazen, T. H., Sahl, J. W., Fraser, C. M., Donnenberg, M. S., Scheutz, F., & Rasko, D. A. (2013).

CAPÍTULO IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Refining the pathovar paradigm via phylogenomics of the attaching and *effacing Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 12810–1215.
- Hedberg, C. W., Savarino, S. J., Besser, J. M., Paulus, C. J., Thelen, V. M., Myers, L. J., Cameron, D. N., Barrett, T. J., Kaper, J. B., & Osterholm, M. T. (1997). An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying Diarrheogenic *E. coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 1625–1628.
- INE(Instituto Nacional de Estatística). (2019). *Relatório de Estatísticas Agrícolas de 2018*, 1- 171.
- INFARMED. (2019). Modo de ação das diferentes famílias de antibioticos <http://mtier.infarmed.pt:7777/prontuario/> Consultado a 20 novembro 2019.
- ISO/TS 13136. (2012). Microbiology of food and animal feed – Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens – Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.
- Itoh, Y., Nagano, I., Kunishima, M., & Ezaki, T. (1997). Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *Journal of Clinical Microbiology*, 2546–2550.
- Jain R & Danziger, L. H. (2004). The macrolide antibiotics: a pharmacokinetic and pharmacodynamic overview. *Curr pharm*, 10 (25), 3045–3053.
- Johnson, J. R., & Russo, T. A. (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “the other bad *E. coli*.” *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 155–162.
- Johnson, J. R., & Stell, A. L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *Journal of Infectious Diseases*, 261–272.
- Johnson, J. R., Weissman, S. J., Stell, A. L., Trintchina, E., Dykhuizen, D. E., & Sokurenko, E. V. (2001). Clonal and pathotypic analysis of archetypal *Escherichia coli* cystitis isolate NU14. *Journal of Infectious Diseases*, 1556–1565.
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Johnson, S. J., Stell, A. L., Doetkott, C., Johnson, J. R., Kim, K. S., Spanjaard, L., & Nolan, L. K. (2008). Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (22), 7043–7050.
- Kaneman, E. W., Winn, W. C., Allen S. D., Janda, W. M., Procop, G. W., Schreckenberger, P. C., Woods, G. L. (2006). Diagnóstico Microbiológico. *Texto e Atlas*,(6), 1–639.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 123–140.
- Kaper, J. B., & O'Brien, A. D. (2014). *Overview and Historical Perspectives. Microbiology Spectrum*, 2 (6), 1–9.
- Kester, M., Vrana, K. E., Quraishi, S. A., Karpa, K. O. (2008). *Farmacologia. Elsevier*, 1–280.
- Knöbl, T., Micke Moreno, A., Paixo, R., Gomes, T. A. T., Vieira, M. A. M., Da Silva Leite, D., Blanco, J. E., & Ferreira, A. J. P. (2012). Prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) clone harboring *sfa* gene in Brazil. *The Scientific World Journal*, 1–7.
- Kojima, A., Ishii, Y., Ishihara, K., et al. (2005). Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring program. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, (49), 3533–3537.
- Konowalchuk, J., Speirs J. L., Starvic, S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infections and Imunity*, 3 (18), 775–779.
- Lane, & J., D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial*

CAPÍTULO IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Systematics*, 125–175.
- Lascowski, K. M. S., Guth, B. E. C., Martins, F. H., Rocha, S. P. D., Irino, K., & Pelayo, J. S. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of north Paraná State, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 114 (4), 1230–1239.
- Le Bouguéneq, C., & Servin, A. L. (2006). Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, 185–194.
- Leatham, M. P., Banerjee, S., Autieri, S. M., Mercado-Lubo, R., Conway, T., & Cohen, P. S. (2009). Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. *Infection and Immunity*, 2876–2886.
- Levine, M. M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of Infectious Diseases*, 155(3), 377–381.
- Levine, M. M., Nataro, J. P., Karch, H., Baldini, M. M., Kaper, J. B., Black, R. E., Clements, M. Lou, & O'Brien, A. D. (1985). The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *Journal of Infectious Diseases*, 152 (3), 550–559.
- Li, G., Feng, Y., Kariyawasam, S., Tivendale, K. A., Wannemuehler, Y., Zhou, F., Logue, C. M., Miller, C. L., & Nolan, L. K. (2010). AatA is a novel autotransporter and virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 78 (3), 898–906.
- Lima, J. C. D. (2012). O papel do leite ao longo do ciclo de vida. *Universidade Do Porto*, 1–24.
- Lima, S. B., & Ferreira, H. N. (2013). Disseminação de Enterobacteriaceae produtoras de beta-lactamases de espectro alargado em crianças (artigo de revisão). *Nascer e Crescer*, 22 (2), 87–91.
- Mainil, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152 (1–2), 2–12.
- Majowicz, S. E., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J. M., Stapleton, J., Angulo, F. J., Yeung, D. H., & Kirk, M. D. (2014). Global incidence of human shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: A systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6 (11), 447–455.
- 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. (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology Infection*, 268-282
- Maluta, R. P., Fairbrother, J. M., Stella, A. E., Rigobelo, E. C., Martinez, R., & Ávila, F. A. de. (2014). Potentially pathogenic *Escherichia coli* in healthy, pasture-raised sheep on farms and at the abattoir in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 169 (1–2), 89–95.
- Marin N., Luiza V. L., Osório De Castro C. G. S., Machado Dos Santos S. (2003) Assistência farmacêutica para gerentes municipais. Organização Pan-Americana de saúde (OPAS)/Organização Mundial da Saúde (OMS), 2003, 1–373.
- Mascaretti, O. A. (2003). Bacteria Versus Antibacterial Agents: An Integrated Approach. *ASM Press*, 1–393.
- Momeni, B., Chen, C. C., Hillesland, K. L., Waite, A., & Shou, W. (2011). Using artificial systems to explore the ecology and evolution of symbioses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1353-1368.
- Moosdeen, F. (1996). Impact of β -lactamases on the clinical use of β -lactam antibiotics. *Cambridge Medical Publications*, 6-11

CAPÍTULO IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Morato, E. P., Leomil, L., Beutin, L., Krause, G., Moura, R. A., & Pestana De Castro, A. F. (2009). Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. *Zoonoses and Public Health*, 229–237.
- Moreno, A. C. R., Filho, A. F., Gomes, T. do A. T., Ramos, S. T. S., Montemor, L. P. G., Tavares, V. C., Filho, L. dos S., Irino, K., & Martinez, M. B. (2010). Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 66 (1), 50–57.
- Moriel, D. G., Bertoldi, I., Spagnuolo, A., Marchi, S., Rosini, R., Nesta, B., Pastorello, I., Mariani Corea, V. A., Torricelli, G., Cartocci, E., Savino, S., Scarselli, M., Dobrindt, U., Hacker, J., Tettelin, H., Tallon, L. J., Sullivan, S., Wieler, L. H., Ewers, C., ... Serino, L. (2010). Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (20), 9072–9077.
- Moulin-Schouleur, M., Répérant, M., Laurent, S., Brée, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., Rasschaert, D., & Schouler, C. (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (10), 3366–3376.
- Moura, R. A. (2009). “*Estudo Das Relações Clonais Entre Amostras De Escherichia Coli Enteropatogênica Atípica De Origem Animal E Humana*, 1-39.
- Monstein, H. J., Ostholm-Balkhed A., Nilsson M. V., et al. (2007). Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS*, (115), 1400-1408.
- Murray, P. P. (1999). Manual of Clinical Microbiology. *Washington DC*, 1-1773.
- Nagy, B., & Fekete, P. Z. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6–7), 443–454.
- Nataro, J. P., Deng, Y., Maneval, D. R., German, A. L., Martin, W. C., & Levine, M. M. (1992). Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infection and Immunity*, 2297-2304.
- Nataro, J. P., Yikang, D., Yingkang, D., & Walker, K. (1994). AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 4691–4699.
- Nataro, J P, & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli* [published erratum appears . *Clinical Microbiology Reviews*, 142–201.
- Nataro, James P., Baldini, M. M., Kaper, J. B., Black, R. E., Bravo, N., & Levine, M. M. (1985). Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a dna probe. *Journal of Infectious Diseases*, 560–565.
- Nataro, James P., Kaper, J. B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P., & Levine, M. M. (1987). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 829–831.
- Neihardt, F. (2004). Bacterial genetics - an introduction to infectious diseases. *Sherris Medical Microbiology*, (4), 53–74.
- Nowicki, B., Labigne, A., Moseley, S., Hull, R., Hull, S., & Moulds, J. (1990). The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. *Infection and Immunity*, 279–281.
- O'Reilly, K. M., Low, J. C., Denwood, M. J., Gally, D. L., Evans, J., Gunn, G. J., Mellor, D. J., Reid, S. W. J., & Matthews, L. (2010). Associations between the presence of virulence determinants

CAPÍTULO IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- and the epidemiology and ecology of zoonotic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 8110–8116.
- Oliveira, W. F. De, Cardoso, W. M., Carlos, L., Marques, L., & Ramos, R. P. (2004). Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99, 211–214.
- Ozer, B., Duran, N., Onlen, Y., Savas, L. (2012). Efflux pump genes and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lower respiratory tract infections acquired in an intensive care unit. *The Journal of Antibiotics*, (65), 9–13.
- Palmeira, J. D. (2018). Colonização intestinal de bovinos brasileiros saudáveis por enterobacteriaceae multirresistentes aos antibióticos produtoras de beta-lactamases de espectro estendido. *Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto*, 212.
- Parsot, C. (2005). Shigella spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiology Letters*, 252 (1), 11–18.
- Paton, J. C., & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 3 (11), 450–479.
- Pavlovic, M., Luze, A., Konrad, R., Berger, A., Sing, A., Busch, U., Huber, I. (2010). Development of a duplex real-time PCR for differentiation between *E. coli* and *Shigella* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 1–7.
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J., & Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection? *Infection and Immunity*, 67 (2), 546–553.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly W. J., Leonard, F. C. (2005). Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease, Artmed*, 1-512.
- Regulamento (CE) N° 853/2004, que estabelece as regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal do Parlamento Europeu e do CoParlamento Europeu. Regulamento (CE) N° 853/2004, que estabelece as regras específicas de higie. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 139 (8), 1–51.
- Ribeiro, M., Pinto, I., & Pedrosa, C. (2009). Comportamento da população do concelho de Vizela no consumo de antibióticos. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 27, 57–70.
- Rice, L., Bonomo, R. (2005). Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. *Laboratory Medicine*, (5), 441–476.
- Rendon, M. A., Saldana, Z., Erdem, A. L., Monteiro-Neto, V., Vazquez, A., Kaper, J. B., Puente, J. L., & Giron, J. A. (2007). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 10637–10642.
- Robles, M., & Andrade, R. J. (2008). Hepatotoxicidad por antibióticos: Actualización en 2008. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 21 (4), 224–233.
- Rouquet, G., Porcheron, G., Barra, C., Répérant, M., Chanteloup, N. K., Schouler, C., & Gilot, P. (2009). A metabolic operon in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* promotes fitness under stressful conditions and invasion of eukaryotic cells. *Journal of Bacteriology*, 13 (191), 4427–4440.
- Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases*, 5 (181), 1753–1754.
- Sack, R. B. (1975). Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, 29, 333–353.

CAPÍTULO IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Savioli, J. Y. (2010). Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli*. *Dissertação (Mestrado)-Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*
- Scaletsky, I. C. A., Silva, M. L. M., & Trabulsi, L. R. (1984). Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infection and Immunity*, 45 (2), 534–536.
- Schmidt H., Knop C., Franke S., Aleksic S., Heesemann J., Karch H. (1995). Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, (33), 701–705.
- Schouler, C., Schaeffer, B., Brée, A., Mora, A., Dahbi, G., Biet, F., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, J., & Moulin-Schouleur, M. (2012). Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (5), 1673–1678.
- Sears S, h. j., Janes, h., Saloum, r., Brownlee, i., & Lamoreaux, l. f. (1956). Persistence of individual strains of *Escherichia coli* in man and dog under varying conditions. *Journal of Bacteriology*, 71 (3), 370–372.
- Silveira, L., Marques, A. & Machado, J. (2013). Patotipos de *Escherichia coli* associadas a infecções entéricas entre 2002-2012. Observações_Boletim epidemiológico. Número especial 1 *Doenças Infeciosas*, 1–3.
- Skurnik, D., Le Menac’h, A., Zurakowski, D., Mazel, D., Courvalin, P., Denamur, E., Andremont, A., & Ruimy, R. (2005). Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (7), 3062–3065.
- Small, P. C., & Falkow, S. (1988). Identification of regions on a 230-kilobase plasmid from enteroinvasive *Escherichia coli* that are required for entry into HEp-2 cells. *Infection and Immunity*, 56 (1), 225–229.
- Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Gunther, N. W. (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2 (4), 134–163.
- Sousa, J. C. (2006). Manual de Antibióticos Antibacterianos. *Universidade Fernando Pessoa*, 1-686.
- Souto, M. de S. M. (2011). *Sensibilidade a antimicrobianos de Escherichia coli patogênica e Salmonella spp. isoladas de fezes de bezerros do Centro Oeste e Alto Paranaíba de Minas Gerais*. 1–64.
- Stackebrandt, E., Murray, R. G. E., & Truper, H. G. (1988). Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives.” *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38 (3), 321–325.
- Stella, A. E., Vitor, T. L., Gadelha, D. F. B. G., Moreira, C. N., Meirelles-Bartoli, R. B., Oliveira, A. F. (2013). *Escherichia Coli* resistente a antimicrobianos isolada de bovinos e aves/ antimicrobial drug resistant. *Ars Veterinaria*, 527.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. In *Nature Reviews Microbiology*, 3 (8) , 207–217
- Tinaz, G. B. (2003). Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. *Turkish journal of Biology*, 2 (27), 1–9.
- Tomazi, T., Coura, F. M., Gonçalves, J. L., Heinemann, M. B., & Santos, M. V. (2018). Antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from bovine clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 101 (10), 9406–9418.
- Torres, A. G., Zhou, X., & Kaper, J. B. (2005). Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infection and Immunity*, 1 (73), 18–29.
- Trabulsi, L. R., Keller, R., & Tardelli Gomes, T. A. (2002). Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (5), 508–513.
- Veiga. (1984). Os antibióticos na prática clínica. *Infecon*, 1–204.

CAPÍTULO IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 5 (49), 376–386.
- Vidotto, M. C., Navarro, H. R., & Gaziri, L. C. J. (1997). Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 79–87.
- Viegas, S. J. (2014). Segurança Alimentar: Guia de boas práticas do consumidor. *BMC Public Health*, 1–52.
- Vieira, M. A. M., Andrade, J. R. C., Trabulsi, L. R., Rosa, A. C. P., Dias, A. M. G., Ramos, S. R. T. S., Frankel, G., & Gomes, T. A. T. (2001). phenotypic and genotypic characteristics of *escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and Shiga Toxin DNA probe sequences. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(5), 762–772.
- Walk, S. T. (2015). The “Cryptic” *Escherichia*. *EcoSal Plus*, 6(2), 1–2.
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. In *Experimental and Molecular Pathology*, 1 (85), 11-19.
- Williams, J. D. (1999). β -Lactamases and β -lactamase inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12, 1–30.
- Yamamoto, T., & Yokota, T. (1983). Sequence of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* pathogenic for humans. *Journal of Bacteriology*, 155 (2), 728–733.
- Zanatta, G. F., Kanashiro, A. M. I., Castro, A. G. M., Cardoso, A. L. S. P., Tessari, E. N. C., & Pulici, S. C. P. (2004). Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. *Arquivo Instituto Biológico*, 71 (3), 283–286.

CAPÍTULO
ANEXOS

CAPÍTULO
ANEXOS

ANEXO A- Isolados utilizados no estudo. Proveniência e resultados aos testes fenotípicos realizados

Identificação	Localização geográfica	Origem animal	Tipo	Fermentação do sorbitol	hemólise	Indol
L01V1	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L01V3	Barcelos	Bovino	Lactação	-	+	+
L01V4	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L01V6	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L01V7	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L01V8	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L01V9	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L01V10	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L01V11	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L01V12	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L01V13	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L01V17	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	-
L01V18	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L01V20	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L02V1P5C4	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L02V2C2	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L02V7	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L02V8	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L02V11P1	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L02V13	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L02V14P3C3	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L02V15P5C6	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L02V17	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L02V18	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L02V20P1C6	Barcelos	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V1	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V2	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V3	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V4	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V5	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V6	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V7PIC9	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V8	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V9	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V11	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V12	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V13	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V14	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V15	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+

CAPÍTULO
ANEXOS

Identificação	Localização geográfica	Origem animal	Tipo	Fermentação do sorbitol	hemólise	Indol
L03V16	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V17	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V18	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V19	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L03V20	Ponte de Lima	Bovino	Lactação	+	+	+
L04V1	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+++	+
L04V2	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+++	+
L04V3	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+++	+
L04V4	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+	+
L04V6	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+	+
L04V7P5C1	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+	+
L04V9P1C2	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+	+
L04V12	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+	+
L04V13	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+++	+
L04V14	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+++	+
L04V15	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+++	+
L04V16P2C1	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+	+
L04V17	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+++	+
L04V19P2C8	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+	+
L04V7P5C3	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+	+
L04V9P1C3	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+	+
L04V16P1C3	Barcelos	Bovino	Novilhas	+	+	+
1	Leiria	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+
4	Viseu	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+
5	Viseu	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
8	Viseu	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+
10	Viseu	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+
12	Leiria	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+
15	Nav	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
19	Leiria	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
20	Leiria	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
21	Leiria	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
23	Viseu	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+
24	Lisboa	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+

CAPÍTULO
ANEXOS

Identificação	Localização geográfica	Origem animal	Tipo	Fermentação do sorbitol	hemólise	Indol
25	Coimbra	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
26	Coimbra	Galinhas amp	Reprodutoras	-	+	+
27	Coimbra	Galinhas amp	Reprodutoras	-	+	+
28	Coimbra	Galinhas amp	Reprodutoras	-	+	+
29	Leiria	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+
30	Leiria	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+
33	DAVR	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
34	DAVR	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
37	DAVR	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
38	Leiria	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+
39	Leiria	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+
40	Leiria	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+
41	Viseu	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
42	Viseu	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
43	Viseu	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
44	Viseu	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
45	Viseu	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
46	Viseu	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
47	Viseu	Galinhas amp	Reprodutoras	+	+	+
48	Viseu	Galinhas amp	Poedeiras	-	+	+
49	Viseu	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+
51	Viseu	Galinhas amp	Reprodutoras	-	+	+
53	Gouveia	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+
54	Gouveia	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+
55	Gouveia	Galinhas amp	Poedeiras	+	+	+
1	Leiria	Galinhas enro	Poedeiras	+	+	+

CAPÍTULO
ANEXOS

Identificação	Localização geográfica	Origem animal	Tipo	Fermentação do sorbitol	hemólise	Indol
2	Catelo Branco	Galinhas enro	Poedeiras	+	+	+
4	Viseu	Galinhas enro	Poedeiras	+	+	+
5	Viseu	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
6	Viseu	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
8	Viseu	Galinhas enro	Poedeiras	+	+	+
9	Viseu	Galinhas enro	Poedeiras	+	+	+
11	Leiria	Galinhas enro	Poedeiras	+	+	+
12	Leiria	Galinhas enro	Poedeiras	+	+	+
14	Nav	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
15	Nav	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
16	Nav	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
17	Nav	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
18	NAV	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
19	Leiria	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
20	Leiria	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
21	Leiria	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
22	Viseu	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
23 A	Viseu	Galinhas enro	Poedeiras	+	+	+
25	Coimbra	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
26	Coimbra	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
27	Coimbra	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
28	Coimbra	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
29	Leiria	Galinhas enro	Poedeiras	+	+	+
32	DAVR	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
33	DAVR	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
34	DAVR	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+

CAPÍTULO
ANEXOS

Identificação	Localização geográfica	Origem animal	Tipo	Fermentação do sorbitol	hemólise	Indol
35	DAVR	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
36	DAVR	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
37	DAVR	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
39	Leiria	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
41	Viseu	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
42	Viseu	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
43	Viseu	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
44	Viseu	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
46	Viseu	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
47	Viseu	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
50	Viseu	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
51	Viseu	Galinhas enro	Reprodutoras	+	+	+
59	NAVG	Galinhas enro	Poedeiras	+	+	+
60	NAVG	Galinhas enro	Poedeiras	+	+	+
61	Aveiro	Galinhas enro	Poedeiras	+	+	+

ANEXO B- Resultados dos isolados de E. coli para os genes ... e correspondente grupo filogenético.

GENES FILOGRUPOS								
Origem	Identificação	arpA	ChuA	yjaA	TSPE4.C2	arpAgpE	trpA	Filogrupo
Bovino	L01V1	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L01V3	+	-	+	+	x	x	Confirmar MLST
Bovino	L01V4	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L01V6	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L01V7	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L01V8	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L01V9	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L01V10	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L01V11	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L01V12	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L01V13	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L01V17	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L01V18	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L01V20	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L02V1P5C4	+	-	+	+	x	x	Confirmar MLST
Bovino	L02V2C2	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L02V7	+	-	+	-	x	-	A
Bovino	L02V8	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L02V11P1	+	-	+	+	x	x	Confirmar MLST
Bovino	L02V13	+	-	+	+	x	x	Confirmar MLST
Bovino	L02V14P3C3	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L02V15P5C6	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L02V17	+	-	+	-	x	-	A
Bovino	L02V18	+	-	+	-	x	-	A
Bovino	L02V20P1C6	+	-	+	-	x	-	A
Bovino	L03V1	+	-	+	-	x	-	A
Bovino	L03V2	+	-	-	-	x	x	A
Bovino	L03V3	+	-	+	-	x	-	A
Bovino	L03V4	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L03V5	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L03V6	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L03V7PIC9	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L03V8	+	-	+	-	x	-	A
Bovino	L03V9	+	-	-	-	x	x	A
Bovino	L03V11	+	-	+	-	x	-	A
Bovino	L03V12	+	+	+	-	-	x	Clade I
Bovino	L03V13	+	-	+	-	x	-	A
Bovino	L03V14	+	-	-	+	x	x	B1

CAPÍTULO
ANEXOS

GENES FILOGRUPOS								
Origem	Identificação	arpA	ChuA	yjaA	TSPE4.C2	arpAgpE	trpA	Filogrupo
Bovino	L03V15	+	-	+	-	x	-	A
Bovino	L03V16	+	-	+	-	x	-	A
Bovino	L03V17	+	-	+	-	x	-	A
Bovino	L03V18	+	-	+	-	x	-	A
Bovino	L03V19	+	-	+	-	x	-	A
Bovino	L03V20	+	-	-	-	x	x	A
Bovino	L04V1	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L04V2	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L04V3	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L04V4	+	-	+	+	x	x	Confirmar MLST
Bovino	L04V6	+	-	+	+	x	x	Confirmar MLST
Bovino	L04V7P5C1	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L04V9P1C2	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L04V12	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L04V13	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L04V14	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L04V15	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L04V16P2C1	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L04V17	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L04V19P2C8	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L04V7P5C3	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L04V9P1C3	+	-	-	+	x	x	B1
Bovino	L04V16P1C3	+	-	+	+	x	x	Confirmar MLST
Galinhas amp	1	+	-	-	+	x	x	A
Galinhas amp	4	+	-	-	+	x	x	A
Galinhas amp	5	+	+	+	-	+	x	E
Galinhas amp	8	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	10	+	-	-	+	x	x	A
Galinhas amp	12	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	15	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	19	+	-	-	-	x	x	B1
Galinhas amp	20	+	-	+	-	x	-	A
Galinhas amp	21	+	-	-	-	x	x	A
Galinhas amp	23	+	-	-	+	x	x	A
Galinhas amp	24	+	+	+	-	x	-	A
Galinhas amp	25	+	-	-	-	x	x	A
Galinhas amp	26	+	-	-	-	x	x	A
Galinhas amp	27	+	-	+	-	x	-	A
Galinhas amp	28	+	-	+	-	x	-	A
Galinhas amp	29	+	-	-	-	x	x	B1
Galinhas amp	30	+	-	-	+	x	x	B1

CAPÍTULO
ANEXOS

GENES FILOGRUPOS								
Origem	Identificação	arpA	ChuA	yjaA	TSPE4.C2	arpAgpE	trpA	Filogrupo
Galinhas amp	33	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	34	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	37	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	38	+	-	+	+	x	x	Confirmar MLST
Galinhas amp	39	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	40	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	41	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	42	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	43	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	44	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	45	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	46	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	47	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	48	+	+	+	-	+	x	E
Galinhas amp	49	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	51	+	-	-	-	x	x	A
Galinhas amp	53	+	-	+	-	x	-	A
Galinhas amp	54	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas amp	55	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	1	+	+	-	-	-	x	D
Galinhas enro	2	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	4	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	5	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	6	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	8	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	9	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	11	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	12	+	+	-	+	+	x	E
Galinhas enro	14	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	15	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	16	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	17	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	18	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	19	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	20	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	21	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	22	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	23 A	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	25	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	26	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	27	+	-	-	+	x	x	B1

CAPÍTULO
ANEXOS

GENES FILOGRUPOS								
Origem	Identificação	arpA	ChuA	yjaA	TSPE4.C2	arpAgpE	trpA	Filogrupo
Galinhas enro	28	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	29	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	32	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	33	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	34	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	35	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	36	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	37	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	39	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	41	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	42	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	43	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	44	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	46	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	47	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	50	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	51	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	59	+	-	+	-		-	A
Galinhas enro	60	+	-	-	+	x	x	B1
Galinhas enro	61	+	-	-	-	x	x	A

CAPÍTULO
ANEXOS

ANEXO C- Medições dos halos de inibição para os diferentes antimicrobianos em estudo, conforme as duas entidades (EUCAST e CLSI)

Origem	Identificação	AMP (E)	AMP (C)	AZM	COX (E)	CZD (E)	NA (C)	CIP (E)	CIP (C)	CHL (E)	CHL (C)	GMN (E)	GMN (C)	MEM (E)	MEM (C)	S (C)	TE (C)	TRM (E)	TRM (C)
Bovino	L01V1	23 S	23 S	27 S	29 S	27 S	31 S	43 S	43 S	31 S	31 S	19 S	19 S	39 S	39 S	26 S	25 S	27 S	27 S
Bovino	L01V3	22 S	22 S	37 S	33 S	30 S	0 R	0 R	0 R	11 R	11 R	13 R	13 I	41 S	41 S	0 R	8 R	0 R	0 R
Bovino	L01V4	24 S	24 S	29 S	31 S	28 S	25 S	45 S	45 S	32 S	32 S	18 S	18 S	35 S	35 S	25 S	25 S	23 S	23 S
Bovino	L01V6	0 R	0 R	31 S	33 S	30 S	28 S	39 S	39 S	31 S	31 S	20 S	20 S	39 S	39 S	0 R	0 R	31 S	31 S
Bovino	L01V7	29 S	29 S	33 S	33 S	33 S	31 S	45 S	45 S	33 S	33 S	20 S	20 S	37 S	37 S	0 R	0 R	33 S	33 S
Bovino	L01V8	0 R	0 R	19 S	21 S	29 S	28 S	43 S	43 S	35 S	35 S	20 S	20 S	39 S	39 S	0 R	14 I	33 S	33 S
Bovino	L01V9	27 S	27 S	31 S	33 S	31 S	25 S	45 S	45 S	31 S	31 S	20 S	20 S	33 S	33 S	23 S	25 S	31 S	31 S
Bovino	L01V10	28 S	28 S	24 S	29 S	31 S	33 S	45 S	45 S	37 S	37 S	18 S	18 S	35 S	35 S	23 S	28 S	31 S	31 S
Bovino	L01V11	29 S	29 S	25 S	31 S	31 S	33 S	51 S	51 S	33 S	33 S	18 S	18 S	35 S	35 S	24 S	28 S	27 S	27 S
Bovino	L01V12	24 S	24 S	31 S	31 S	28 S	29 S	43 S	43 S	29 S	29 S	18 S	18 S	41 S	41 S	15 I	25 S	27 S	27 S
Bovino	L01V13	22 S	22 S	26 S	25 S	23 S	24 S	34 S	34 S	25 S	25 S	16 R	16 S	36 S	36 S	20 S	22 S	29 S	29 S
Bovino	L01V17	24 S	24 S	28 S	26 S	27 S	27 S	42 S	42 S	25 S	25 S	16 R	16 S	35 S	35 S	28 S	24 S	29 S	29 S
Bovino	L01V18	0 R	0 R	26 S	24 S	24 S	24 S	36 S	36 S	29 S	29 S	16 R	16 S	34 S	34 S	0 R	9 R	26 S	26 S
Bovino	L01V20	23 S	23 S	23 S	27 S	25 S	24 S	35 S	35 S	26 S	26 S	15 R	15 I	34 S	34 S	22 S	22 S	29 S	29 S
Bovino	L02V1P5C4	0 R	0 R	30 S	28 S	28 S	29 S	38 S	38 S	28 S	28 S	16 R	16 S	36 S	36 S	21 S	0 R	34 S	34 S
Bovino	L02V2C2	44 S	44 S	0 R	22 S	13 R	0 R	30 S	30 S	26 S	26 S	20 S	20 S	34 S	34 S	32 S	22 S	23 S	23 S
Bovino	L02V7	25 S	25 S	24 S	32 S	29 S	27 S	36 S	36 S	32 S	32 S	16 R	16 S	35 S	35 S	16 I	21 S	32 S	32 S
Bovino	L02V8	23 S	23 S	22 S	30 S	25 S	27 S	36 S	36 S	28 S	28 S	15 R	15 I	34 S	34 S	22 S	23 S	30 S	30 S
Bovino	L02V11P1	22 S	22 S	24 S	29 S	26 S	26 S	34 S	34 S	28 S	28 S	16 R	16 S	32 S	32 S	24 S	24 S	29 S	29 S
Bovino	L02V13	0 R	0 R	27 S	28 S	30 S	31 S	34 S	34 S	26 S	26 S	15 R	15 I	34 S	34 S	18 S	0 R	30 S	30 S
Bovino	L02V14P3C3	21 S	21 S	22 S	22 S	23 S	28 S	34 S	34 S	30 S	30 S	16 R	16 S	32 S	32 S	19 S	23 S	27 S	27 S

CAPÍTULO
ANEXOS

Origem	Identificação	AMP (E)	AMP (C)	AZM	COX (E)	CZD (E)	NA (C)	CIP (E)	CIP (C)	CHL (E)	CHL (C)	GMN (E)	GMN (C)	MEM (E)	MEM (C)	S (C)	TE (C)	TRM (E)	TRM (C)
Bovino	L02V15P5C6	21 S	21 S	22 S	25 S	24 S	22 S	40 S	40 S	26 S	26 S	14 R	14 I	37 S	37 S	24 S	22 S	27 S	27 S
Bovino	L02V17	0 R	0 R	22 S	0 R	18 R	21 S	28 S	28 S	0 R	0 R	21 S	21 S	34 S	34 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Bovino	L02V18	0 R	0 R	24 S	26 S	27 S	24 S	38 S	38 S	32 S	32 S	21 S	21 S	32 S	32 S	30 S	0 R	32 S	32 S
Bovino	L02V20P1C6	0 R	0 R	30 S	28 S	29 S	16 I	26 S	26 S	34 S	34 S	21 S	21 S	36 S	36 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Bovino	L03V1	24 S	24 S	28 S	28 S	26 S	24 S	32 S	32 S	26 S	26 S	16 R	16 S	38 S	38 S	21 S	19 S	28 S	28 S
Bovino	L03V2	21 S	21 S	25 S	26 S	26 S	23 S	40 S	40 S	26 S	26 S	16 R	16 S	32 S	32 S	23 S	21 S	21 S	21 S
Bovino	L03V3	24 S	24 S	29 S	28 S	27 S	25 S	36 S	36 S	27 S	27 S	16 R	16 S	36 S	36 S	25 S	22 S	24 S	24 S
Bovino	L03V4	0 R	0 R	26 S	27 S	27 S	18 I	36 S	36 S	0 R	0 R	16 R	16 S	34 S	34 S	0 R	0 R	24 S	24 S
Bovino	L03V5	24 S	24 S	26 S	30 S	28 S	26 S	31 S	31 S	27 S	27 S	16 R	16 S	30 S	30 S	22 S	21 S	22 S	22 S
Bovino	L03V6	23 S	23 S	24 S	26 S	25 S	21 S	30 S	30 S	26 S	26 S	16 R	16 S	25 S	25 S	15 I	13 I	23 S	23 S
Bovino	L03V7PIC9	25 S	25 S	28 S	30 S	29 S	26 S	30 S	30 S	26 S	26 S	16 R	16 S	34 S	34 S	21 S	22 S	23 S	23 S
Bovino	L03V8	24 S	24 S	28 S	29 S	25 S	27 S	34 S	34 S	27 S	27 S	15 R	15 I	40 S	40 S	22 S	23 S	24 S	24 S
Bovino	L03V9	23 S	23 S	18 S	30 S	27 S	22 S	46 S	46 S	28 S	28 S	16 R	16 S	34 S	34 S	25 S	19 S	20 S	20 S
Bovino	L03V11	23 S	23 S	18 S	31 S	30 S	24 S	32 S	32 S	27 S	27 S	16 R	16 S	34 S	34 S	26 S	16 S	24 S	24 S
Bovino	L03V12	24 S	24 S	26 S	31 S	29 S	25 S	30 S	30 S	26 S	26 S	16 R	16 S	38 S	38 S	20 S	21 S	28 S	28 S
Bovino	L03V13	0 R	0 R	22 S	30 S	27 S	26 S	36 S	36 S	33 S	33 S	9 R	9 R	34 S	34 S	25 S	25 S	29 S	29 S
Bovino	L03V14	22 S	22 S	26 S	27 S	27 S	26 S	32 S	32 S	28 S	28 S	16 R	16 S	34 S	34 S	0 R	0 R	29 S	29 S
Bovino	L03V15	23 S	23 S	24 S	28 S	27 S	28 S	36 S	36 S	30 S	30 S	17 S	17 S	36 S	36 S	20 S	22 S	29 S	29 S
Bovino	L03V16	23 S	23 S	24 S	27 S	26 S	25 S	30 S	30 S	27 S	27 S	15 R	15 I	39 S	39 S	22 S	21 S	23 S	23 S
Bovino	L03V17	24 S	24 S	24 S	26 S	26 S	26 S	36 S	36 S	28 S	28 S	16 R	16 S	26 S	26 S	24 S	21 S	24 S	24 S
Bovino	L03V18	23 S	23 S	23 S	27 S	25 S	27 S	36 S	36 S	30 S	30 S	15 R	15 I	37 S	37 S	23 S	22 S	24 S	24 S
Bovino	L03V19	0 R	0 R	26 S	30 S	28 S	21 S	34 S	34 S	26 S	26 S	7 R	7 R	38 S	38 S	23 S	23 S	26 S	26 S
Bovino	L03V20	21 S	21 S	28 S	28 S	25 S	23 S	38 S	38 S	29 S	29 S	15 R	15 I	28 S	28 S	21 S	21 S	20 S	20 S
Bovino	L04V1	24 S	24 S	22 S	29 S	27 S	21 S	34 S	34 S	26 S	26 S	13 R	13 I	32 S	32 S	25 S	22 S	27 S	27 S
Bovino	L04V2	22 S	22 S	23 S	28 S	27 S	25 S	29 S	29 S	26 S	26 S	14 R	16 S	34 S	34 S	28 S	24 S	27 S	27 S

CAPÍTULO
ANEXOS

Origem	Identificação	AMP (E)	AMP (C)	AZM	COX (E)	CZD (E)	NA (C)	CIP (E)	CIP (C)	CHL (E)	CHL (C)	GMN (E)	GMN (C)	MEM (E)	MEM (C)	S (C)	TE (C)	TRM (E)	TRM (C)
Bovino	L04V3	21 S	21 S	20 S	26 S	26 S	25 S	30 S	30 S	29 S	29 S	16 R	16 S	34 S	34 S	25 S	21 S	25 S	25 S
Bovino	L04V4	24 S	24 S	27 S	30 S	29 S	25 S	34 S	34 S	32 S	32 S	15 R	15 I	30 S	30 S	0 R	21 S	0 R	0 R
Bovino	L04V6	24 S	24 S	24 S	30 S	28 S	30 S	34 S	34 S	26 S	26 S	17 S	17 S	34 S	34 S	0 R	25 S	0 R	0 R
Bovino	L04V7P5C1	22 S	22 S	30 S	31 S	29 S	30 S	40 S	40 S	29 S	29 S	16 R	16 S	30 S	30 S	25 S	22 S	29 S	29 S
Bovino	L04V9P1C2	24 S	24 S	25 S	32 S	30 S	28 S	42 S	42 S	32 S	32 S	20 S	20 S	40 S	40 S	26 S	26 S	32 S	32 S
Bovino	L04V12	20 S	20 S	26 S	28 S	26 S	24 S	35 S	35 S	30 S	30 S	16 R	16 S	40 S	40 S	21 S	25 S	26 S	26 S
Bovino	L04V13	18 S	18 S	14S	25 S	24 S	27 S	34 S	34 S	28 S	28 S	15 R	15 I	34 S	34 S	24 S	21 S	26 S	26 S
Bovino	L04V14	21 S	21 S	21 S	30 S	29 S	23 S	28 S	28 S	25 S	25 S	14 R	14 I	32 S	32 S	27 S	21 S	24 S	24 S
Bovino	L04V15	22 S	22 S	16 S	28 S	27 S	26 S	32 S	32 S	26 S	26 S	16 R	16 S	28 S	28 S	24 S	14 I	24 S	24 S
Bovino	L04V16P2C1	24 S	24 S	25 S	28 S	28 S	26 S	38 S	38 S	25 S	25 S	15 R	15 I	36 S	36 S	0 R	0 R	28 S	28 S
Bovino	L04V17	24 S	24 S	19 S	29 S	28 S	27 S	42 S	42 S	29 S	29 S	19 S	19 S	34 S	34 S	24 S	24 S	27 S	27 S
Bovino	L04V19P2C8	21 S	21 S	26 S	27 S	27 S	27 S	40 S	40 S	30 S	30 S	20 S	20 S	34 S	34 S	23 S	23 S	26 S	26 S
Bovino	L04V7P5C3	21 S	21 S	24 S	29 S	29 S	28 S	38 S	38 S	30 S	30 S	17 S	17 S	30 S	30 S	21 S	21 S	30 S	30 S
Bovino	L04V9P1C3	20 S	20 S	22 S	26 S	26 S	30 S	40 S	40 S	28 S	28 S	17 S	17 S	32 S	32 S	22 S	22 S	26 S	26 S
Bovino	L04V16P1C3	17 S	17 S	16 S	23 S	20 I	29 S	40 S	40 S	27 S	27 S	16 R	16 S	35 S	35 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas amp	1	0 R	0 R	19 S	31 S	31 S	26 S	36 S	36 S	27 S	27 S	22 S	22 S	32 S	32 S	14 I	27 S	26 S	26 S
Galinhas amp	4	0 R	0 R	13 S	30 S	28 S	29 S	27 S	27 S	27 S	27 S	24 S	24 S	36 S	36 S	26 S	0 R	23 S	23 S
Galinhas amp	5	0 R	0 R	23 S	31 S	20 I	0 R	14 R	14 R	27 S	27 S	22 S	22 S	34 S	34 S	0 R	9 R	0 R	0 R
Galinhas amp	8	0 R	0 R	25 S	33 S	29 S	0 R	28 S	28 S	12 R	12 R	22 S	22 S	32 S	32 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas amp	10	0 R	0 R	20 S	30 S	29 S	24 S	29 S	29 S	22 S	22 S	21 S	21 S	30 S	30 S	24 S	25 S	23 S	23 S
Galinhas amp	12	0 R	0 R	20 S	29 S	28 S	25 S	32 S	32 S	27 S	27 S	21 S	21 S	32 S	32 S	26 S	0 R	24 S	24 S
Galinhas amp	15	0 R	0 R	20 S	30 S	20 I	20 S	27 S	27 S	28 S	28 S	25 S	25 S	34 S	34 S	27 S	0 R	25 S	25 S
Galinhas amp	19	0 R	0 R	18 S	29 S	24 S	0 R	13 R	13 R	25 S	25 S	23 S	23 S	35 S	35 S	20 S	0 R	0 R	0 R
Galinhas amp	20	0 R	0 R	14 S	20 S	28 S	26 S	30 S	30 S	23 S	23 S	20 S	20 S	34 S	34 S	25 S	0 R	0 R	0 R
Galinhas amp	21	0 R	0 R	18 S	29 S	30 S	0 R	32 S	32 S	21 S	21 S	21 S	21 S	30 S	30 S	19 S	0 R	20 S	20 S

CAPÍTULO
ANEXOS

Origem	Identificação	AMP (E)	AMP (C)	AZM	COX (E)	CZD (E)	NA (C)	CIP (E)	CIP (C)	CHL (E)	CHL (C)	GMN (E)	GMN (C)	MEM (E)	MEM (C)	S (C)	TE (C)	TRM (E)	TRM (C)
Galinhas amp	23	0 R	0 R	18 S	25 S	24 S	24 S	30 S	30 S	24 S	24 S	20 S	20 S	31 S	31 S	24 S	23 S	22 S	22 S
Galinhas amp	24	0 R	0 R	20 S	32 S	30 S	22 S	28 S	28 S	25 S	25 S	21 S	21 S	34 S	34 S	0 R	9 R	23 S	23 S
Galinhas amp	25	0 R	0 R	17 S	26 S	27 S	0 R	26 S	26 S	22 S	22 S	20 S	20 S	29 S	29 S	22 S	0 R	21 S	21 S
Galinhas amp	26	0 R	0 R	18 S	29 S	26 S	13 R	25 S	25 I	23 S	23 S	21 S	21 S	34 S	34 S	26 S	26 S	22 S	22 S
Galinhas amp	27	0 R	0 R	20 S	30 S	28 S	27 S	32 S	32 S	24 S	24 S	21 S	21 S	36 S	36 S	25 S	8 R	0 R	0 R
Galinhas amp	28	0 R	0 R	18 S	30 S	29 S	20 S	36 S	36 S	25 S	25 S	20 S	20 S	34 S	34 S	23 S	7 R	0 R	0 R
Galinhas amp	29	0 R	0 R	17 S	30 S	27 S	25 S	28 S	28 S	22 S	22 S	21 S	21 S	30 S	30 S	21 S	27 S	22 S	22 S
Galinhas amp	30	0 R	0 R	17 S	28 S	26 S	27 S	32 S	32 S	25 S	25 S	20 S	20 S	33 S	33 S	19 S	0 R	24 S	24 S
Galinhas amp	33	0 R	0 R	20 S	28 S	30 S	21 S	20 R	20 R	28 S	28 S	24 S	24 S	36 S	36 S	27 S	0 R	22 S	22 S
Galinhas amp	34	0 R	0 R	19 S	26 S	26 S	0 R	12 R	12 R	11 R	11 R	21 S	21 S	34 S	34 S	0 R	5 R	22 S	22 S
Galinhas amp	37	0 R	0 R	17 S	30 S	29 S	0 R	27 S	27 S	12 R	12 R	22 S	22 S	37 S	37 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas amp	38	0 R	0 R	19 S	27 S	27 S	26 S	33 S	33 S	25 S	25 S	20 S	20 S	34 S	34 S	25 S	24 S	22 S	22 S
Galinhas amp	39	0 R	0 R	17 S	30 S	29 S	20 S	25 S	25 I	27 S	27 S	21 S	21 S	34 S	34 S	25 S	29 S	26 S	26 S
Galinhas amp	40	0 R	0 R	17 S	32 S	29 S	26 S	32 S	32 S	25 S	25 S	23 S	23 S	30 S	30 S	20 S	0 R	22 S	22 S
Galinhas amp	41	0 R	0 R	18 S	31 S	28 S	20 S	25 S	25 I	11 R	11 R	23 S	23 S	28 S	28 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas amp	42	0 R	0 R	17 S	30 S	26 S	18 I	25 S	25 I	21 S	21 S	22 S	22 S	32 S	32 S	0 R	24 S	20 S	20 S
Galinhas amp	43	0 R	0 R	19 S	29 S	28 S	0 R	25 S	25 I	25 S	25 S	21 S	21 S	32 S	32 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas amp	44	0 R	0 R	17 S	31 S	30 S	21 S	27 S	27 S	26 S	26 S	21 S	21 S	34 S	34 S	22 S	25 S	26 S	26 S
Galinhas amp	45	0 R	0 R	20 S	30 S	30 S	30 S	35 S	35 S	13 R	13 I	12 R	12 R	32 S	32 S	0 R	0 R	22 S	22 S
Galinhas amp	46	0 R	0 R	20 S	30 S	24 S	27 S	30 S	30 S	29 S	29 S	0 R	0 R	34 S	34 S	20 S	26 S	25 S	25 S
Galinhas amp	47	0 R	0 R	20 S	30 S	29 S	0 R	14 R	14 R	20 S	20 S	20 S	20 S	30 S	30 S	29 S	26 S	28 S	28 S
Galinhas amp	48	0 R	0 R	18 S	32 S	30 S	25 S	31 S	31 S	23 S	23 S	21 S	21 S	30 S	30 S	22 S	25 S	26 S	26 S
Galinhas amp	49	0 R	0 R	17 S	30 S	29 S	22 S	27 S	27 S	12 R	12 R	21 S	21 S	30 S	30 S	0 R	30 S	29 S	29 S
Galinhas amp	51	0 R	0 R	18 S	29 S	28 S	20 S	25 S	25 I	29 S	29 S	22 S	22 S	32 S	32 S	23 S	25 S	30 S	30 S
Galinhas amp	53	0 R	0 R	17 S	27 S	27 S	25 S	30 S	30 S	23 S	23 S	21 S	21 S	32 S	32 S	28 S	9 R	29 S	29 S

CAPÍTULO
ANEXOS

Origem	Identificação	AMP (E)	AMP (C)	AZM	COX (E)	CZD (E)	NA (C)	CIP (E)	CIP (C)	CHL (E)	CHL (C)	GMN (E)	GMN (C)	MEM (E)	MEM (C)	S (C)	TE (C)	TRM (E)	TRM (C)
Galinhas amp	54	0 R	0 R	18 S	29 S	28 S	24 S	32 S	32 S	30 S	30 S	28 S	28 S	32 S	32 S	25 S	11 R	27 S	27 S
Galinhas amp	55	0 R	0 R	16 S	29 S	28 S	24 S	34 S	34 S	25 S	25 S	22 S	22 S	34 S	34 S	0 R	24 S	27 S	27 S
Galinhas enro	1	23 S	23 S	12 R	29 S	28 S	0 R	0 R	0 R	27 S	27 S	23 S	23 S	34 S	34 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas enro	2	0 R	0 R	12 R	30 S	29 S	0 R	0 R	0 R	30 S	30 S	21 S	21 S	33 S	33 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas enro	4	0 R	0 R	18 S	28 S	28 S	0 R	0 R	0 R	28 S	28 S	22 S	22 S	32 S	32 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas enro	5	0 R	0 R	18 S	30 S	28 S	0 R	0 R	0 R	26 S	26 S	23 S	23 S	32 S	32 S	24 S	0 R	28 S	28 S
Galinhas enro	6	24 S	24 S	11 R	29 S	28 S	0 R	0 R	0 R	29 S	29 S	23 S	23 S	35 S	35 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas enro	8	21 S	21 S	17 S	30 S	29 S	0 R	0 R	0 R	28 S	28 S	21 S	21 S	35 S	35 S	22 S	26 S	24 S	24 S
Galinhas enro	9	23 S	23 S	17 S	30 S	30 S	0 R	0 R	0 R	25 S	25 S	22 S	22 S	33 S	33 S	23 S	24 S	27 S	27 S
Galinhas enro	11	23 S	23 S	17 S	32 S	29 S	0 R	0 R	0 R	29 S	29 S	22 S	22 S	34 S	34 S	0 R	30 S	29 S	29 S
Galinhas enro	12	0 R	0 R	20 S	30 S	26 S	0 R	0 R	0 R	14 R	14 I	12 R	12 R	34 S	34 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas enro	14	21 S	21 S	16 S	29 S	27 S	0 R	0 R	0 R	25 S	25 S	22 S	22 S	32 S	32 S	25 S	25 S	27 S	27 S
Galinhas enro	15	22 S	22 S	16 S	28 S	28 S	0 R	0 R	0 R	25 S	25 S	22 S	22 S	34 S	34 S	26 S	25 S	27 S	27 S
Galinhas enro	16	0 R	0 R	17 S	30 S	28 S	0 R	0 R	0 R	11 R	11 R	22 S	22 S	32 S	32 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas enro	17	0 R	0 R	18 S	30 S	28 S	0 R	0 R	0 R	26 S	26 S	20 S	20 S	31 S	31 S	22 S	25 S	26 S	26 S
Galinhas enro	18	22 S	22 S	17 S	29 S	28 S	0 R	0 R	0 R	30 S	30 S	22 S	22 S	33 S	33 S	29 S	25 S	30 S	30 S
Galinhas enro	19	0 R	0 R	18 S	30 S	28 S	0 R	0 R	0 R	22 S	22 S	21 S	21 S	34 S	34 S	0 R	10 R	0 R	0 R
Galinhas enro	20	0 R	0 R	18 S	28 S	27 S	0 R	0 R	0 R	28 S	28 S	22 S	22 S	35 S	35 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas enro	21	0 R	0 R	16 S	27 S	26 S	0 R	0 R	0 R	27 S	27 S	21 S	21 S	30 S	30 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas enro	22	0 R	0 R	16 S	28 S	26 S	0 R	0 R	0 R	24 S	24 S	21 S	21 S	31 S	31 S	23 S	0 R	24 S	24 S
Galinhas enro	23 A	21 S	21 S	26 S	27 S	26 S	0 R	0 R	0 R	27 S	27 S	17 S	17 S	36 S	36 S	20 S	22 S	25 S	25 S
Galinhas enro	25	0 R	0 R	15 S	30 S	28 S	0 R	0 R	0 R	29 S	29 S	21 S	21 S	33 S	33 S	0 R	0 R	25 S	25 S
Galinhas enro	26	0 R	0 R	16 S	29 S	26 S	0 R	0 R	0 R	28 S	28 S	22 S	22 S	30 S	30 S	0 R	0 R	24 S	24 S
Galinhas enro	27	0 R	0 R	19 S	30 S	31 S	0 R	0 R	0 R	27 S	27 S	21 S	21 S	32 S	32 S	0 R	0 R	26 S	26 S
Galinhas enro	28	0 R	0 R	18 S	31 S	29 S	0 R	0 R	0 R	26 S	26 S	23 S	23 S	31 S	31 S	0 R	0 R	27 S	27 S

CAPÍTULO
ANEXOS

Origem	Identificação	AMP (E)	AMP (C)	AZM	COX (E)	CZD (E)	NA (C)	CIP (E)	CIP (C)	CHL (E)	CHL (C)	GMN (E)	GMN (C)	MEM (E)	MEM (C)	S (C)	TE (C)	TRM (E)	TRM (C)
Galinhas enro	29	9 R	9 R	20 S	30 S	21 I	0 R	0 R	0 R	34 S	34 S	22 S	22 S	34 S	34 S	26 S	10 R	28 S	28 S
Galinhas enro	32	24 S	24 S	17 S	31 S	29 S	0 R	0 R	0 R	26 S	26 S	23 S	23 S	35 S	35 S	24 S	26 S	29 S	29 S
Galinhas enro	33	25 S	25 S	17 S	29 S	28 S	0 R	0 R	0 R	27 S	27 S	21 S	21 S	37 S	37 S	0 R	0 R	27 S	27 S
Galinhas enro	34	0 R	0 R	20 S	30 S	29 S	0 R	0 R	0 R	16 R	16 I	23 S	23 S	34 S	34 S	0 R	0 R	28 S	28 S
Galinhas enro	35	0 R	0 R	20 S	30 S	29 S	0 R	0 R	0 R	22 S	22 S	20 S	20 S	34 S	34 S	0 R	10 R	0 R	0 R
Galinhas enro	36	0 R	0 R	17 S	29 S	29 S	0 R	0 R	0 R	29 S	29 S	23 S	23 S	34 S	34 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas enro	37	24 S	24 S	18 S	25 S	26 S	0 R	0 R	0 R	25 S	25 S	22 S	22 S	33 S	33 S	28 S	27 S	25 S	25 S
Galinhas enro	39	0 R	0 R	16 S	30 S	28 S	0 R	0 R	0 R	29 S	29 S	21 S	21 S	34 S	34 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas enro	41	0 R	0 R	17 S	30 S	30 S	0 R	0 R	0 R	30 S	30 S	22 S	22 S	32 S	32 S	22 S	27 S	28 S	28 S
Galinhas enro	42	0 R	0 R	17 S	29 S	28 S	0 R	0 R	0 R	26 S	26 S	21 S	21 S	31 S	31 S	0 R	0 R	0 R	0 R
Galinhas enro	43	4 R	4 R	18 S	31 S	29 S	0 R	0 R	0 R	29 S	29 S	21 S	21 S	31 S	31 S	0 R	9 R	25 S	25 S
Galinhas enro	44	0 R	0 R	15 S	30 S	29 S	0 R	0 R	0 R	28 S	28 S	22 S	22 S	35 S	35 S	0 R	9 R	0 R	0 R
Galinhas enro	46	22 S	22 S	16 S	30 S	28 S	0 R	0 R	0 R	25 S	25 S	20 S	20 S	33 S	33 S	26 S	27 S	28 S	28 S
Galinhas enro	47	0 R	0 R	16 S	30 S	29 S	0 R	0 R	0 R	30 S	30 S	22 S	22 S	34 S	34 S	0 R	10 R	0 R	0 R
Galinhas enro	50	23 S	23 S	20 S	30 S	28 S	0 R	0 R	0 R	25 S	25 S	21 S	21 S	32 S	32 S	25 S	27 S	26 S	26 S
Galinhas enro	51	0 R	0 R	17 S	29 S	27 S	0 R	0 R	0 R	25 S	25 S	20 S	20 S	34 S	34 S	23 S	0 R	27 S	27 S
Galinhas enro	59	0 R	0 R	20 S	31 S	28 S	0 R	0 R	0 R	27 S	27 S	22 S	22 S	32 S	32 S	24 S	0 R	0 R	0 R
Galinhas enro	60	29 S	29 S	18 S	34 S	32 S	0 R	0 R	0 R	20 S	20 S	22 S	22 S	35 S	35 S	26 S	25 S	28 S	28 S
Galinhas enro	61	0 R	0 R	17 S	30 S	29 S	0 R	0 R	0 R	27 S	27 S	21 S	21 S	34 S	34 S	27 S	30 S	29 S	29 S

CAPÍTULO
ANEXOS

ANEXO D- Suscetibilidade ou Resistência dos isolados faces as categorias estabelecidas para a detecção de isolados multirresistentes de acordo com a EUCAST

Origem	Identificação	Pen	Mac	Cef	Fluor	Fen	Amin	Carb	S	T	Piri	Nº resistências
Bovino	L01V1											0
Bovino	L01V3											5
Bovino	L01V4											0
Bovino	L01V6											3
Bovino	L01V7											2
Bovino	L01V8											3
Bovino	L01V9											0
Bovino	L01V10											0
Bovino	L01V11											0
Bovino	L01V12											1
Bovino	L01V13											1
Bovino	L01V17											1
Bovino	L01V18											4
Bovino	L01V20											2
Bovino	L02V1P5C4											3
Bovino	L02V2C2											3
Bovino	L02V7											2
Bovino	L02V8											1
Bovino	L02V11P1											1
Bovino	L02V13											3
Bovino	L02V14P3C3											1
Bovino	L02V15P5C6											1
Bovino	L02V17											5
Bovino	L02V18											2

CAPÍTULO
ANEXOS

Origem	Identificação	Pen	Mac	Cef	Fluor	Fen	Amin	Carb	S	T	Piri	Nº resistências
Bovino	L02V20P1C6											5
Bovino	L03V1											1
Bovino	L03V2											1
Bovino	L03V3											1
Bovino	L03V4											6
Bovino	L03V5											1
Bovino	L03V6											3
Bovino	L03V7PIC9											1
Bovino	L03V8											1
Bovino	L03V9											1
Bovino	L03V11											1
Bovino	L03V12											1
Bovino	L03V13											1
Bovino	L03V14											4
Bovino	L03V15											0
Bovino	L03V16											1
Bovino	L03V17											1
Bovino	L03V18											1
Bovino	L03V19											2
Bovino	L03V20											1
Bovino	L04V1											1
Bovino	L04V2											1
Bovino	L04V3											1
Bovino	L04V4											3
Bovino	L04V6											2
Bovino	L04V7P5C1											1
Bovino	L04V9P1C2											0
Bovino	L04V12											1
Bovino	L04V13											1

CAPÍTULO
ANEXOS

Origem	Identificação	Pen	Mac	Cef	Fluor	Fen	Amin	Carb	S	T	Piri	Nº resistências
Bovino	L04V14											1
Bovino	L04V15											2
Bovino	L04V16P2C1											3
Bovino	L04V17											0
Bovino	L04V19P2C8											0
Bovino	L04V7P5C3											0
Bovino	L04V9P1C3											0
Bovino	L04V16P1C3											5
Galinhas amp	1											2
Galinhas amp	4											2
Galinhas amp	5											6
Galinhas amp	8											6
Galinhas amp	10											1
Galinhas amp	12											2
Galinhas amp	15											3
Galinhas amp	19											4
Galinhas amp	20											3
Galinhas amp	21											3
Galinhas amp	23											1
Galinhas amp	24											3
Galinhas amp	25											3
Galinhas amp	26											2
Galinhas amp	27											3
Galinhas amp	28											3
Galinhas amp	29											1
Galinhas amp	30											2
Galinhas amp	33											3
Galinhas amp	34											5
Galinhas amp	37											6

CAPÍTULO
ANEXOS

Origem	Identificação	Pen	Mac	Cef	Fluor	Fen	Amin	Carb	S	T	Piri	Nº resistências
Galinhas amp	38											1
Galinhas amp	39											1
Galinhas amp	40											2
Galinhas amp	41											5
Galinhas amp	42											3
Galinhas amp	43											5
Galinhas amp	44											1
Galinhas amp	45											5
Galinhas amp	46											2
Galinhas amp	47											2
Galinhas amp	48											1
Galinhas amp	49											3
Galinhas amp	51											1
Galinhas amp	53											2
Galinhas amp	54											2
Galinhas amp	55											2
Galinhas enro	1											5
Galinhas enro	2											6
Galinhas enro	4											5
Galinhas enro	5											3
Galinhas enro	6											5
Galinhas enro	8											1
Galinhas enro	9											1
Galinhas enro	11											2
Galinhas enro	12											7
Galinhas enro	14											1
Galinhas enro	15											1
Galinhas enro	16											6
Galinhas enro	17											2

CAPÍTULO
ANEXOS

Origem	Identificação	Pen	Mac	Cef	Fluor	Fen	Amin	Carb	S	T	Piri	Nº resistências
Galinhas enro	18											2
Galinhas enro	19											5
Galinhas enro	20											5
Galinhas enro	21											5
Galinhas enro	22											3
Galinhas enro	23 A											1
Galinhas enro	25											4
Galinhas enro	26											4
Galinhas enro	27											4
Galinhas enro	28											4
Galinhas enro	29											4
Galinhas enro	32											1
Galinhas enro	33											3
Galinhas enro	34											5
Galinhas enro	35											5
Galinhas enro	36											5
Galinhas enro	37											1
Galinhas enro	39											5
Galinhas enro	41											2
Galinhas enro	42											5
Galinhas enro	43											4
Galinhas enro	44											5
Galinhas enro	46											1
Galinhas enro	47											5
Galinhas enro	50											1
Galinhas enro	51											3
Galinhas enro	59											4
Galinhas enro	60											1
Galinhas enro	61											2

CAPÍTULO
ANEXOS

ANEXO E- Suscetibilidade ou Resistência dos isolados faces as categorias estabelecidas para a detecção de isolados multirresistentes de acordo com a CLSI

Origem	Identificação	Pen	Mac	Cef	Fluor	Fen	Amin	Carb	Sul	Tet	Piri	Nº resistências
Bovino	L01V1											0
Bovino	L01V3											6
Bovino	L01V4											0
Bovino	L01V6											3
Bovino	L01V7											2
Bovino	L01V8											3
Bovino	L01V9											0
Bovino	L01V10											0
Bovino	L01V11											0
Bovino	L01V12											1
Bovino	L01V13											0
Bovino	L01V17											0
Bovino	L01V18											3
Bovino	L01V20											1
Bovino	L02V1P5C4											2
Bovino	L02V2C2											3
Bovino	L02V7											1
Bovino	L02V8											1
Bovino	L02V11P1											0
Bovino	L02V13											3
Bovino	L02V14P3C3											0
Bovino	L02V15P5C6											1
Bovino	L02V17											6
Bovino	L02V18											2

CAPÍTULO
ANEXOS

Origem	Identificação	Pen	Mac	Cef	Fluor	Fen	Amin	Carb	Sul	Tet	Piri	Nº resistências
Bovino	L02V20P1C6											5
Bovino	L03V1											0
Bovino	L03V2											0
Bovino	L03V3											0
Bovino	L03V4											5
Bovino	L03V5											0
Bovino	L03V6											2
Bovino	L03V7PIC9											0
Bovino	L03V8											1
Bovino	L03V9											0
Bovino	L03V11											0
Bovino	L03V12											0
Bovino	L03V13											2
Bovino	L03V14											2
Bovino	L03V15											0
Bovino	L03V16											1
Bovino	L03V17											0
Bovino	L03V18											1
Bovino	L03V19											2
Bovino	L03V20											1
Bovino	L04V1											1
Bovino	L04V2											0
Bovino	L04V3											0
Bovino	L04V4											3
Bovino	L04V6											2
Bovino	L04V7P5C1											0
Bovino	L04V9P1C2											0
Bovino	L04V12											0

CAPÍTULO
ANEXOS

Origem	Identificação	Pen	Mac	Cef	Fluor	Fen	Amin	Carb	Sul	Tet	Piri	Nº resistências
Bovino	L04V13											1
Bovino	L04V14											1
Bovino	L04V15											1
Bovino	L04V16P2C1											3
Bovino	L04V17											0
Bovino	L04V19P2C8											0
Bovino	L04V7P5C3											0
Bovino	L04V9P1C3											0
Bovino	L04V16P1C3											4
Galinhas amp	1											2
Galinhas amp	4											2
Galinhas amp	5											6
Galinhas amp	8											6
Galinhas amp	10											1
Galinhas amp	12											2
Galinhas amp	15											3
Galinhas amp	19											4
Galinhas amp	20											3
Galinhas amp	21											3
Galinhas amp	23											1
Galinhas amp	24											3
Galinhas amp	25											3
Galinhas amp	26											2
Galinhas amp	27											3
Galinhas amp	28											3
Galinhas amp	29											1
Galinhas amp	30											2
Galinhas amp	33											2

CAPÍTULO
ANEXOS

Origem	Identificação	Pen	Mac	Cef	Fluor	Fen	Amin	Carb	Sul	Tet	Piri	Nº resistências
Galinhas amp	34											5
Galinhas amp	37											6
Galinhas amp	38											1
Galinhas amp	39											1
Galinhas amp	40											2
Galinhas amp	41											5
Galinhas amp	42											3
Galinhas amp	43											5
Galinhas amp	44											1
Galinhas amp	45											5
Galinhas amp	46											2
Galinhas amp	47											2
Galinhas amp	48											1
Galinhas amp	49											3
Galinhas amp	51											1
Galinhas amp	53											2
Galinhas amp	54											2
Galinhas amp	55											2
Galinhas enro	1											5
Galinhas enro	2											5
Galinhas enro	4											5
Galinhas enro	5											3
Galinhas enro	6											5
Galinhas enro	8											1
Galinhas enro	9											1
Galinhas enro	11											2
Galinhas enro	12											7
Galinhas enro	14											1

CAPÍTULO
ANEXOS

Origem	Identificação	Pen	Mac	Cef	Fluor	Fen	Amin	Carb	Sul	Tet	Piri	Nº resistências
Galinhas enro	15											1
Galinhas enro	16											6
Galinhas enro	17											2
Galinhas enro	18											1
Galinhas enro	19											5
Galinhas enro	20											5
Galinhas enro	21											5
Galinhas enro	22											3
Galinhas enro	23 A											1
Galinhas enro	25											4
Galinhas enro	26											4
Galinhas enro	27											4
Galinhas enro	28											4
Galinhas enro	29											4
Galinhas enro	32											1
Galinhas enro	33											3
Galinhas enro	34											5
Galinhas enro	35											5
Galinhas enro	36											5
Galinhas enro	37											1
Galinhas enro	39											5
Galinhas enro	41											2
Galinhas enro	42											5
Galinhas enro	43											4
Galinhas enro	44											5
Galinhas enro	46											1
Galinhas enro	47											5
Galinhas enro	50											1

CAPÍTULO
ANEXOS

Origem	Identificação	Pen	Mac	Cef	Fluor	Fen	Amin	Carb	Sul	Tet	Piri	Nº resistências
Galinhas enro	51											3
Galinhas enro	59											4
Galinhas enro	60											1
Galinhas enro	61											2