

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SEGURANÇA ALIMENTAR**

Resistência a antibióticos, factores de virulência e grupos filogenéticos em *Escherichia coli* produtora de β -lactamases de amplo espectro de frangos para consumo.

Manuel Luís Rodrigues da Costa



Vila Real, 2011

Orientador: _____

Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta

(Departamento de Ciências Veterinárias, UTAD)

Co-orientador: _____

Professor Doutor Gilberto Paulo Peixoto Igrejas

(Departamento de Genética e Biotecnologia, UTAD)

Ao meu pai:

Que sempre acreditou nos meus sonhos e na minha capacidade.

Que sempre me apoiou e incentivou.

O meu exemplo de integridade e dignidade.

Agradecimentos

Ao terminar esta dissertação, desejo manifestar o meu verdadeiro reconhecimento pelo auxílio e pelas contribuições de diversas pessoas a quem estou agradecido.

Ao Magnífico Reitor da UTAD, Prof. Doutor Carlos Alberto Sequeira, Reitor da UTAD, pela disponibilidade e facilidades concedidas durante a realização deste trabalho.

À Prof.^a Doutora Patrícia Poeta pela oportunidade, paciência, sentido crítico, dedicação, apoio que sempre demonstrou e, ainda pelos inúmeros ensinamentos e conselhos dados.

Ao Prof. Doutor Gilberto Igrejas por ter aceite ser meu co-orientador, pela disponibilidade que sempre demonstrou e por todo o apoio prestado durante a execução deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho e amigos, em especial à Hajer, Céline, Alex e Miguel, pelo auxílio, palavras de incentivo, momentos de alegria e amizade.

Às Técnicas do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Veterinárias pela ajuda prestada.

À minha família um agradecimento muito especial. Por todo o seu apoio sem limites, por todo o seu amor e carinho, por toda a força, por tudo aquilo que representam...

Finalmente a todos aqueles, que de uma forma directa ou indirecta me incentivaram, apoiaram e ajudaram no decorrer dos trabalhos, o meu muito obrigado.

Resistência a antibióticos, factores de virulência e grupos filogenéticos em *Escherichia coli* produtora de β -lactamases de amplo espectro de frangos para consumo

Resumo

O desenvolvimento da resistência aos antibióticos tem sido reconhecido como um grave problema de Saúde Pública. A comunidade científica reconhece a necessidade de realizar a avaliação da susceptibilidade aos antibióticos em “bactérias indicadoras” (como *Escherichia coli*) de diversas origens, tendo em vista o combate o aumento da resistência antimicrobiana. A microflora bacteriana intestinal dos animais de consumo, assim como os seus produtos constituem ambientes favoráveis para a sobrevivência, transferência e disseminação de bactérias resistentes.

O principal objectivo deste trabalho consistiu em estudar a taxa de resistência a antibióticos em isolados de *E. coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro (BLAE) de carne de frango destinada a consumo humano, detectar factores de virulência e analisar os grupos filogenéticos dos isolados de *E. coli*.

Um total de 29 amostras de frango (6 de asas, 6 de peito, 6 de coxas 5 de moelas e 6 de pele) foram semeadas em Levine não suplementado com cefotaxima e Levine com suplemento de cefotaxima (2 μ g/ml). Testou-se a susceptibilidade a 16 antibióticos (ampicilina; amoxicilina + ácido clavulânico; cefotaxima; cefoxitina; ceftazidima; aztreonam; imipenemo; gentamicina; amicacina; tobramicina; estreptomina; ácido nalidíxico; ciprofloxacina; sulfametoxazol-trimetropim; tetraciclina e cloranfenicol) pelo método da difusão em disco de acordo com as normas do CLSI.

Obtiveram-se 29 isolados (100%) de *E. coli* das placas de Levine não suplementado com cefotaxima e, 27 isolados (93,1%) de *E. coli* das placas de Levine suplementadas. Dos 27 isolados obtidos de placas de Levine suplementado com cefotaxima (2 μ g/ml), verificou-se que 23 dos isolados (85,2%) eram produtores de β -lactamases de amplo espectro (BLAE) e que 4 dos isolados (14,8%) não foram produtores deste tipo de enzimas (negativos para o teste de detecção fenotípica de BLAEs).

Os isolados de *E. coli* obtidos de meios não suplementados com cefotaxima apresentaram uma elevada percentagem de resistência à tetraciclina (72,4%), à

ampicilina, ao ácido nalidíxico (65,5%), ao cloranfenicol, à ciprofloxacina (34,5%), ao sulfametoxazol-trimetropim (27,6%) e à estreptomicina (27,6%).

Dos 23 isolados BLAE, 13 manifestaram a presença do gene *bla*_{TEM-52}, 4 a presença do gene *bla*_{CTX-M-14a}, quatro a presença do gene *bla*_{CTX-M-9} e 2 a presença do gene *bla*_{CTX-M-1}. O gene *tetA* ou *tetB* foi encontrado nos 17 isolados resistentes à tetraciclina. Dos 13 isolados resistentes ao sulfametoxazol-trimetropim, 12 manifestaram a presença do gene *sul2*, 4 a presença do gene *sul1* (os quatro em combinação com o gene *sul2*) e 1 a presença do gene *sul3*. O gene *aadA* foi encontrado em oito dos 11 isolados resistentes à estreptomicina. O gene *aac(3)-II* foi encontrado nos 4 isolados resistentes à gentamicina. No isolado resistente ao cloranfenicol foi detectado o gene *cmlA*. Os genes *gyrA* e *parC* foram amplificados e posteriormente sequenciados nos isolados resistentes às quinolonas. Nos 20 isolados resistentes ao ácido nalidíxico foram identificadas duas alterações aminoacídicas no gene *gyrA* (S83L+D87N). Os 10 isolados resistentes à ciprofloxacina possuíam o gene *parC* com uma mutação no triplete 80 que causa alteração aminoacídica (S80I).

Nos 4 isolados obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima, que evidenciaram resultado negativo para o teste de detecção fenotípica de BLAEs, foram detectadas mutações pontuais na região promotora/atenuadora do gene *ampC* nas posições -42; -18; -1; +58. O gene *aadA* foi encontrado nos 4 isolados resistentes à estreptomicina. Os 4 isolados resistentes ao sulfametoxazol-trimetropim manifestaram o gene *sul1*. O gene *tetA* foi encontrado nos 2 isolados resistentes à tetraciclina. O gene *aac(3)-II* foi encontrado nos 2 isolados resistentes à gentamicina. Nos 2 isolados resistentes ao ácido nalidíxico foram identificadas duas alterações aminoacídicas no gene *gyrA* (S83L+D87N).

Dos 27 isolados provenientes de placas de Levine com suplemento de cefotaxima, a pesquisa de factores de virulência evidenciou a presença do gene *aer* em 74,1% dos isolados, o gene *fimA* em 40,7% e o gene *papC* em 7,4% dos isolados. Detectou-se o gene *intl1* em 8 isolados e o gene *intl2* em 4 isolados. Dos 27 isolados provenientes de placas de Levine com suplemento de cefotaxima, 5 pertenceram ao grupo filogenético A, 11 ao grupo filogenético B1, 3 ao grupo filogenético B2 e 8 ao grupo filogenético D.

Foi nosso intuito caracterizar, em todas as estirpes provenientes de placas de Levine suplementadas com cefotaxima, os mecanismos envolvidos na resistência

fenotípica aos antibióticos, bem como descrever os possíveis elementos de aquisição e disseminação destes genes.

Por último, referir que os dados obtidos neste estudo são importantes para estabelecer políticas de uso prudente de antibióticos em animais de consumo, bem como em humanos. De salientar a importância de continuar estudos de vigilância da resistência aos antibióticos, tendo em vista a evolução da resistência no tempo, em diferentes nichos, assim como o estudo de factores que influenciam a sua selecção e disseminação.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; Resistência; BLAE; Antibióticos; Carne de frango.

Antibiotic resistance, virulence factors and phylogenetic groups in extended-Spectrum β -Lactamases *Escherichia coli* strains of chicken products

Summary

The development of antibiotic resistance has been recognized as a serious public health problem. The scientific community recognizes the need for the evaluation of susceptibility to antibiotics in “indicator bacteria” (such as *Escherichia coli*) from various sources in order to combat increasing antimicrobial resistance. The gut micro flora of animals for consumption, as well their products, are favorable environments for survival, transfer and dissemination of resistant bacteria.

The main objective of this work was to study the rate of antibiotic resistance in chicken meat extended-spectrum producing beta-lactamases (ESBLs) *Escherichia coli* isolates, research virulence factors and analyze the phylogenetic groups.

A total of 29 samples of chicken products (6 thighs, 6 breasts, 6 wings, 5 gizzard and 6 skin) were seeded in Levine not supplemented with cefotaxime and Levine supplemented with cefotaxime (2 μ g/ml). Antimicrobial susceptibility was performed by disk diffusion agar method as recommended by the CLSI recommendations. A total of 16 antimicrobial agents were tested: ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, imipenem, aztreonam, gentamicin, tobramycin, amikacin, streptomycin, tetracycline, sulfamethoxazole-trimethoprim, nalidixic acid, ciprofloxacin and chloramphenicol.

Twenty nine *Escherichia coli* strains (100%) isolated from plates of Levine not supplemented with cefotaxime and twenty seven *E. coli* strains (93,1%) isolated from plates supplemented. In relation to the 27 strains of *E. coli* isolates from plates of Levine supplemented with cefotaxime, 23 isolates (85,2%) were extended-spectrum producing beta-lactamases (ESBLs) and 4 isolates (14,8%) were not extended-spectrum producing beta-lactamases (showed a negative result in the test for detection phenotypic of ESBLs).

The *E. coli* isolates obtained from Levine not supplemented with cefotaxime, showed a high percentage of resistance to tetracycline (72,4%), ampicillin , nalidixic acid (65,5%), chloramphenicol, ciprofloxacin (34,5%), sulfamethoxazole- trimethoprim (27,6%) and streptomycin (27,6%).

In relation to the 23 ESBLs isolates, 13 of them manifest the presence of the *bla*_{TEM-52} gene, 4 the presence of the *bla*_{CTX-M-14a} gene, four the presence of the *bla*_{CTX-M-9} gene, and two the presence of the *bla*_{CTX-M-1} gene. The *tetA* or *tetB* genes were found in all 17 tetracycline resistant isolates and the *aadA* gene was found in eight of 11 streptomycin resistant isolates. In relation to the 13 sulfamethoxazole- trimethoprim resistant isolates, 12 of them manifest the *sul2* gene, 4 the *sul1* gene (all in combination with *sul2* gene) and 1 the *sul3* gene. The *aac(3)-II* gene were founded in the 4 gentamicin resistant isolates. In the chloramphenicol resistant isolated, were detected the *cmlA* gene. The *gyrA* and *parC* genes were amplified and sequenced in the quinolone-resistant isolates. Two amino acid changes in *gyrA* gene (S83L + A87A) were detected in the 20 nalidixic acid resistant isolates and one in *parC* gene (S80I) were identified in the ciprofloxacin resistant isolate.

In the 4 isolates obtained from plates of Levine with supplement of cefotaxime, that showed a negative result in the test for detection phenotypic of ESBLs, were detected mutations in the promoter/attenuator region of *ampC* gene in the -42; -18; -1; +58 positions. In relation to the 4 isolates with hyperproduction of chromosomal AmpC β -lactamase, the 4 sulfamethoxazole- trimethoprim resistant isolates manifest the *sul1* gene. The *tetA* gene was detected in the 2 tetracycline resistant isolates, the 2 gentamicin resistant isolates manifest the *aac(3)-II* gene. Two amino acid changes in *gyrA* gene (S83L + A87A) were detected in the 2 nalidixic acid resistant isolates.

The research of virulence factors, class 1 and 2 integrons and phylogenetic group was performed to the 27 isolates obtained from plates of Levine with cefotaxime supplement. The research of virulence factors showed the presence of the *aer* gene in 74,1% of the isolates, the *fimA* gene in 40,7% the isolates and the *papC* gene in 7,4% of the isolates. The class 1 integron were detected in 8 isolates and class 2 integron in 4 isolates. Four isolates belong to the A phylogenetic group, 11 to the B1 phylogenetic group, 3 to the B2 phylogenetic group and eight to the D phylogenetic group.

Our aim was to characterize, in all strains from plates of Levine supplemented with cefotaxime, the mechanisms involved in phenotypic resistance to antibiotics, as well as describing the possible elements of the acquisition and dissemination of these genes.

Finally, note that the data obtained in this study are important for establishing policies for prudent use of antibiotics in animal consumption as well as in humans. To emphasize the importance of continuing surveillance studies of antibiotic resistance, in

view of the evolution of resistance over time, in different niches, such as the study of factors who influencing the selection and dissemination.

Keywords: *Escherichia coli*; Resistance; ESBL; Antibiotics; Chicken products.

Artigos publicados resultantes deste trabalho:

Costa L., H. Radhouani, C. Gomes, G. Igrejas, and P. Poeta. 2010. High prevalence of extended-spectrum β -lactamases *Escherichia coli* and vancomycin-resistant enterococci isolates from chicken products. A problem of public health. *Journal of Food Safety*. 30:141-153.

Journal of Food Safety

HIGH PREVALENCE OF EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASES *ESCHERICHIA COLI* AND VANCOMYCIN-RESISTANT ENTEROCOCCI ISOLATES FROM CHICKEN PRODUCTS. A PROBLEM OF PUBLIC HEALTH

LUÍS COSTA^{1,2}, HAJER RADHOUANI^{1,2,4}, CLÁUDIA GOMES^{1,2}, GILBERTO IGREJAS^{2,3}, PATRÍCIA POETA^{1,4,*}

Article first published online: 22 JAN 2010
DOI: 10.1111/j.1745-4565.2009.00195.x
© 2010, The Author(s). Journal compilation © 2010, Wiley Periodicals, Inc.

Issue
Journal of Food Safety
Volume 30, Issue 1, pages 141–153, February 2010

Additional Information (Show All)
How to Cite | Author Information | Publication History

Abstract | **Article** | References | Cited By

Get PDF (121K)

Abstract Jump to...

ABSTRACT

*Twenty-nine chicken products were acquired from different supermarkets in Portugal during September to December 2007 and were analyzed for extended-spectrum β -lactamases (ESBL) *Escherichia coli* and vancomycin-resistant enterococci (VRE). Cefotaxime-resistant *E. coli* isolates were recovered in 27 of 29 chicken samples representing 93% of the analyzed samples. The highest percentages of resistance (more than 50% of the isolates) were detected for ampicillin, nalidixic acid and tetracycline. VRE isolates were detected in 17 of 29 samples of chicken origin (59%) and were identified as *Enterococcus durans* ($n = 15$) and *E. faecium* ($n = 2$) with the highest percentages of resistance being detected for erythromycin, tetracycline, ampicillin and ciprofloxacin. Seven *E. durans* and the two *E. faecium* isolates recovered from chicken wings, gizzard and skin show gelatinase activity.*

The high rate of colonization of chicken products by these bacteria supports other studies suggesting that the food chain could be a source of ESBL and VRE colonization in humans representing a public health problem.

PRACTICAL APPLICATIONS

The data indicate that chicken products may be contaminated with a high prevalence of extended-spectrum β -lactamases *Escherichia coli* and vancomycin-resistant enterococci (VRE). It is important to mention that the isolates present a diversity of phenotypes of antimicrobial resistance, and half of the VRE isolates show also gelatinase activity, indicating that these animals may be a reservoir of bacteria showing virulence and increased resistance to antimicrobial agents, raising special concerns about their transmission to humans through the food chain.

Silva, N., **L. Costa**, A. Gonçalves, H. Radhouani, G. Igrejas, and P. Poeta. Extended-spectrum β -lactamases and Virulence genes in *Escherichia coli* Isolated from Retail Chicken Products in Portugal. Foodborne Pathogens and Disease (Submetido).

Comunicações em poster apresentadas em reuniões científicas nacionais:

Costa, L., H. Radhouani, A. Gonçalves, C. Gomes, G. Igrejas, and P. Poeta. 2008. Extended-Spectrum β -lactamases *Escherichia coli* Strains and Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated from chicken Meat. I Jornadas de ciência Alimentar, 16 de Maio, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

Gomes, C., **M. L. Costa**, L. Pinto, C. Carvalho, F. Ruiz-Larrea, C. Torres, P. Domingues, P. Poeta, and G. Igrejas. 2008. Proteómica Aplicada ao estudo de *Enterococcus* spp. Resistentes à Vancomicina Isolados de Produtos de Frangos para Consumo. I Jornadas de Genética e Biotecnologia, 21 a 23 de Novembro, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

Índice Geral

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. <i>Escherichia coli</i>	2
1.3. Antibióticos.....	4
1.3.1. Mecanismos de acção dos antibióticos.....	4
1.3.1.1. Inibição da síntese da parede celular.....	4
1.3.1.2. Inibição da síntese de proteínas.....	7
1.3.1.3. Inibição da síntese do ácido fólico.....	8
1.3.1.4. Interferência na síntese dos ácidos nucleicos.....	9
1.3.1.5. Alteração da permeabilidade da membrana celular.....	9
1.4. Resistência aos antibióticos.....	10
1.4.1. Mecanismos de resistência aos antibióticos.....	11
1.4.1.1. Alteração da permeabilidade da membrana.....	11
1.4.1.2. Expulsão activa do antibiótico (efluxo).....	12
1.4.1.3. Modificação ou protecção do alvo.....	13
1.4.1.4. Modificação ou inibição enzimática do antibiótico.....	13
1.4.2. Resistência às sulfonamidas.....	13
1.4.3. Resistência à tetraciclina.....	14
1.4.4. Resistência aos aminoglicósídeos.....	16
1.4.5. Resistência ao cloranfenicol.....	17
1.4.6. Resistência às quinolonas.....	18
1.4.7. Resistência aos β -lactâmicos.....	20
1.5. β -lactamases.....	23
1.5.1. Classificação das β -lactamases.....	24
1.5.2. β -lactamases de amplo espectro (BLAE).....	25
1.6. Resistência natural e adquirida aos antibióticos.....	26
1.7. Elementos genéticos de aquisição e transferência de genes de resistência.....	27
1.7.1. Plasmídeos.....	28
1.7.2. Transposões.....	29
1.7.3. Integrões.....	29
1.8. Produção de factores de virulência.....	31
1.9. Grupos filogenéticos em <i>Escherichia coli</i>	32

1.10. Interesse do estudo da resistência aos antibióticos em isolados de <i>E. coli</i> obtidos de carne de frango. Um problema de Segurança Alimentar.....	34
CAPÍTULO 2 - OBJECTIVOS	37
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Amostras de frango.....	39
3.2. Meios de cultura, provas de identificação e antibióticos utilizados.....	39
3.2.1. Meios de cultura.....	39
3.2.2. Provas de identificação.....	40
3.2.3. Antibióticos utilizados.....	41
3.3. Procedimento experimental.....	43
3.3.1. Processamento das amostras.....	43
3.3.2. Estudo da sensibilidade a antibióticos.....	43
3.3.2.1. Método da difusão em agar pela técnica de Kirby-Bauer.....	44
3.3.2.2. Determinação fenotípica da produção de β -lactamases de amplo espectro (BLAE).....	44
3.3.3. Extração e quantificação de DNA.....	45
3.3.4. Reacção em cadeia da polimerase (PCR).....	46
3.3.4.1. Primers e condições de PCR utilizados.....	47
3.3.5. Electroforese em gel de agarose.....	52
3.3.6. Sequenciação.....	53
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS	54
4.1. Isolamento de <i>Escherichia coli</i> em placas de Levine com e sem suplemento de cefotaxima.....	54
4.2. Estudo da sensibilidade aos antibióticos nos isolados de <i>Escherichia coli</i>	55
4.2.1. Isolados obtidos nas placas de Levine sem suplemento de cefotaxima.....	55
4.2.2. Isolados obtidos nas placas de Levine com suplemento de cefotaxima....	60
4.2.3. Caracterização genotípica dos mecanismos de resistência.....	62
4.3. Caracterização dos integrões.....	70
4.4. Produção de factores de virulência.....	72
4.5. Classificação filogenética de <i>Escherichia coli</i>	74
CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO	76
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES	90
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
CAPÍTULO 8 – ANEXOS	109

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura química dos β -lactâmicos.....	6
Figura 2: Esquema representativo do sistema de PCR que permite identificar o grupo filogenético, em estirpes de <i>E. coli</i>	33
Figura 3: Fenótipo positivo para a produção de β -lactamases de amplo espectro.....	45
Figura 4: Resistência aos antibióticos nos isolados de <i>E. coli</i> de placas sem suplemento de cefotaxima.....	57
Figura 5: Sequência nucleotídica do gene <i>gyrA</i> selvagem publicado por Swandberg and Wang, 1987 em comparação com os isolados que apresentaram um fenótipo de resistência ao ácido nalidíxico.....	66
Figura 6: Sequência nucleotídica do gene <i>parC</i> selvagem publicado por Kato <i>et al.</i> , 1990 em comparação com os isolados que apresentaram um fenótipo de resistência à ciprofloxacina.....	67
Figura 7: Sequência nucleotídica do atenuador/promotor do gene <i>ampC</i> de <i>E. coli</i> K-12 em comparação com os isolados obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima, que evidenciaram resultado negativo para o teste de detecção fenotípica de BLAEs.....	69

Índice de Tabelas

Tabela 1: Antibióticos, mecanismos de acção e locais de actuação.....	5
Tabela 2: Antibióticos e mecanismos de resistência.....	12
Tabela 3: Antibióticos usados e respectivo valor dos halos de inibição.....	42
Tabela 4: Componentes e concentrações usadas para a reacção de PCR.....	46
Tabela 5: Sequência nucleotídica dos primers de PCR para genes codificadores de resistência a antibióticos em <i>E. coli</i>	47
Tabela 6: Sequência nucleotídica dos primers de PCR para o estudo dos integrões de classe 1 e 2 em <i>E. coli</i>	50
Tabela 7: Sequência nucleotídica dos primers de PCR para o estudo dos factores de virulência em <i>E. coli</i>	51
Tabela 8: Sequência nucleotídica dos primers de PCR para o estudo dos grupos filogenéticos em <i>E. coli</i>	52
Tabela 9: Número de amostras e de isolados de <i>Escherichia coli</i> de placas de Levine com e sem suplemento de cefotaxima.....	54
Tabela 10: Resistência aos antibióticos nos isolados de <i>E. coli</i> de placas sem suplemento de cefotaxima.....	55
Tabela 11: Resistência aos antibióticos nos isolados de <i>E. coli</i> de placas não suplementadas com cefotaxima.....	58
Tabela 12: Fenótipo de resistência aos antibióticos nos isolados de <i>E. coli</i> de placas não suplementadas com cefotaxima.....	59
Tabela 13: Fenótipo de resistência dos isolados de <i>E. coli</i> obtidos de placas suplementadas com cefotaxima.....	61
Tabela 14: Fenótipos e mecanismos de resistência aos antibióticos detectados nos isolados de <i>E. coli</i> obtidos de placas suplementadas com cefotaxima.....	63
Tabela 15: Fenótipos e mecanismos de resistência aos antibióticos detectados nos isolados de <i>E. coli</i> obtidos de placas suplementadas com cefotaxima, com resultado negativo para o teste de detecção fenotípica de BLAEs.....	68
Tabela 16: Estudo das regiões variáveis dos integrões de classe 1 em isolados de <i>E. coli</i> de placas de Levine com suplemento de cefotaxima (isolados positivos e negativos no teste de detecção fenotípica de BLAEs) com fenótipo de resistência ao sulfametoxazol-trimetropim.....	70

Tabela 17: Estudo das regiões variáveis dos integrões de classe 2 em isolados de <i>E. coli</i> de placas de Levine com suplemento de cefotaxima (isolados positivos e negativos no teste de detecção fenotípica de BLAEs) com fenótipo de resistência ao sulfametoxazol-trimetropim.....	71
Tabela 18: Estudo dos genes codificadores de virulência em isolados de <i>E. coli</i> obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima (isolados positivos e negativos para o teste de detecção fenotípica de BLAEs).....	72
Tabela 19: Estudo da caracterização do grupo filogenético em isolados de <i>E. coli</i> obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima (isolados positivos e negativos para o teste de detecção fenotípica de BLAEs).....	75

Lista de Abreviaturas

aac - Aminoglicósido acetiltransferase

AAC - Enzima acetiltransferase

aad - Gene da adenilase

AK - Amicacina

AMC - Amoxicilina + Ácido clavulânico

AMP - Ampicilina

ampC – Gene cromossómico codificador de β -lactamases

ANT - Enzima nucleotidiltransferases

APH - Enzima fosfotransferase

API - Sistema padronizado de testes bioquímicos (“Analytical Profile Index”)

ATM - Aztreonam

ATP - Adenosina trifosfato (“Adenosine Triphosphate”)

BHI - Infusão de cérebro e coração (“Brain-Heart-Infusion”)

bla - Gene codificador de β -lactamases de amplo espectro

BLAE - β -lactamases de amplo espectro

CAT - Enzima cloranfenicol acetiltransferase

catA - Gene codificador da cloranfenicol acetiltransferase

CAZ - Ceftazidima

CHL - Cloranfenicol

chuA - Gene codificador de um receptor da membrana externa

CIP - Ciprofloxacina.

CLSI - Instituto de Padrões Clínicos e de Laboratório (“Clinical and Laboratory Standards Institute”)

CMI - Concentração mínima inibitória

cmIA - Gene do cloranfenicol

CTX - Cefotaxima

D - Ácido aspártico

DHF - Ácido di-hidrofólico

DHFR - Di-hidrofolato redutase

DHPS - Di-hidropteroato sintetase

DNA - Ácido desoxiribonucleico (“Deoxyribonucleic Acid”)

EAEC - Estirpes de *Escherichia coli* enteroagregativas

EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético

EGM - Elementos genéticos móveis

EHEC - Estirpes de *Escherichia coli* enterohemorrágicas

EIEC - Estirpes de *Escherichia coli* enteroinvasivas

EPEC - Estirpes de *Escherichia coli* enteropatogénicas

erm - Eritromicina ribossoma metilase

ETEC - Estirpes de *Escherichia coli* enterotoxigénicas

fimA - Gene codificador da proteína fimbrilina

FOX - Cefotaxima

g - gramas

GEN - Gentamicina

gyrA - Gene codificador das subunidades A da DNA-girase

gyrB - Gene codificador das subunidades B da DNA-girase

h - Horas

H - Histidina

HUS - Síndrome Hemolítico-Urémico (“Hemolytic Uremic Syndrome”)

I - Isoleucina

IMP - Imipenemo

IntI - Gene codificador da integrase

L - Leucina

McFarland - Escala que representa concentrações de bactéria por ml

MH - Mueller-Hinton

min - Minuto

ml - Mililitro

MLS_B - Macrólidos, Lincosamidas e Estreptograminas do grupo B

mm - Milímetro.

MR - Prova do vermelho de metilo (“Metil-Red”)

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

N - Asparagina

NAL - Ácido nalidíxico

n.d. - Não detectado

PABA - Ácido para-aminobenzóico

parC - Gene codificador da topoisomerase IV

pb - Pares de bases

PBP - Proteínas de ligação à penicilina (“*Penicillin* Binding Protein”)

PCR - Reacção em cadeia pela polimerase (“Polymerase Chain Reaction”)

Q - Glutamina

QRDR - “Quinolone Resistance Determining Region”

RNA - Ácido ribonucleico (“Ribonucleic Acid”)

s - Segundo

S - Serina

STR - Estreptomicina

sul - Gene do sulfametoxazol

SXT - Sulfametoxazol-Trimetropim

TBE - Tampão (“Tris-borate-EDTA”)

tet - Gene da tetraciclina

TET - Tetraciclina

THF - Ácido tetra-hidrofólico

TOB - Tobramicina

tRNA - Ácido ribonucleico de transferência

TSI - Meio Agar - ferro e triplo açúcar (“Triple Sugar Iron”)

tspE4.C2 - Fragmento de DNA

VP - Prova de Voges-Proskauer

yjaA - Gene sem função associada conhecida

CAPÍTULO 1-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Introdução

O desenvolvimento da resistência aos antibióticos tem sido reconhecido como um grave problema de Saúde Pública. O uso de antimicrobianos no tratamento de animais doentes ou como agentes profiláticos sujeitam as bactérias comensais, como *Escherichia coli*, colonizadoras do tracto gastrintestinal da maioria dos animais e dos humanos, a uma pressão que favorece bactérias que possuam genes codificadores de resistência a antibióticos e/ou genes codificadores de factores de virulência. Por este motivo, as bactérias intestinais são consideradas como um indicador da resistência aos antibióticos (Bonten *et al.*, 2001; Schroeder *et al.*, 2003; Schroeder *et al.*, 2004; Oguttu *et al.*, 2008; Hammerum and Heuer, 2009).

Sabe-se, que os microrganismos resistentes aos antibióticos e/ou os elementos genéticos onde se inserem os genes de resistência, podem contaminar o homem através da cadeia alimentar (via alimentos) ou por contacto directo com os animais. Este fenómeno pode ocorrer não só com bactérias zoonóticas patogénicas, mas também com bactérias comensais, como *E. coli*. A transferência da resistência aos antibióticos dos animais para humanos pode ocorrer directamente através da circulação de estirpes resistentes ou, indirectamente, pela propagação horizontal dos genes (Casewell *et al.*, 2003; Schroeder *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2003; Angulo *et al.*, 2004; Oguttu *et al.*, 2008).

O aumento da prevalência da resistência aos antibióticos é motivo de preocupação, sendo reconhecido como um problema grave a nível mundial. A organização Mundial de Saúde (OMS) e a União Europeia (UE) reconhecem a sua importância e, a necessidade de adequar políticas para controlar e combater o aumento da resistência aos antibióticos (EU, 1999; WHO, 2000; Bronzwaer *et al.*, 2002).

Aves, bovinos, suínos, peixes e outros animais associados à produção intensiva podem ser reservatórios de várias famílias e géneros bacterianos (*Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., entre outros) e de uma diversidade de elementos genéticos (genes vários, plasmídeos, integrões e transposões) associados à resistência aos antibióticos (Antunes *et al.*, 2006; Wegener, 2003).

1.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli foi isolada, pela primeira vez, em 1885 por Theodor Escherich, um bacteriologista alemão, sendo considerada um habitante natural do tracto intestinal. Theodor Escherich atribuiu a esta bactéria o nome de *Bacterium coli* (bacterium = forma de bastonete, coli = cólon, o seu habitat natural). Posteriormente, o nome do género foi alterado para *Escherichia* em homenagem ao seu “descobridor” (Todar, 2002; Veloso, 2006).

O género *Escherichia* spp. compreende seis espécies: *E. coli*, *E. blattae*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii* e *E. albertii*. Destas seis espécies apenas *E. coli* tem um significado clínico, embora *E. hermannii* e *E. vulneris* já tenham sido isoladas de infecções extra intestinais (Sousa, 2000; Abbott, *et al.*, 2003).

A maioria das estirpes de *E. coli* são comensais, sintetizando vitamina K e B₁₂ (Ramos, 2002). Em termos estruturais e funcionais, *E. coli* é considerada como um modelo para todos os organismos, devido ao facto de apresentar um rápido crescimento e requisitos nutricionais simples. No entanto, foi o facto de em 1946, Joshua Lederberg e Eduard Tatum terem descoberto nesta bactéria o processo de conjugação bacteriana, que a tornou como o principal modelo em biologia molecular (Thielman and Guerrant, 1999).

Escherichia coli, vulgarmente designada por coli-bacilo, é uma enterobactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, que se identifica estruturalmente, pela forma de bacilos coliformes móveis com flagelos peritríquios, existindo também estirpes imóveis. Pode ocorrer isolado, aos pares ou em cadeia; algumas possuem cápsula ou micro cápsula. Frequentemente possui fímbrias ou *pili*, proveniente da membrana citoplasmática que permite a transferências de DNA durante a conjugação (Neidhart *et al.*, 1990; Madigan *et al.*, 2000; Gonçalves, 2005).

E. coli é habitante, praticamente universal, do tracto intestinal de humanos e animais de sangue quente. A bactéria, ingerida através de alimentos ou da água, é capaz de aderir à mucosa que recobre o intestino, poucas horas ou dias após o nascimento. Apesar de ser um organismo anaeróbio facultativo predominante no tracto gastrintestinal humano, representa cerca de 0,1% das bactérias intestinais de um indivíduo são (Todar, 2002).

Em condições normais exerce um papel protector do intestino, junto com outras bactérias comensais, frente a infecções, uma vez que compete com os patogénicos

intestinais como *Shigella* e *Salmonella*. Contudo, *E. coli* pode ser, também, um patógeno importante e de facto, é um dos microrganismos mais frequentemente implicado em processos infecciosos tanto em humanos como em animais. As estirpes patogénicas de *E. coli* apresentam, com frequência, uma série de factores de virulência que geralmente não se encontram nas estirpes não patogénicas. Em função dos factores de virulência classificam-se cinco classes de *E. coli* que causam problemas intestinais: enterotoxigénicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteropatogénicas (EPEC) e enteroagregativas (EAEC) (Sousa, 2000; Todar, 2002).

E. coli existe em grande número, enquanto parte da microbiota normal no intestino, sendo que um indivíduo evacua em média, com as fezes, um trilião de bactérias *E. coli* diariamente. *E. coli* está entre as principais causas de toxinfecções alimentares sendo uma causa importante de gastroenterites. As estirpes enterohemorrágicas (EHEC) são as mais importantes ao nível de toxinfecções alimentares, devido ao facto de causarem patologias severas, como diarreia não sanguinolenta, colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urémico (HUS) (Sousa, 2000; Tutenel *et al.*, 2003). Outros problemas, frequentemente causados por esta bactéria, são as infecções extra-intestinais tais como infecções abdominais e do tracto urinário, meningite e, no caso de atingir a corrente sanguínea através do tracto urinário, dos intestinos ou de uma ferida infectada, pode provocar septicemia (Guerra *et al.*, 2003; Poeta e Rodrigues, 2008).

A estirpe de *E. coli* que existe normalmente nos intestinos de um determinado indivíduo é bem conhecida e controlada pelo seu sistema imunitário e, raramente, causa problemas excepto quando há debilidade. A maioria das doenças é devida a estirpes vindas de outros indivíduos e, portanto, diferentes e que não são reconhecidas pelos linfócitos. As toxinfecções alimentares, em particular, são quase sempre devidas a bactérias de estirpes radicalmente diferentes (Poeta e Rodrigues, 2008).

Devido ao facto de ser uma bactéria comensal do tracto gastro-intestinal e urogenital de animais e humanos, é considerado um dos melhores indicadores de contaminação fecal de água, bem como um indicador de segurança de alguns géneros alimentícios (bivalves vivos e equinodermes, tunicados e gastrópodes vivos) assim como critério de higiene dos processos para alguns alimentos (carne e produtos derivados; leite e produtos lácteos e produtos de pesca) (DWD, 1998; Decreto-Lei nº 243/2001; Regulamento (CE) nº1441/2007).

1.3. Antibióticos

O termo antibiótico foi criado por Waksman em 1942 para denominar todos os compostos naturais produzidos por microrganismos, que inibem o crescimento microbiano ou que têm efeito bactericida. Presentemente, dá-se a designação de antibiótico às moléculas naturais ou sintéticas que são dotadas de propriedades antibacterianas, provocando morte celular (efeito bactericida), ou dotadas de propriedades bacteriostáticas, inibindo o crescimento celular bacteriano (efeito bacteriostático). Os antibióticos, na generalidade dos casos, não se destinam a influenciar qualquer actividade biológica do organismo humano, mas sim a impedir o crescimento ou mesmo provocar a morte dos microrganismos infectantes, sendo por isso designados fármacos etiotrópicos (Sousa, 2006; Sousa e Peixe, 2010).

1.3.1. Mecanismos de acção dos antibióticos

Os antibióticos são habitualmente agrupados de acordo com o seu modo de acção na célula bacteriana, a fim de exercerem as suas propriedades de antibiose. Os modos de acção utilizados pelos antibióticos, são: **1-** inibição da síntese da parede celular; **2-** inibição da síntese de proteínas; **3-** inibição da síntese do ácido fólico; **4-** interferência na síntese do ácido nucleico e **5-** alteração da permeabilidade da membrana celular (Tabela 1) (Sefton, 2002; Samaha-Kfoury e Araj, 2003; Tenover, 2006).

1.3.1.1. Inibição da síntese da parede celular

Independentemente do seu local de actuação, os antibióticos inibidores da síntese do peptidoglicano afectam a integridade da parede celular, ocorrendo a lise celular e, conseqüentemente, a morte da bactéria. Este conjunto de antibióticos actua nas diferentes fases da biossíntese do peptidoglicano. Estes antibióticos não têm actividade sobre as células do Homem e dos protozoários por estes não possuírem parede celular e sobre os fungos que têm quitina, e não peptidoglicano, na parede celular. Os antibióticos pertencentes ao grupo dos β -lactâmicos e dos glicopéptidos, actuam sobre as bactérias por este mecanismo de acção (Sousa, 2006; Sousa e Peixe, 2010).

Tabela 1: Antibióticos, mecanismos de acção e locais de actuação (adaptado de Fuchs *et al.*, 1994; Sefton, 2002, Samaha-Kfoury e Araj, 2003; Tenover, 2006).

Antibióticos	Modo de acção	Local de acção
β-lactâmicos		
Cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima)	Inibição da síntese da parede celular	Proteínas de ligação de penicilinas (PBPs)
Penicilinas (ampicilina, amoxicilina)		
Monobactamo (aztreonam)		
Carbapenemos (imipenemo)		
Glicopéptidos (vancomicina, teicoplanina)	Inibição da síntese da parede celular	Síntese do peptidoglicano
Aminoglicósídeos (amicacina, gentamicina, tobramicina, estreptomicina)	Inibição da síntese de proteínas	Subunidade 50s do ribossoma
Cloranfenicol	Inibição da síntese de proteínas	Subunidade 50s do ribossoma
Tetraciclina	Inibição da síntese de proteínas	Subunidade 30s do ribossoma
Macrólidos	Inibição da síntese de proteínas	Subunidade 50s do ribossoma
Sulfametoxazol e Trimetropim	Inibição da síntese do ácido fólico	Ácido para-aminibenzóico (PABA) Ácido di-hirofólico (DHF)
Quinolonas	Interferência na síntese do ácido nucleico	DNA girase Topoisomerase IV
Polimixinas	Alteração da permeabilidade da membrana celular	Fosfolípidos membranares

i) β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos (Figura 1) incluem as penicilinas, os monobactamos, os carbapnemos, as cefalosporinas e os inibidores de β -lactamases, devido à sua estrutura β -lactâmica (por ex: ácido clavulânico, o

sulbactam e tazobactam). Constituem o grupo mais usado na prática clínica veterinária e humana e, possuem a característica comum de exibir um anel β -lactâmico (constituído por 3 átomos de carbono e um de nitrogénio) farmacologicamente activo, impedindo a biossíntese do peptidoglicano. Os diferentes grupos de antibióticos β -lactâmicos distinguem-se pela estrutura ligada ao anel β -lactâmico. Os antibióticos β -lactâmicos inibem irreversivelmente as enzimas D-D-carboxitranspeptidases, presentes no folheto externo da membrana celular, sendo colectivamente designadas por PBP (*Penicillin-Binding-Proteins*), que desempenham um papel importante nos *cross-linking* parietais. Daqui resulta a paragem da síntese do peptidoglicano e a intensificação da activação das autolisinas, com a subsequente lise celular (Poeta, 2006; Sousa, 2006; Li *et al.*, 2007; Sousa e Peixe, 2010).

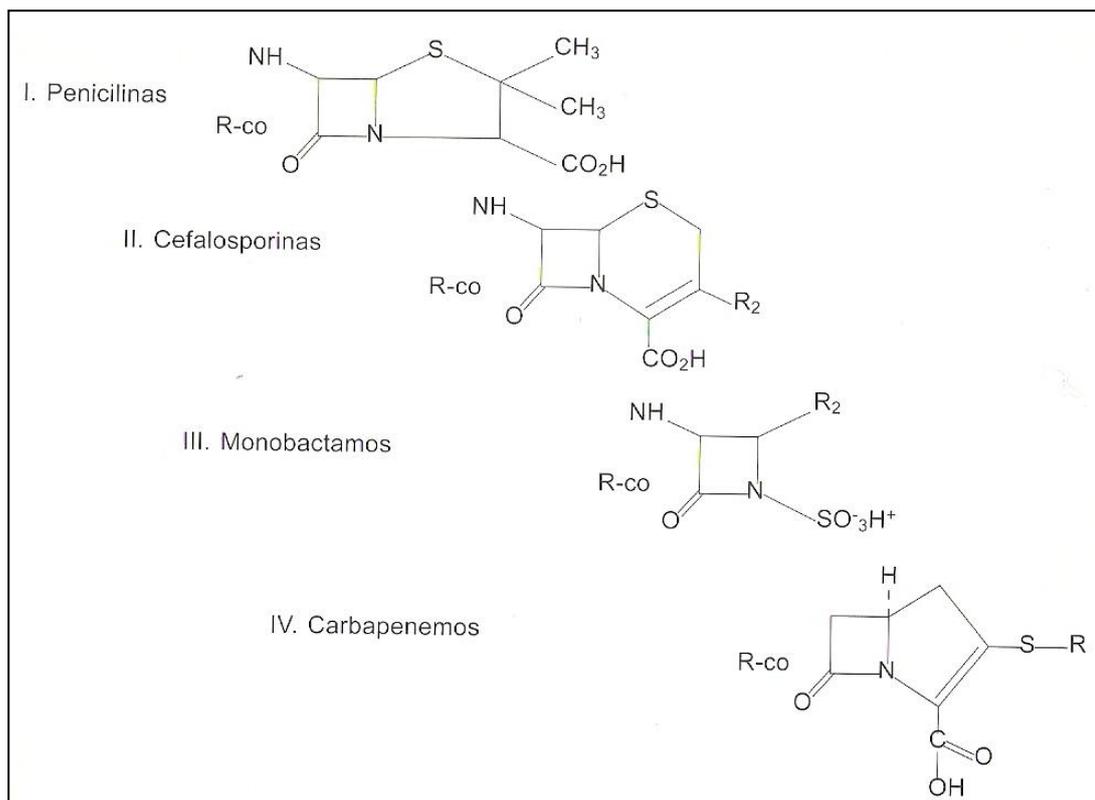


Figura 1: Estrutura química dos β -lactâmicos (adaptado de Sousa e Peixe, 2010).

ii) Glicopéptidos

Os glicopéptidos vancomicina e teicoplanina actuam na fase membranar da biossíntese do peptidoglicano, por ligação química ao dipéptido D-alanil-

D-alanina, bloqueando a formação da parede celular. Estes dois antibióticos apenas actuam frente a bactérias Gram-positivas (Sefton, 2002; Sousa e Peixe, 2010).

1.3.1.2. Inibição da síntese de proteínas

Dadas as diferenças entre os ribossomas bacterianos e os das células humanas (ribossoma bacteriano possui duas subunidades 30S e 50S, enquanto que os ribossomas dos eucariotas possuem duas subunidades 40S e 60S), é possível a utilização terapêutica de antibióticos inibidores da síntese proteica sem efeitos graves para o hospedeiro. De um modo geral estes antibióticos não afectam a síntese proteica nas células eucariotas, a não ser que penetrem as membranas mitocondriais (mitocôndrias presentes nas células eucariotas possuem ribossoma do tipo bacteriano [70S]), como é o caso do cloranfenicol, o que justifica a sua elevada toxicidade (Sousa, 2006; Tenover, 2006; Sousa e Peixe, 2010).

As diversas moléculas de antibióticos inibidores da síntese proteica actuam em diferentes locais do ribossoma, em alvos nas subunidades 30S ou 50S, interferindo com um dos quatro estados da síntese proteica (iniciação, alongação, translocação e terminação) (Sefton, 2002; Sousa e Peixe, 2010).

Vários grupos de antibióticos actuam sobre as bactérias inibindo a formação de proteínas. Esses grupos são:

i) **Aminoglicósídeos**

Os aminoglicósídeos, após atravessarem a parede e membrana celular, ligam-se a proteínas específicas da subunidade 30S, provocando uma leitura errada da mensagem codificada no mRNA. As proteínas *non sense* induzidas pelos aminoglicósídeos incorporam-se na membrana celular alterando a sua permeabilidade, ocorrendo um efluxo de iões K^+ e outros componentes intracelulares para o exterior, o que justifica o mecanismo bactericida destes antibióticos (Tenover, 2006; Hermann, 2007; Sousa e Peixe, 2010). Neste grupo de antibióticos incluem-se a gentamicina, e a estreptomicina entre outros.

ii) Cloranfenicol

O cloranfenicol actua na subunidade ribossomal 50S, interferindo com a formação de novos péptidos, inibindo a acção da transpeptidase, tendo um efeito bacteriostático. Apesar de ser um antibiótico com um largo espectro de acção, a sua aplicação é bastante limitada, uma vez que possui uma elevada toxicidade tanto em animais como em humanos (Sousa, 2006; Tenover, 2006; Sousa e Peixe, 2010).

iii) Tetraciclínas

No grupo das tetraciclínas destaca-se a tetraciclina. A tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro e bacteriostático com actividade frente a uma grande variedade de microrganismos, sendo bastante usado em medicina e veterinária. Este antibiótico actua na subunidade 30S, impedindo a ligação codão-anticodão entre o tRNA e o local A dos ribossomas (Rodríguez *et al.*, 1998; Chopra and Roberts, 2001; Sousa e Peixe, 2010).

iv) Macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B

Os diferentes antibióticos que pertencem ao grupo MLS_B (**M**acrólidos, **L**incosamidas e **E**streptograminas do grupo **B**) possuem um mecanismo de acção semelhante, inibindo a síntese proteica das bactérias ao ligar-se reversivelmente à subunidade 50S do ribossoma, com efeitos bacteriostático. Especificamente, bloqueiam o local P, impedindo a transpeptidação-translocação, provocando a libertação prematura do péptido (Sousa, 2006; Sousa e Peixe, 2010).

1.3.1.3. Inibição da síntese do ácido fólico

O ácido fólico desempenha um papel essencial em duas etapas da síntese das purinas e numa fase importante da síntese das pirimidinas. As bactérias necessitam de ácido fólico mas não possuem um sistema de obtenção deste ácido do ambiente que as rodeia, tendo necessariamente de o sintetizar (Sáenz, 2004).

i) Sulfonamidas

As sulfonamidas, como o sulfametoxazol e o trimetropim, são compostos de síntese química com uma acção bacteriostática. São conhecidos como

antimetabolitos, dado que inibem a cadeia metabólica fundamental para a viabilidade da célula bacteriana. Estes antibióticos actuam imitando o substrato de duas enzimas (o ácido para-aminobenzóico [PABA] e o ácido di-hidrofólico [DHF]) que produzem a forma activa do ácido fólico, o ácido tetra-hidrofólico (THF). A combinação mais usada é denominada de cotrimoxazol e, é composta por trimetropim e sulfametoxazol na proporção 1/5 (Huovinen, 2001; Master *et al.*, 2003; Sousa e Peixe, 2010).

1.3.1.4. Interferência na síntese dos ácidos nucleicos

Os antibióticos que interferem com a síntese dos ácidos nucleicos, actuam por bloqueio das DNA girases e das topoisomerases bacterianas, responsáveis pela introdução de superenrolamento negativo na molécula de DNA. Assim, provocam o bloqueio dos processos que envolvem separação das cadeias de DNA, tais como a replicação e transcrição, induzindo alterações dos processos biológicos incompatíveis com a vida (Griffiths *et al.*, 1998; Sousa *et al.*, 1998).

i) Quinolonas

O grupo das quinolonas, onde se insere a ciprofloxacina e o ácido nalidíxico, penetram no citoplasma das bactérias através dos canais de porinas ou da camada fosfolipídica, mediante mecanismos de difusão passiva, tendo um efeito bactericida. Após entrarem na célula, actuam sobre a DNA girase e a topoisomerase IV (topoisomerases tipo II), enzimas que participam no superenrolamento do DNA, tornando possível o seu enrolamento numa direcção oposta ao da dupla hélice do DNA. A DNA girase é composta por quatro subunidades, duas subunidades A e duas subunidades B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. Ao passo que a topoisomerase IV se encontra codificada pelo gene *parC*. (Fuchs *et al.*, 1994; Páez *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2008).

1.3.1.5. Alteração da permeabilidade da membrana celular

A membrana celular bacteriana, bem como a das células eucarióticas, tem funções de semipermeabilidade, tornando possível a passagem selectiva de iões K^+ que se

acumulam no citoplasma bacteriano. A alteração da permeabilidade da membrana celular por agentes químicos ou físicos provoca um efluxo de K^+ , de aminoácidos e de nucleótidos, causando a morte celular (Sousa, 2006; Sousa e Peixe, 2010).

i) Polimixinas

As polimixinas são antibióticos polipeptídicos com uma estrutura cíclica, ligados a uma cadeia de ácidos gordos. As polimixinas alteram a permeabilidade da membrana externa, por inter-actuação com as cargas negativas dos fosfolípidos ou com as cargas negativas dos lipopolissacáridos ancorados nesta membrana. A cauda do ácido gordo das polimixinas penetra na região hidrófoba da membrana externa, desorganizando a permeabilidade desta estrutura, permitindo a saída de constituintes intracelulares das bactérias. Nas bactérias Gram-negativas as polimixinas têm de permear previamente a membrana externa das bactérias, a fim de atingirem a membrana celular (Sefton, 2002; Sousa, 2006; Sousa e Peixe, 2010).

1.4. Resistência aos antibióticos

A descoberta e a utilização dos agentes antimicrobianos possibilitou resultados excelentes contra doenças infecciosas, que até então eram a principal causa de doença e mortalidade (Cohen, 1997). Nas últimas décadas, o uso generalizado, excessivo e indiscriminado destes agentes para vários fins, como promotores de crescimento, fins terapêuticos e profiláticos tanto em humanos, como em animais e plantas, teve como consequência o desenvolvimento de resistências pelas bactérias (Witte, 1997; Barbosa and Levy, 2000). O uso massivo dos antimicrobianos conduziu, invariavelmente, ao aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos, que desenvolveram mecanismos de resistência microbiana, consequência da exposição prolongada aos agentes antimicrobianos. A resistência aos antibióticos é um problema global, com implicações em saúde pública. O uso generalizado de antibióticos permitiu às bactérias sobreviver e multiplicar-se sob a pressão dos antibióticos devido à sua flexibilidade genética (Cohen, 1997; Kapil, 2005).

É considerada a presença de resistência quando uma estirpe não é susceptível a uma concentração clinicamente relevante de um antibiótico e/ou quando é demonstrado

que a estirpe dispõem de mecanismos ou propriedades que possam tornar o antibiótico ineficaz (Degener, 1999).

1.4.1. Mecanismos de resistência

As mudanças na fisiologia e estrutura da célula do microrganismo provocam alterações no seu mapa genético, através de mutações e da aquisição de genes de outros microrganismos, por mecanismos de transferência genética, ou pela associação destes dois acontecimentos. A capacidade de uma bactéria desenvolver mecanismos de resistência depende da fisiologia da bactéria, das características das mutações que podem ocorrer, da supremacia dos genes de resistência adquiridos e do período de exposição ao agente antibacteriano (Vandenbroucke-Grauls, 1993; Levy, 1998).

Os antibióticos ao actuarem sobre o alvo bacteriano exercem as suas propriedades e o seu efeito (bactericida ou bacteriostático), originando uma pressão selectiva sobre as bactérias que procuram interferir na inter-relação antibiótico–alvo bacteriano. Esta inter-relação é dificultada através de mecanismos bioquímicos (Sousa, 2006).

Os mecanismos bioquímicos de resistência podem basear-se numa variedade de mecanismos, podendo ser divididos em quatro categorias principais: **i)** alteração da permeabilidade da membrana; **ii)** expulsão activa do antibiótico (efluxo); **iii)** modificação ou protecção do alvo e **iv)** modificação ou inibição enzimática do antibiótico. Todos estes mecanismos são influenciados por proteínas e podem ocorrer simultaneamente num microrganismo. No entanto, apenas um deles pode conferir resistência a diferentes classes de antibióticos (Tabela 2) (Fuchs *et al.*, 1994; Hancoch, 2005, Tenover, 2006; Sousa e Peixe, 2010).

1.4.1.1. Alteração da permeabilidade da membrana

A redução da permeabilidade, devido à perda de canais de porina, é um importante mecanismo de resistência em bactérias Gram-negativas. Através deste mecanismo as bactérias poderão adquirir multirresistência, resultante de mutações cromossómicas espontâneas seleccionadas pela pressão exercida pelo uso de antibióticos. No entanto, estas alterações apenas conferem um grau moderado de resistência (Moreillon, 2000; Sefton, 2002).

Tabela 2: Antibióticos e mecanismos de resistência (adaptado de Fuchs *et al.*, 1994; Samaha-Kfoury e Araj, 2003).

Antibióticos	Mecanismo de resistência
- β -lactâmicos	- β -lactamases
Cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima)	- Mutações na PBP
Penicilinas (ampicilina, amoxicilina)	- Diminuição da permeabilidade da membrana
Monobactamo (aztreonam)	- Expulsão activa do antibiótico (efluxo)
Carbapenemos (imipenemo)	
- Aminoglicósidos (amicacina, gentamicina, tobramicina, estreptomicina)	- Modificação enzimática
	- Modificação do alvo
- Cloranfenicol	- Inibição enzimática
	- Expulsão activa do antibiótico (efluxo)
- Tetraciclina	- Protecção do alvo (ribossomas)
	- Inibição enzimática
- Sulfametoxazol e Trimetropim	- Modificação do alvo (mutações em DHFR e DHPS)
	- Modificação do alvo (mutações na DNA girase e topoisomerase IV)
- Quinolonas	- Alteração da permeabilidade da membrana

1.4.1.2. Expulsão activa do antibiótico (efluxo)

Na expulsão do antibiótico, por um sistema de transporte activo, a concentração celular do antibiótico diminui. Nas bactérias existem dois tipos de bombas constituídas por proteínas transmembranares que formam os poros. Estas bombas de expulsão têm função fisiológica de expulsar substâncias tóxicas, como metais pesados, podendo expulsar os antibióticos conferindo resistência à bactéria (Moreillon, 2000). Algumas bombas são específicas para determinados antibióticos, enquanto outras expulsam diferentes tipos de antibióticos. Contudo, as primeiras conferem um nível de resistência mais elevado que as segundas aos respectivos antibióticos (Sefton, 2002).

1.4.1.3. Modificação ou protecção do alvo

Este mecanismo de modificação ou protecção do alvo de actuação do antibiótico pode decorrer de:

- Modificação parcial do alvo, por exemplo, mutações nos genes que codificam a girase podem condicionar a actividade das fluoroquinolonas;
- Hiperprodução do alvo, como no caso de hiperprodução de di-hidrofolato redutase (o alvo do trimetopim), que vai reduzir a actividade do timetoprim;
- Aparecimento de alternativa ao alvo, como no caso da aquisição dos genes *sul1*, *sul2* ou *sul3*, que codificam para uma di-hidropteroato sintetase com reduzida afinidade para as sulfonamidas;
- Produção de uma proteína que se liga ao local específico onde o antibiótico actuaria (Sáenz, 2004; Sousa e Peixe, 2010).

1.4.1.4. Modificação ou inibição enzimática do antibiótico

Existem diversos sistemas aptos a modificar e inactivar certos antibióticos através de enzimas. Através deste mecanismo, verificou-se resistência a diferentes antibióticos, tais como a aminoglicósídeos e a β -lactâmicos (Moreillon, 2000). A localização dos determinantes de resistência em elementos genéticos móveis e com elevada capacidade de disseminação tem contribuído para a elevada incidência deste tipo de mecanismo (Sousa e Peixe, 2010).

1.4.2. Resistência às Sulfonamidas

As sulfonamidas e o trimetopim, antibióticos de síntese química, partilham um amplo espectro antimicrobiano, nomeadamente no que se refere a membros da família *Enterobacteriaceae*, como é o caso de *Escherichia coli*. Deste modo e, por apresentar um vasto índice de indicações clínicas, um custo relativamente baixo e pelo trimetopim actuar sinergicamente com o sulfametoxazol, a combinação sulfametoxazol-trimetopim (SXT) tem sido largamente utilizada em todo o mundo (Houvinen *et al.*, 2001; Master *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 1998).

Modificação ou protecção do alvo de actuação

A resistência às sulfonamidas e ao trimetropim resulta, geralmente, de mutações cromossómicas nos genes codificadores das enzimas di-hidropteroato sintetase (DHPS) e di-hidrofolato redutase (DHFR) (alvos de actuação do sulfametoxazol e trimetropim, respectivamente), que se traduzem na hiperprodução de di-hidrofolato redutase (DHFR), na alteração das enzimas, ou na combinação destes dois mecanismos (Houvinen, 2001; Sefton, 2002). No entanto, a aquisição de genes alternativos transferíveis, é o mecanismo de resistência mais frequente para estes antibióticos. Foram já caracterizados 3 genes *sul* (*sul1*, *sul2* e *sul3*) que codificam a resistência ao sulfametoxazol em bactérias Gram-negativas (produzem variantes da enzima DHPS) e mais de 20 genes *dfr* diferentes que codificam a resistência ao trimetropim (produzem variantes da enzima DHFR), sendo estes genes transferíveis e disseminados mediante a inserção em integrões, transposões e/ou plasmídeos. Sendo que a maioria dos genes de resistência a o sulfametoxazol-trimetropim residem em integrões (White and Rawlinson, 2001; Sáenz, 2004).

1.4.3. Resistência à tetraciclina

A tetraciclina foi um dos antibióticos mais usados entre os anos 1950 e 1960. O facto de ser um antibiótico com uma baixa toxicidade, ter um amplo espectro de acção, ser relativamente barato e de ter poucos efeitos secundários, tornava-o um dos antibióticos eleitos frente a um grande número de infecções (Speer *et al.*, 1992; Sousa *et al.*, 1998).

Contudo, o facto de se tratar de um antibiótico de frequente utilização, facilitou o aparecimento de bactérias resistentes a este antibiótico. Os genes que conferem resistência à tetraciclina residem em plasmídeos ou transposões, que desempenham um papel importante na disseminação destes genes de resistência. Até agora já foram identificados inúmeros genes diferentes que conferem resistência à tetraciclina (genes *tet*) (Fuchs *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1998; Roberts, 2005). Sabe-se que a expressão dos genes *tet* também aumenta a susceptibilidade as estirpes bacterianas aos aminoglicósidos (Sousa, 2006).

A resistência à tetraciclina pode ser mediada por três mecanismos de resistência, nomeadamente: expulsão activa do antibiótico; protecção do alvo (ribossomas) ou inibição enzimática (Chopra and Roberts, 2001; Roberts, 2005; Thaker *et al.*, 2010).

Expulsão activa do antibiótico (efluxo)

Para a expulsão activa da tetraciclina já foram encontrados vários genes *tet*, presentes em plasmídeos, que codificam as proteínas membranares que funcionam como bombas de efluxo de expulsão da tetraciclina por acção de ATP (Chopra and Roberts, 2001). Sabe-se que as bactérias resistentes absorvem o fármaco de forma tão rápida como as sensíveis, diferindo apenas na capacidade de o expulsar. Sendo esta diferença na capacidade de expulsar o antibiótico que define o carácter resistente das bactérias (Sefton, 2002; Sousa 2006). Estes genes são encontrados tanto em bactérias Gram-positivas como em bactérias Gram-negativas, sendo no entanto, mais comum, ocorrerem em bactérias Gram-negativas. Foi para este antibiótico que foi descrito pela primeira vez o mecanismo de resistência a antibióticos por acção de bombas de efluxo, sendo o último dos mecanismos de resistência a ser descrito, tendo sido identificado em *Escherichia coli* (Chopra and Roberts, 2001; Poole, 2005).

Modificação ou protecção do alvo de actuação

No caso de as bactérias possuírem resistência à tetraciclina pelo mecanismo de protecção do alvo (ribossomas), verifica-se que proteínas citoplasmáticas ligam-se aos ribossomas, impedindo a ligação da tetraciclina. Foram identificados onze genes que codificam as proteínas que se ligam ao cromossoma. Estes genes são encontrados tanto em bactérias Gram-positivas como em bactérias Gram-negativas (Thaker *et al.*, 2010). Os genes *tetM*, *tetQ* e *tetW* são codificados por transposões, ao passo que os genes *tetO* e *tetS* estão, normalmente, localizados em plasmídeos, sendo mais comum o seu aparecimento em bactéria Gram-positivas (Roberts, 2005).

Inactivação enzimática do antibiótico

A inactivação enzimática da tetraciclina é um mecanismo pouco frequente, sendo que até agora só se conhecem três genes (*tetX*, *tet34* e *tet37*) que conferem resistência à tetraciclina por inactivação enzimática da mesma (Thaker *et al.*, 2010). O gene *tetX* foi o primeiro a ser descoberto, em 1989, sendo que os genes *tet34* e *tet37* só foram identificados em 2004. Sabe-se que o gene *tetX* se encontra num transposição, que também contém o gene *ermF* que confere resistência à eritromicina e, que este gene se encontra exclusivamente em algumas espécies. O mecanismo de resistência conferido pelos genes *tet34* e *tet37* ainda não é bem conhecido (Chopra and Roberts, 2001; Thaker *et al.*, 2010).

1.4.4. Resistência aos aminoglicósdeos

Os antibióticos aminoglicósidos têm acção na inibição da síntese de proteínas bacterianas pela união ao ribossoma. Nesta família encontram-se antibióticos amplamente usados como a estreptomicina, a gentamicina, a tobramicina e a amicacina, que são eficazes contra a maioria dos organismos Gram-negativos (Fuchs *et al.*, 1994). Alterações na permeabilidade celular e nos alvos de actuação dos aminoglicósdeos podem determinar resistência a estes antibióticos, sendo contudo a produção de enzimas inactivadoras deste antibiótico o mecanismo mais importante e frequente (Pérez, 1998; Sousa, 2006; Hermann, 2007; Sousa e Peixe, 2010).

Inactivação enzimática do antibiótico

O mecanismo de resistência aos aminoglicósdeos de maior importância é a inactivação enzimática. As enzimas fosfotransferases (APH), nucleotidiltransferases (ANT) e acetiltransferases (AAC) são os três grupos de enzimas inactivadoras de aminoglicósdeos. Predominam dois tipos de modificações, a N-acetilação de grupos amino e a O-fosforilação de grupos hidroxilo, para os quais os cofactores são acetil-CoA e ATP, respectivamente. As enzimas fosfotransferase (APH) e nucleotidiltransferase (ANT) catalizam, respectivamente, a fosforilação e nucleotidilação de grupos hidroxilo, ao passo que a enzima acetiltransferase (AAC) promove a acetilação de grupos amino. O factor mais importante da modificação é a afinidade da enzima modificadora pelo substrato. As enzimas ao actuarem sobre o antibiótico tornam-no num metabolito inactivo, resultando em estirpes com valores muito elevados de CMI (estirpes bacterianas muito resistentes) (Fuchs *et al.*, 1994; Wright, 2003; Hermann, 2007; Sousa e Peixe, 2010). Para *Escherichia coli* podemos observar varias enzimas modificantes de aminoglicósdeos que conferem fenótipos de resistência a esta classe de antibióticos, tais como, a AAC(3)-I, AAC(3)-II, AAC(3)-IV, AAC(6')-I, APH(3')-I/II, APH(3'')-I, APH(6)-I, ANT(2'')-I e ANT(3'')-I (Sáenz, 2004). Uma enzima afecta diferentes aminoglicósdeos, o que torna o espectro de acção destas enzimas alargado a muitos membros desta classe de antibióticos (Sáenz, 2004).

Modificação ou protecção do alvo de actuação

A resistência aos aminoglicósdeos por modificação do alvo traduz-se por mutações de genes codificadores de proteínas ribossomais que causam essa alteração

(Sefton, 2002; Hermann, 2007). Cada aminoglicósido possui um alvo distinto na subunidade ribossomal 30S, sendo raro observar qualquer tipo de resistência cruzada entre os diferentes aminoglicósidos (Sáenz, 2004).

Alteração da permeabilidade da membrana

Os aminoglicósidos, compostos altamente hidrófilos, difundem através da membrana celular por canais de porina. Em estirpes resistentes, verifica-se que estas apresentam uma concentração intracelular reduzida de aminoglicósidos. Alterações nos canais de porina ou uma quantidade reduzida destas proteínas, são responsáveis por uma diminuição da concentração intracelular dos aminoglicósidos, o que pode conferir resistência às bactérias a este grupo de antibióticos (Sousa, 2006; Hermann, 2007).

1.4.5. Resistência ao cloranfenicol

Quimicamente o cloranfenicol é o D(-)-treo-1-paranitrofenil-2-dicloro acetamida-1-3-propanodiol. Actua na subunidade 50S, impedindo a transpeptidação, tendo uma acção bacteriostática. É uma molécula muito lipófila que facilmente atravessa as membranas mitocondrias e inibe a síntese proteica ribossomal, o que faz com que se apresente como uma molécula e, conseqüentemente um antibiótico, que manifesta uma elevada toxicidade para o homem. Por este motivo, e apesar de ser um antibiótico de largo espectro que apresenta actividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, a sua aplicação é muito limitada (Sousa e Peixe, 2010).

O principal mecanismo de resistência do cloranfenicol é a inactivação enzimática do antibiótico, no entanto também já se verificaram resistências devido à alteração da permeabilidade da membrana celular (Pérez, 1998; Sousa, 2006).

Inibição enzimática do antibiótico

A resistência ao cloranfenicol é devida à produção de enzimas inactivadoras, cloranfenicol acetiltransferases (CAT) (codificadas pelo gene *catA*), existentes tanto em bactérias Gram-positivas como em bactérias Gram-negativas, que acetilam a molécula do antibiótico impedindo a união deste com a subunidade ribossomal 50S bacteriana. Os genes codificadores desta enzima encontram-se em plasmídeos ou transposões (Fuchs *et al.*, 1994; Sáenz, 2004, Sousa, 2006).

1.4.6. Resistência às quinolonas

As quinolonas são antibióticos derivados do ácido nalidíxico, com uma actividade contra organismos Gram-negativos. A introdução de um átomo de flúor à estrutura básica das quinolonas produz um grupo de antibióticos formado principalmente pela ofloxacina, pefloxacina, enoxacina, norfloxacina e ciprofloxacina. Desde 1960, quando o ácido nalidíxico começou a ser utilizado para o tratamento de infecções respiratórias e do tracto urinário, várias quinolonas têm sido amplamente utilizadas em humanos e animais (Fuchs *et al.*, 1994; Lindgren *et al.*, 2003; Páez *et al.*, 2005). A aquisição de resistência às quinolonas era até recentemente associada à ocorrência de mutações cromossómicas. A descrição nos últimos anos de mecanismos de resistência transferíveis às quinolonas, habitualmente localizados em plasmídeos com resistência a múltiplos antibióticos, poderá justificar o elevado crescimento da resistência às quinolonas verificado na última década. A resistência a este conjunto de antibióticos desenvolveu-se rapidamente prevalecendo em ambiente clínico e na indústria animal (Lindgren *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004; Sousa e Peixe, 2010).

As quinolonas actuam no processo de replicação de DNA, inibindo as enzimas DNA girase e topoisomerase IV. As funções destas enzimas passam por desenrolar o DNA imediatamente antes da duplicação deste e, após a duplicação, levar as cadeias novas ao estado inicial de enrolamento (Fuchs *et al.*, 1994; Páez *et al.*, 2005; Sousa e Peixe, 2010). O principal mecanismo de resistência às quinolonas é a alteração do alvo (mutações na DNA girase e na topoisomerase), no entanto outros mecanismos de resistência, como a alteração da permeabilidade da membrana celular e bombas de efluxo, também poderão estar envolvidos na aquisição de resistência a estes antibióticos (Páez *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2008; Sousa e Peixe, 2010).

Modificação ou protecção dos alvos de actuação

Na sequência de mutações cromossómicas nos genes que codificam as enzimas DNA girase (codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB*) e topoisomerase IV (codificada pelo gene *parC*), que são o alvo de actuação das quinolonas, a afinidade para estes alvos é alterada, o que resulta na redução da susceptibilidade às quinolonas (Hooper, 2001; Páez *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2008; Sousa e Peixe, 2010). Em *Escherichia coli* e outras bactérias Gram-negativas, a resistência a estes antibióticos tem como principal alvo a DNA-girase, pelo que as resistências são devidas a mutações produzidas no gene *gyrA*.

No entanto, mutações no gene *parC*, codificante da topoisomerase IV, proporcionam resistência adicional. Apesar de se verificarem registos de mutações no gene *gyrB*, estas não parecem ser significativas em termos de resistências (Fuchs *et al.*, 1994; Hooper, 2001; Sáenz, 2004; Páez *et al.*, 2005).

Em *Escherichia coli*, as mutações com relevância no gene *gyrA*, ocorrem entre os aminoácidos 67 e 106 da proteína A, perto do sítio activo da enzima, a tirosina-122. Também se verificam alterações ao nível da serina-83 que é substituída por leucina ou triptofano, convertendo-se na causa mais comum de resistência. Estas mutações ocorrem na região conhecida como “Quinolone Resistance Determining Region” (QRDR), composta pelos resíduos aminoacídicos 67 a 106, da GyrA, lugar onde se deve produzir a união do DNA com a enzima, mediada por uma fosfotirosina (Hooper, 2001; Páez *et al.*, 2005, Sousa, 2006).

As mutações descritas no gene *parC* para *Escherichia coli*, ocorrem principalmente nos tripletos 78, 80 e 84, com substituição de glicina por asparto, serina por arginina ou isoleucina e glicina por aspartato, respectivamente. Estas mutações, em conjunto com as substituições encontradas no gene *gyrA*, conferem elevados níveis de resistência às fluoroquinolonas (Vila *et al.*, 1996; Kern *et al.*, 2005).

Apesar de ser um mecanismo de resistência menos comum para bactérias resistentes às quinolonas, foram descritas proteínas (QnrA, QnrB e QnrS), codificadas por plasmídeos, que bloqueiam a inibição das topoisomerases II (DNA girase e topoisomerase IV) pelas quinolonas. Embora apenas aumentem ligeiramente a concentração mínima inibitória, promovem a selecção de resistência de elevado nível às fluoroquinolonas (Jacoby *et al.*, 2003; Páez *et al.*, 2005; Sousa e Peixe, 2010).

Alteração da permeabilidade da membrana/expulsão activa do antibiótico (efluxo)

A alteração nas porinas e o aumento do efluxo das quinolonas podem determinar a redução de susceptibilidade em diferentes espécies bacterianas. As mutações nos genes codificadores das proteínas de membrana (porinas) têm como resultado alterações na permeabilidade das membranas dos microrganismos, impedindo, desta forma, a passagem do antibiótico (Páez *et al.*, 2005; Sousa e Peixe, 2010).

Recentemente, verificou-se que um mutante da enzima inactivadora de aminoglicósidos (AAC-6')-Ib, adquiriu a capacidade de acetilar a ciprofloxacina, determinando a redução da susceptibilidade a esta quinolona (Sousa e Peixe, 2010).

1.4.7. Resistência aos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos constituem o grupo de antibióticos mais importante, dada a sua elevada eficácia terapêutica e a sua baixa toxicidade para animais, incluindo o Homem. Contudo a eficácia destes antimicrobianos está constantemente a ser desafiada pela emergência de estirpes bacterianas resistentes (Sousa, 2006; Li *et al.*, 2007).

A resistência aos β -lactâmicos pode ser mediada por quatro mecanismos de resistência, nomeadamente: alteração da permeabilidade da membrana celular; expulsão activa do antibiótico (efluxo); modificação dos alvos de actuação (PBPs) e por último a hidrólise enzimática dos β -lactâmicos por β -lactamases. A resistência a este grupo de antibióticos pela acção das β -lactamases é o mecanismo de resistência mais comum (Livermore, 1995; Babic *et al.*, 2006; Sousa e Peixe, 2010).

Alteração da permeabilidade da membrana

Os antibióticos β -lactâmicos são moléculas hidrofóbicas, que têm de atravessar a membrana exterior das bactérias Gram-negativas para atingirem o seu alvo de actuação (PBPs). A difusão destes antibióticos para o espaço periplasmático efectua-se devido à existência dos canais de porina (Sousa, 2006). O aumento da resistência bacteriana aos β -lactâmicos, está muitas vezes relacionada com a alteração da permeabilidade da membrana externa, por ausência ou diminuição da expressão de genes que codificam as porinas, causando a redução da entrada do antibiótico na célula, diminuído assim a concentração interna do antibiótico, o que resulta numa redução da susceptibilidade a este grupo de antibióticos (Nikaido, 2003; Sousa e Peixe, 2010).

Em organismos Gram-negativos, a membrana externa é de grande importância na resistência intrínseca a diversos antibióticos. A permeabilidade por porinas é directamente afectada pelo tamanho, carga, número e natureza hidrofóbica, tanto do antibiótico como das porinas. *Escherichia coli* possui três porinas denominadas OmpC, OmpF e PhoE. Apesar das porinas poderem ser específicas para uma família de antibióticos, existem outras que transportam diferentes famílias de antibióticos.

Alterações nestas porinas acarretam, frequentemente, resistências múltiplas, visto que diferentes antibióticos podem ser transportados pelos mesmos canais. Em *Escherichia coli* verificou-se um aumento da concentração mínima inibitória a vários β -lactâmicos, quando se observou que a porina OmpF é substituída por OmpC (Fuchs *et al.*, 1994; Moreillon, 2000; Nikaido, 2003).

Expulsão activa do antibiótico (efluxo)

Vários β -lactâmicos podem ser expulsos pelos sistemas de efluxo. Muitos dos sistemas de expulsão activa do antibiótico não são específicos para uma classe de antibióticos, podendo eliminar da célula bacteriana uma elevada gama de compostos estruturalmente distintos, incluindo várias classes de antibióticos, estando por isso muitas vezes associados a estirpes multirresistentes. Os genes que codificam as proteínas membranares que funcionam como bombas de efluxo, tanto se encontram em plasmídeos como no cromossoma. A actividade de algumas bombas de efluxo pode ser induzida pela exposição ao substrato, de modo que uma estirpe inicialmente susceptível a um antibiótico pode tornar-se resistente (Poole, 2005; Piddock, 2006; Sousa e Peixe, 2010).

As bombas de efluxo são agrupadas em cinco famílias de acordo com a sequência de aminoácidos das proteínas, a família ABC (ATB-Binding Casser), família MFS (Major Facilitator Superfamily), família RND (Resistance-Nodulation.Division), família SMR (Small Multidrug Resistance) e a família MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) (Poole, 2005; Piddock, 2006; Sousa, 2006). As bombas de efluxo podem actuar associadas com outros mecanismos de resistência, aumentando desse modo o nível e a amplitude do espectro de resistência aos antibióticos (Van Bambeke *et al.*, 2003).

Modificação dos alvos de actuação

Estudos realizados em bactérias não produtoras de β -lactamases, de forma ao mecanismo de inibição enzimática do antibiótico não interferir com o mecanismo de modificação do alvo, mostraram que as bactérias são capazes de modificar as enzimas localizadas na membrana plasmática responsáveis pela união do peptidoglicano durante a biosíntese da parede celular (Moreillon, 2000). As enzimas envolvidas nesta união são denominadas de proteínas de ligação à penicilina (PBPs – do inglês “*Penicillin-Binding-*

Proteins”), devido à penicilina e derivados serem um análogo dos precursores do peptidoglicano que se une às enzimas, bloqueando o seu prolongamento (Sousa, 2006).

O número de PBPs e a sua natureza varia de espécie para espécie bacteriana, sendo que as PBPs são específicas da espécie. *Escherichia coli* possui 7 PBPs, que se encontram subdivididas em dois grupos: baixo peso molecular e alto peso molecular. Mutações nos genes produtores de PBPs, recombinações homólogas entre genes de PBPs ou a síntese de novos PBPs sem grande afinidade para os β -lactâmicos conferem às estirpes resistência a estes antibióticos (Wilke *et al.*, 2005; Sousa, 2006).

Inibição enzimática do antibiótico

O principal mecanismo de resistência bacteriana (intrínseca e adquirida) aos β -lactâmicos é devida à produção de enzimas inactivadoras dos antibióticos β -lactâmicos, denominadas β -lactamases (codificadas pelo gene *bla*). Estas enzimas são produzidas por aeróbios e anaeróbios Gram-positivo e negativo. Estas hidrolisam o anel β -lactâmico do antibiótico impedindo que este atinja o seu alvo de actuação (PBPs). Os genes codificadores destas enzimas encontram-se localizados no cromossoma ou em plasmídeos (Gupta, 2007; Babic *et al.*, 2006; Sousa, 2006; Sousa e peixe, 2010).

De entre as β -lactamases mediadas por plasmídeo, o gene *bla*_{TEM-1} é o mais encontrado em *E. coli* (Cooksey *et al.*, 1990). A presença de um grupo de β -lactamases TEM, designados por “Inhibitor-Resistant TEMs” em *E. coli* torna as bactérias resistentes aos β -lactâmicos, bem como ao inibidor de β -lactamases (ácido clavulânico). Esta resistência pode ser explicada pela sobreprodução de β -lactamases TEM ou por modificações na estrutura do gene (Belaouaj *et al.*, 1994).

Muitas espécies bacterianas, incluindo *E. coli*, contêm β -lactamases codificadas cromossomicamente, denominadas enzimas AmpC. Estes genes expressam-se normalmente a um baixo nível em *E. coli*, o que não é suficiente para atribuir resistência. Por vezes verifica-se uma sobreexpressão do gene cromossómico *ampC*, aumentando a actividade enzimática tornando as bactérias resistentes. A sobreexpressão é causada pela duplicação do gene ou por mutações nos genes *ampC* (Li *et al.*, 2007).

Por mutações ocorridas nos genes que codificam a produção β -lactamases, estas podem tornar-se mais eficazes, conferindo resistência a todos os β -lactâmicos, excepto carbapenemos e cefamicinas, sendo denominadas de β -lactamases de amplo espectro (BLAE) (Moreillon, 2000; Bush, 2001).

1.5. β -lactamases

As β -lactamases são enzimas plasmídicas ou cromossômicas que provocam a hidrólise do anel β -lactâmico, tornando estes antibióticos em compostos biologicamente inactivos, antes de estes atingirem as PBPs. As enzimas β -lactamases são estrutural e funcionalmente próximas das PBPs, indicando que terão evoluído a partir destas enzimas, provavelmente, devido à pressão selectiva exercida pelos antibióticos β -lactâmicos, produzidos por microrganismos que se encontram no meio ambiente (Moreillon, 2000; Poole, 2004; Sousa, 2006).

A primeira β -lactamase foi descrita em 1940 por Abraham e Chain, quando observaram a inactivação da penicilina por estirpes de *Escherichia coli*, denominando estas enzimas de penicilinas. De salientar que a primeira β -lactamase foi descrita antes da utilização terapêutica da penicilina (Bradford, 2001; Poole, 2004; Gupta, 2007). Desde então já foram identificadas centenas de diferentes β -lactamases, isoladas a partir de diferentes bactérias Gram-positivo e negativo. Tem-se verificado um aumento da disseminação das β -lactamases ao longo dos anos. Tal facto deve-se à integração dos genes que codificam a resistência aos β -lactâmicos em elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposões e integrões) (Poole, 2004; Weldhagen, 2004; Wilke *et al.*, 2005; Babic *et al.*, 2006).

As β -lactamases são divididas em dois grandes tipos, as serino- β -lactamases (têm serina no centro activo) e as metalo- β -lactamases (têm iões zinco no centro activo). As β -lactamases que possuem serina no centro activo acilam os antibióticos β -lactâmicos e quebram a ligação amida do anel β -lactâmico, dando origem a um intermediário acil-enzima, que catalisa a desacetilação muito eficazmente. As metalo- β -lactamases diferem das serino- β -lactamases porque não há a formação de um intermediário, fazendo o ataque directo ao anel β -lactâmico. As serino- β -lactamases são predominantes, podendo distinguir-se facilmente no laboratório das dependentes do zinco (são inibidas pela adição de EDTA) (Babic *et al.*, 2006; Sousa, 2006; Sousa e Peixe, 2010). As β -lactamases dependendo da sua especificidade são, muitas vezes, chamadas penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas (Sousa, 2006).

1.5.1. Classificação das β -lactamases

A denominação das β -lactamases tem sido anárquica, sendo designadas de acordo com: **1)** o nome do doente em que foram isolados (ex: TEM, isolado de uma estirpe de *E. coli* de uma doente grega com Temonieira); **2)** o seu substrato (ex: OXA, actividade contra oxacilina); **3)** as suas propriedades bioquímicas (ex: CTX, com maior actividade contra cefotaxima) ou **4)** o nome do hospital, em que foi isolado (ex: MIR, Miriam Hospital) (Sousa, 2006).

A grande diversidade de β -lactamases isoladas nas últimas décadas tornou imprescindível a existência de um sistema de classificação que facilitasse a sua identificação. As diferentes β -lactamases conhecidas foram classificadas por diversos autores com base em diferentes características, nomeadamente, no seu suporte genético (cromossómico, plasmídico, transposição ou integração), sequência aminoacídica, modo de produção (constitutiva ou indutível) e espectro hidrolítico (penicilinase, cefalosporinase, carbapenemase, etc.). Actualmente dois sistemas de classificação são considerados como de maior importância: a classificação de Ambler e a classificação de Bush-Jacoby-Medeiros (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995; Gupta, 2007; Sousa e Peixe, 2010).

Em 1980, Ambler propôs uma classificação de acordo com a sequência de aminoácidos nas moléculas das β -lactamases. Ambler dividiu as β -lactamases em quatro classes principais: classe A onde se encontram as β -lactamases de amplo espectro, classe B onde são incluídas as metalo- β -lactamases, classe C as β -lactamases cromossómicas e a classe D onde se encontram as oxacilinas (Ambler, 1980). A classificação de Bush-Jacoby-Medeiros relaciona o perfil do substrato e dos inibidores com a sua estrutura molecular, agrupando as β -lactamases em quatro grupos funcionais (1, 2, 3 e 4). No grupo 1 encontram-se as cefalosporinas, que não são inibidas pelo ácido clavulânico; ao grupo 2 pertencem as penicilinas, cefalosporinas e β -lactamases de amplo espectro inibidas por inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam); o grupo 3 engloba as metalo- β -lactamases que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos e não inibidas pelos inibidores das β -lactamases; por último, o grupo 4 que engloba as penicilinas que não são inibidas pelo ácido clavulânico (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995).

1.5.2. β -lactamases de amplo espectro (BLAE)

Nos últimos 20 anos, vários antibióticos β -lactâmicos foram formulados, com o intuito de serem resistentes à acção das β -lactamases das estirpes bacterianas. No entanto, o aparecimento de novas β -lactamases resistentes aos novos antibióticos usados, devido à pressão selectiva exercida pelos mesmos, não se revelou um fenómeno invulgar. As cefalosporinas foram um grupo de antibióticos amplamente usado em clínica nos anos 80. Deste modo o aparecimento de resistência a estes antibióticos β -lactâmicos de largo espectro não tardou a ocorrer (Bradford, 2001).

O primeiro relato de estirpes capazes de hidrolisar estes antibióticos β -lactâmicos, ocorreu na Alemanha em 1983, onde enzimas do tipo SHV foram isoladas de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. A análise destas estirpes demonstrou que a resistência se devia à produção de uma β -lactamase derivada de SHV-1, sendo denominada SHV-2 (Bradford, 2001; Bush, 2001; Junior *et al.*, 2004). Devido ao facto do aumento do espectro de acção, especialmente contra as cefalosporinas de terceira e quarta geração, estas enzimas passaram a ser denominadas de β -lactamases de amplo espectro (BLAE). Estas enzimas BLAE evoluíram a partir de mutações pontuais no centro activo das β -lactamases clássicas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 (Bush, 2001; Samaha-Kfour e Araj, 2003; Sousa, 2006).

Segundo Paterson e Bonomo, as β -lactamases de amplo espectro (BLAE) são definidas como enzimas capazes de conferir a resistência das bactérias às penicilinas, às cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração e ao aztreoname (mas não às cefamicinas ou aos carbapenemos) através da hidrólise do anel β -lactâmicos destes antibióticos, sendo inibidas pelos inibidores das β -lactamases, tal como o ácido clavulânico (Paterson and Bonomo, 2005).

Escherichia coli e *Klebsiella* spp. são as bactérias onde mais comumente se verifica a produção de β -lactamases de amplo espectro, contudo, já foram detectadas em diversas espécies de *Enterobacteraceae*. Actualmente existem centenas de diferentes tipos de BLAE descritas (Bradford, 2001; Junior *et al.*, 2004).

A presença destas enzimas em estirpes bacterianas potencialmente patogénicas constitui um grave problema no tratamento de doenças infecciosas (Junior *et al.*, 2004). Diversos autores têm verificado um aumento de *E. coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro (BLAE) de isolados de animais destinados ao consumo humano, animais de companhia e mesmo animais selvagens (Costa *et al.*, 2004; Costa *et al.*,

2008a; Machado *et al.*, 2008; Poeta *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009; Poeta *et al.*, 2009; Carneiro *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2010; Radhouani *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2011).

1.6. Resistência natural e adquirida aos antibióticos

A resistência bacteriana pode ser natural (intrínseca) ou adquirida. A resistência natural é um fenómeno que ocorre de forma natural na ausência de pressão selectiva dos antimicrobianos, sendo baseada em genes presentes nos cromossomas e que normalmente não são transferíveis. A resistência natural observa-se em todos os membros de uma mesma espécie ou género, independentemente do seu local de isolamento (Sefton, 2002; Sousa e Peixe, 2010).

A resistência adquirida ocorre numa porção variável de isolados de uma espécie ou género, sendo também variável ao longo do tempo e, resulta da aquisição de um ou mais mecanismos de resistência. Este tipo de resistência resulta da activação, mutação ou aquisição horizontal de genes que expressam um mecanismo bioquímico que possibilita a sobrevivência, e eventualmente, a multiplicação da célula microbiana na presença de uma concentração de antibiótico à qual era anteriormente sensível (Huycke *et al.*, 1998; Sefton, 2002; Sousa e Peixe, 2010). A resistência adquirida pode ser classificada de permanente ou temporária. A resistência temporária pode ser classificada de adaptativa e depende das condições de crescimento das bactérias, ao passo que a permanente depende de mutações ou da aquisição de DNA extrínseco (Pereira, 2010).

De salientar que, os antibióticos não causam mutações, mas a que a sua utilização tende a seleccionar mutantes espontâneos pré-existentes que são resistentes. A transmissão de DNA entre as bactérias pode ocorrer via transformação (processo muito eficiente onde o DNA do dador é integrado no cromossoma do receptor), transdução (transferência genética mediada por bacteriófago) ou conjugação (processo pelo qual o DNA é transferido por contacto celular, de um dado para um receptor), sendo a conjugação a via mais importante (Sefton, 2002).

Várias estirpes bacterianas podem apresentar resistência natural ou intrínseca a diversos antibióticos. Além da resistência intrínseca a muitos antibióticos, determinadas estirpes adquiriram, ainda, resistências mediadas por elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposões e os genes cassette dos integrões).

1.7. Elementos genéticos de aquisição e transferência de genes de resistência

Eventos de recombinação homóloga ou não homóloga ocorrem frequentemente entre Elementos Genéticos Móveis (EGM) e o cromossoma das células hospedeiras. Por isso, torna-se muitas vezes difícil identificar qual a origem de alguns módulos genéticos que aparecem nos cromossomas. Contudo, os EGM mais promíscuos transportam genes que não estão normalmente no cromossoma entre os chamados genes *housekeeping*. Estes genes, ditos acessórios, podem desempenhar papéis relevantes nas doenças infecciosas, na ecologia ou na biotransformação (Pereira, 2010).

Os primeiros genes acessórios transportados por plasmídeos descritos foram os genes de resistência aos antibióticos no final da década de 60. O aparecimento de estirpes patogénicas multirresistentes aos antibióticos foi o fenótipo que levou à descoberta do factor R (plasmídeos que codificam genes de resistência aos antibióticos). A caracterização dos factores R mostrou que a multirresistência aos antibióticos pode ser transferível entre os membros das floras bacterianas e que esta propriedade é favorecida pela presença dos agentes selectores. Estas observações alertaram a comunidade científica para o papel dos EGM (plasmídeos, transposões e os genes cassete dos integrões) na dispersão da multirresistência, pondo em risco a utilidade dos antibióticos no tratamento das doenças bacterianas e para as consequências nefastas da má utilização dos antibióticos (Griffiths *et al.*, 1998; Pereira, 2010).

Os genes que conferem resistência aos antibióticos presentes nas bactérias que colonizam o Homem provêm de várias fontes, sendo uma das mais importantes as bactérias produtoras de antibióticos. Estes genes tornam-se móveis, por exemplo, ao serem flanqueados por sequências de inserção, formando transposões compostos que lhes conferem a capacidade de saltar para outras replicões os quais veiculam a sua dispersão por vários grupos bacterianos (Pereira, 2010).

A aquisição de novos genes por transferência horizontal está na origem da emergência de novas epidemias causadas por bactérias comensais. Como no caso de *Escherichia coli*, bactéria da microbiota do tubo digestivo dos mamíferos, que pode causar vários tipos de patologias, dependendo do conjunto de genes de virulência que adquiriu. As estirpes uropatogénicas de *Escherichia coli*, podem ter mais um milhão de pares de bases do que a estirpe de referência K-12 (Pereira, 2010).

É possível que no mesmo elemento genético se localizem vários genes, implicados na resistência a famílias de antibióticos distintas, o que acarreta a existência

de bactérias com fenótipos de multirresistência e possibilita à co-selecção conjunta. De referir ainda que os EGM podem também servir de veículo para a transferência de genes que codificam toxinas e outros factores de virulência (Griffiths *et al.*, 1998; Pereira, 2010).

1.7.1. Plasmídeos

Os plasmídeos são moléculas de DNA de cadeia dupla, que se replicam e perpetuam independentemente do cromossoma bacteriano. Estão largamente distribuídos por todas as espécies de procariotas, não são essenciais para a célula bacteriana, mas podem conferir novas funções que poderão ser vantajosas em determinadas condições ambientais, o que facilita a sobrevivência e propagação da espécie. O número de cópias de um plasmídeo por cromossoma pode ser restringido ou não. Genes de resistência aos antibióticos e anti-sépticos, genes de factores de virulência e de enzimas, ou ainda, genes que codificam para a síntese de antibióticos, podem ser veiculados por plasmídeos (Griffiths *et al.*, 1998; Sáenz, 2004; Pereira, 2010).

O leque de bactérias onde um plasmídeo se pode replicar é variável. Há plasmídeos que só se replicam em estirpes bacterianas de géneros aparentados, como o factor F, que se transfere apenas entre enterobactérias aparentadas com *Escherichia coli*. Outros, apresentam um espectro mais alargado de grupos bacterianos onde podem circular. Estes plasmídeos encontram-se quer em bactérias Gram-negativo, quer em bactérias Gram-positivo (Griffiths *et al.*, 1998; Pereira, 2010).

Uma bactéria poderá conter plasmídeos que não se encontrem em número expressivo e, que contenham genes de resistência a antibióticos. No entanto, no caso de haver uma pressão selectiva devido ao uso de antibióticos, verificasse uma selecção das estirpes bacterianas que possuem estes plasmídeos. Um único plasmídeo pode conter vários genes codificadores de resistência e conferir um fenótipo multirresistente à estirpe onde se insere. No entanto, as bactérias não necessitam de plasmídeos para sobreviver, e muitos deles perdem-se na ausência de pressão selectiva (Sáenz, 2004; Bennett, 2008).

Uma das maiores dificuldades da terapêutica no combate às infecções causadas por bactérias verifica-se devido à transferência dos plasmídeos que possuem genes de resistência. Os plasmídeos podem, ainda, estar semi-inseridos em outros elementos genéticos móveis, como integrões e transposões. A obtenção de novas resistências é,

maioritariamente, devida a transferência destes elementos genéticos (Sáenz, 2004; Pereira, 2010).

1.7.2. Transposões

Os transposões são segmentos de DNA linear delimitados por sequências de nucleótidos repetidas e invertidas, podem saltar de um local para outro de uma replicação, ou entre replicações, de forma independente das funções da célula hospedeira. A recombinação por transposição é ilegítima, visto que ocorre sem haver homologia entre sequências do transposon e do DNA alvo e, é mediada pela ação de uma enzima particular, a transposase. Os transposões codificam para a sua própria transposase e podem transportar múltiplas funções, tais como resistência aos antibióticos, factores de virulência entre outras. Mais de 500 transposões diferentes foram caracterizados oriundos de um vasto leque de grupos bacterianos (Griffiths *et al.*, 1998; Sáenz, 2004; Pereira, 2010).

Os transposões mais simples, as sequências de inserção (IS), são constituídos apenas por um segmento que codifica para a transposase e são delimitados por sequências idênticas, ou muito semelhantes, de repetição invertida. O tamanho das IS varia entre 780 pb a 2,5 kb. Cada tipo de IS tem as suas próprias sequências invertidas de comprimento diverso entre 15 a 25 pares de bases. A presença de vários transposões num mesmo plasmídeo é frequente, sendo possível que numa só transferência entre células bacterianas possa haver a troca de vários genes de resistência (Madigan *et al.*, 2000; Pereira, 2010). De notar que todos os genes de resistência estão incluídos em transposões compostos e não compostos, evidenciando a importância destes elementos na evolução para a multirresistência (Pereira, 2010).

1.7.3. Integrões

Os integrões foram descritos no início dos anos 80 e possuem a informação genética para codificar uma proteína capaz de integrar ou libertar elementos móveis tais como os genes de resistência aos antibióticos. Esta proteína, denominada integrase, integra genes (os genes cassette) nos integrões. Este mecanismo ocorre mediante recombinação específica e verifica-se que os integrões possuem, também, um promotor que permite, posteriormente, a expressão dos genes recentemente integrados. As

integrases podem promover a evolução de elementos genéticos móveis. Em todos os transposições, o local de inserção (*att*) está flanqueado à esquerda (extremidade 5') por um segmento que inclui um gene que codifica uma integrase/recombinase (*int*) e um promotor forte P (P2) e à direita (extremidade 3'), por um segmento conservado que contém o gene de resistência às sulfonamidas (*sul1*), a este conjunto chama-se integração. Por vezes, verifica-se a existência de dois promotores, sendo que o segundo apenas incrementa o grau de expressão dos genes integrados (Carattoli, 2001; Sáenz, 2004; Pereira, 2010).

Os genes cassette podem aparecer sob a forma de moléculas circulares de DNA, mas nos integrões é mais frequente encontrá-los como sequências lineares. Os genes cassette possuem, geralmente, apenas um gene sendo na sua maioria de resistência a antibióticos, encontrando-se na sua extremidade 3' uma sequência de recombinação específica (*attC*). A integrase reconhece esta sequência *attC* e, através do local receptor (*att*), permite tanto a integração dos genes como a sua extração (Sáenz, 2004; Pereira, 2010). A ligação *att-attC* é mais específica que a ligação *attC-attC*, assim, quando há inserção de um novo gene cassette, este vai ficar mais perto do(s) promotor(es) do que o gene cassette mais antigo. O novo gene, como fica colocado mais perto do(s) promotor(es), vai ter uma maior expressão (Collins and Hall, 1995).

Através da sequência da integrase foi possível diferenciar 9 classes diferentes de integrões, sendo que nem todas possuem genes cassette codificadores de resistências a antibióticos. Os integrões mais frequentes (integrões de classe 1), caracterizam-se por possuir duas regiões conservadas, a 5' onde se encontra o gene da integrase (*int*) e a 3' onde se encontra os genes *qacEΔ1* e *sul1*, associados à resistência a compostos amónio quaternário e à resistência a sulfonamidas, respectivamente. Possuem ainda um fragmento de leitura "open reading frame" (ORF) denominado *orf513* (Carattoli, 2001; Sáenz, 2004; Sousa e Peixe, 2010).

Os integrões presentes em alguns tipos de transposições captam genes de resistência móveis, construindo unidades modulares de multiresistência. Através deste tipo de mecanismo consegue-se reunir vários módulos de genes de resistência no mesmo plasmídeo, que pode ser transferido para outras bactérias em apenas um evento conjugativo (Pereira, 2010).

Esta variabilidade na susceptibilidade bacteriana aos antibióticos justifica a realização do antibiograma, de forma a conduzir a uma adequada escolha terapêutica. Mutações em genes específicos ou a aquisição horizontal de genes de resistência

localizados em DNA móvel (plasmídeos e transposões), constituem as bases genéticas dos mecanismos de resistência adquirida. Pela possibilidade de rapidamente proporcionarem adaptação resultante do uso de múltiplos antibióticos, os elementos genéticos transferíveis que codificam resistência assumem uma particular importância (Pereira, 2010; Sousa e Peixe, 2010).

1.8. Factores de virulência

A aquisição de factores de virulência reflecte o resultado de um processo de selecção natural após exposição de um microrganismo aos mecanismos de defesa de um hospedeiro. Quando uma bactéria se replica quer no meio ambiente, quer num hospedeiro ou quando passa de um hospedeiro para outro diferente ou quando muda de compartimento dentro do mesmo hospedeiro, a expressão de diferentes factores de virulência é induzida de modo a melhor adaptar o microrganismo ao *habitat* onde necessita sobreviver e proliferar (Appelberg, 2010).

A evolução da virulência das bactérias ocorre de diversas vias. Recentemente, com base em estudos genómicos, tem-se tornado claro que a transferência genética horizontal é uma das principais vias de aquisição de factores de virulência entre bactérias (Appelberg, 2010; Pereira, 2010).

A aquisição de novos genes por transferência horizontal está na origem de emergência de novas epidemias causadas por bactérias comensais. Por exemplo, a habilidade de *E. coli* causar doença em humanos é devida à expressão do conjunto de genes de virulência que adquiriu (Pereira, 2010). Os genes responsáveis pela codificação dos factores de virulência podem estar localizados tanto no cromossoma como em plasmídeos ou fagos. No cromossoma, os genes que codificam os factores de virulência são encontrados em zonas do cromossoma bacteriano com características peculiares e conhecidas como ilhas de patogenicidade (PAI) (Appelberg, 2010).

A patogenicidade das estirpes de *E. coli* é caracterizada pela forma como a bactéria se liga ao hospedeiro, à produção de toxinas e ao modo de invasão. Entre os factores de virulência mais comumente encontrados, salientam-se: **1-** endotoxinas (antigénio O da parede celular), correspondem a lipopolissacáridos (LPS) presentes na parede bacterianas; **2-** exotoxinas (verotoxinas-VT, enterotoxinas); **3-** propriedades que permitem a multiplicação em meios com restrição de ferro (sideróforos), através da produção de hemolisina; **4-** multirresistência aos antibióticos; **5-** colonização celular,

presença de fímbrias (adesinas) ou pili e; **6-** presença de flagelos (antigénio H) (Sussman, 1997).

A patogenicidade em *E. coli* é um mecanismo multifactorial e complexo que, por norma, envolve vários factores de virulência. Por vezes, a presença de um único factor de virulência numa estirpe de *E. coli* comensal não a torna patogénica, sendo necessária a combinação de mais factores de virulência para que a estirpe em causa se torne patogénica. Os factores de virulência conferem uma vantagem selectiva relativamente às estirpes que os possuem em comparação com as estirpes comensais que não os manifestam (Kuhnert *et al.*, 2000).

1.9. Grupos filogenéticos em *Escherichia coli*

Devido a fenómenos evolutivos vários grupos bacterianos têm-se separado dentro da mesma espécie. A existência de distintos grupos filogenéticos ou “sub-espécies” em *Escherichia coli* há muito que é conhecida e que se encontra documentada (Wirth *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 2008). Actualmente, existem quatro grupos filogenéticos distintos e devidamente identificados, os grupos A, B1, B2 e D (Clermont *et al.*, 2000).

Os diferentes grupos filogenéticos foram descritos através da electroforese de enzimas multilocus (MLEE) e de “Multilocus Sequence Typing” (MLST). No entanto, estas técnicas são complexas e muito trabalhosas (Clermont *et al.*, 2000). Posto isto, Clermont e colaboradores (2000) desenvolveram uma metodologia, com base na combinação de três PCR distintas, para que de uma forma mais rápida e simples se pudesse classificar filogeneticamente *Escherichia coli* (Clermont *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2008).

A metodologia desenvolvida por Clermont e colaboradores, (2000) para a caracterização filogenética de *E. coli* (Figura 2), baseia-se na combinação de três PCR distintas, tendo como base a presença ou ausência do: **i)** gene *chuA*, que se encontra relacionado com o transporte de ferro em *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 (Bonacorsi *et al.*, 2000; Torres and Payne, 1997); **ii)** do gene *yjaA* cuja função ainda é desconhecida (identificado no genoma de *E. coli* K12) (Blattner *et al.*, 1997) e; **iii)** um fragmento de DNA designado TspE4.C2 (Clermont *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2008).

Estudos demonstraram que, as estirpes virulentas classificam-se, regra geral, no grupo B2, porém algumas podem ser classificadas no grupo D. Por outro lado, os isolados comensais pertencem aos grupos A e B1 (Sabaté *et al.*, 2006).

As estirpes dos quatro grupos filogenéticos diferem entre si ao nível das características fenotípicas, incluindo a habilidade na utilização de diferentes açúcares, perfil de resistência a antibióticos, bem como a temperatura óptima de crescimento (Gordon *et al.*, 2008). A distribuição (presença ou ausência) de determinados factores de virulência, assim como os seus nichos ecológicos, também sofre variações ao longo dos diferentes grupos filogenéticos (Johnson *et al.*, 2001a).

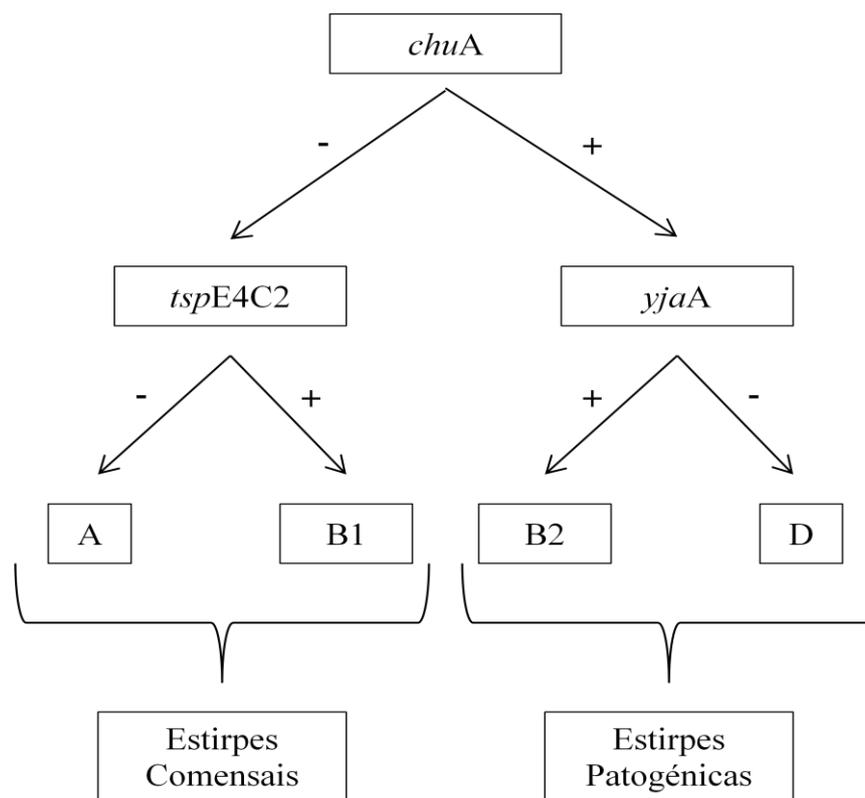


Figura 2: Esquema representativo do sistema de PCR que permite identificar o grupo filogenético, em estirpes de *E. coli* (Clermont *et al.*, 2000).

As estirpes pertencentes aos grupos filogenéticos A e B1, são estirpes tipicamente comensais, sendo excepcionalmente, descritas como causa de infecções extra-intestinais. Nos casos onde são descritas como causa de infecções extra-intestinais, tal é devido à transferência horizontal de genes codificadores de virulência (Johnson *et al.*, 2001a; Johnson *et al.*, 2001b; Sabaté *et al.*, 2006).

A maioria das estirpes extra-intestinais de *E. coli*, bem como a maioria dos factores de virulência extra-intestinais pertencem ao grupo filogenético B2. Neste grupo

filogenético encontram-se alguns dos clones mais virulentos de *E. coli*, como por exemplo o O18:K1:H7 e o O4:K12:H5 (Johnson *et al.*, 2001a; Johnson *et al.*, 2002; Sabaté *et al.*, 2006).

O grupo filogenético D é o segundo grupo mais comumente envolvido em infecções extra-intestinais, possuindo um menor número de factores de virulência quando comparado com o grupo filogenético B2. Clones como o O15:K52:H1 e o O7:K1:H-, pertencem a este grupo (Johnson *et al.*, 2001a; Sabaté *et al.*, 2006).

1.10. Interesse do estudo da resistência aos antibióticos em isolados de *E. coli* obtidos de carne de frango. Um problema de Segurança Alimentar

O desenvolvimento de resistência aos antibióticos está associado a mutações espontâneas e à transferência horizontal de elementos genéticos móveis e mobilizáveis que possuem determinados genes. Estes eventos conferem variabilidade genética aos microrganismos, que se torna vantajosa em ambientes com elevada pressão selectiva (Kapil, 2005; Linares-Rodrigues and Martínez-Menéndez, 2005; Pereira, 2010).

Devido ao facto de se encontrar em diferentes nichos ecológicos como a microflora intestinal de humanos e animais, amostras ambientais (água, alimentos), assim como em situações clínicas, *E. coli* pode servir como “indicador de resistência” dado que é submetida a diferentes situações de stress pelo uso de antibióticos, o que facilita a aquisição e disseminação de determinantes de resistência. O uso de *E. coli* como bactéria “indicadora” é também importante porque uma alteração nos níveis de resistência a distintos antibióticos nesta espécie bacteriana pode servir como “indício” antecipado da resistência em bactérias potencialmente patogénicas. *E. coli* é ideal para realizar estudos de vigilância da resistência em distintos ecossistemas com o objectivo de analisar a sua evolução no tempo e de poder dispor de dados que permitam levar a bom termo políticas de uso prudente de antibióticos (Oteo *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 2003; Schroeder *et al.*, 2004; Oguttu *et al.*, 2008).

Septicemia ou colibacilose, causada por *E. coli*, são patologias comuns em aves de exploração, que por vezes surgem como infecção secundária a outras (invasor oportunista). Actualmente, *E. coli*, é tida como um dos principais agentes patogénicos em clínica avícola, sendo uma das principais razões para o uso de antibióticos com fins medicinais nestes animais (Gross, 1991; Jordan, 2001). O uso generalizado de antibióticos no ambiente de produção animal, como agentes terapêuticos veterinários,

profilácticos ou promotores de crescimento tem, nos últimos anos, seleccionados isolados bacterianos com resistência múltipla. O possível impacto dos antibióticos e das bactérias resistentes na saúde pública, ao longo das últimas décadas, impeliu a União Europeia a abolir progressivamente a utilização de antibióticos como promotores de crescimento animal, tendo este processo culminado em Janeiro de 2006 (Casewell *et al.*, 2003; Regulamento (CE) nº1831/2003).

Um estudo realizado em 2004 por Yang e colaboradores, revelou que serótipos patogénicos de *E. coli* em aves, apresentavam uma elevada capacidade de dispersão entre animais criados na mesma exploração. Deste modo verifica-se que estes serótipos são os que mais vezes são expostos aos antibióticos, sofrendo conseqüentemente uma maior pressão selectiva (Yang *et al.*, 2004).

Pelo facto de a maioria dos animais ser naturalmente colonizados por *E. coli* no seu tracto gastrintestinal, não é de surpreender o seu isolamento em alimentos de origem animal. A exposição da carne a contaminações por microrganismos ocorre em todas as fases do ciclo da cadeia alimentar, que tem início nos matadouros e que acaba no mesa do consumidor. Os alimentos de origem animal podem ser contaminados de vários modos, sendo que, as principais vias de contaminação destes alimentos são, a contaminação durante o abate, principalmente durante a evisceração dos animais, ou através de processos de contaminação indirecta, por contacto dos alimentos com água, superfícies, materiais ou mesmo manipuladores. No caso de contaminação indirecta os alimentos são colonizados devido ao contacto com manipuladores, superfícies, materiais ou água contaminados (contaminação fecal) (Schroeder *et al.*, 2003; Janda and Abbott, 2006).

Em ambos os casos pode ocorrer uma posterior disseminação do problema por manuseamento incorrecto, nomeadamente o abuso de temperaturas de conservação ou tratamento térmico inadequado. No caso de haver contaminação indirecta dos alimentos, a contaminação deve-se a uma falta de higiene na manipulação, da limpeza e/ou desinfecção das superfícies e/ou materiais que contactam directamente com o alimento ou mesmo dos manipuladores (Schroeder *et al.*, 2003; Janda and Abbott, 2006).

Deste modo, as estirpes multirresistentes podem infectar o Homem directamente, por contacto, ou indirectamente, através da ingestão de carne que não tenha sofrido um tratamento térmico capaz de eliminar *E. coli*. Conseqüentemente, estas estirpes colonizam o tracto gastrintestinal humano, contribuindo assim com genes de resistência para a microflora endógena e que podem ser trocados entre diferentes bactérias. Deste

modo, pode ocorrer selecção de bactérias com mecanismo de resistência aos antibióticos, não só a bactérias comensais como, também, a bactérias clínicas causadoras de infecção. É de extrema importância referir que *Escherichia coli* possui uma capacidade exímia para adquirir e transmitir genes de resistência, mesmo a bactérias filogeneticamente afastadas (Martel *et al.*, 2003; Sáenz, 2004; Schroeder *et al.*, 2004; Costa, 2006).

CAPÍTULO 2 - OBJECTIVOS

Nos últimos anos tem aumentado a preocupação acerca da segurança dos alimentos que ingerimos. Neste despertar de consciência, a primeira preocupação recai sobre as etapas da cadeia alimentar mais próximas da nossa condição inata de consumidores. No entanto, hoje sabemos que quanto mais cedo começarmos a tomar medidas para evitar a presença de perigos para a saúde pública, melhores resultados teremos a jusante, uma vez que alguns perigos para a saúde pública podem aparecer logo no início da cadeia de produção de alimentos. Neste sentido e devido à propagação de resistência aos antibióticos ao longo de toda a cadeia alimentar, diversas organizações aconselham a implementação de programas de vigilância relativamente a bactérias isoladas de animais, alimentos e humanos, ao longo de toda a cadeia alimentar.

Hoje em dia, por questões de saúde, o consumo de carnes brancas, como a de frango, é cada vez mais elevado, sendo umas das carnes mais consumidas. Sabe-se que na produção intensiva de aves, *E. coli* é um dos principais agentes causadores de doença.

Neste sentido, este trabalho tem por objectivo estudar a colonização e a resistência aos antibióticos em estirpes de *E. coli* provenientes de amostras de carne de frango destinada a consumo humano, tendo como especial interesse, a pesquisa de estirpes produtoras de β -lactamases de amplo espectro (BLAE), bem como a pesquisa da presença de factores de virulência.

Os objectivos específicos deste trabalho são:

1. Estudar a colonização por estirpes de *E. coli* em amostras de frango (amostras de asas, peito, coxas, pele e moelas) destinado ao consumo humano, a partir de placas com meio de cultura não suplementado com cefotaxima.
 - 1.1- Determinar os fenótipos de resistência a 16 antibióticos (amoxicilina + ácido clavulânico, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, aztreonam, ampicilina, imipenemo, gentamicina, amicacina, tobramicina, cloranfenicol, tetra ciclina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, estreptomicina e sulfametoxazol-trimetropim) e caracterizar o mecanismo de resistência.

2. Estudar a colonização por estirpes de *E. coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro (BLAE), em amostras de frango (amostras de asas, peito, coxas, pele e moelas) destinado ao consumo humano, a partir de placas com meio de cultura suplementado com cefotaxima.
 - 2.1- Determinar os fenótipos de resistência a 16 antibióticos (amoxicilina + ácido clavulânico, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, aztreonam, ampicilina, imipenemo, gentamicina, ampicacina, tobramicina, cloranfenicol, tetraciclina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, estreptomicina e sulfametoxazol- trimetropim) e caracterizar o mecanismo de resistência.
 - 2.2- Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente a resistência aos β -lactâmicos através da produção das β -lactamases de amplo espectro (BLAE).
3. Detectar através de PCR, factores de virulência nas estirpes de *E. coli* isoladas de placas de Levine com suplemento de cefotaxima (2 μ g/ml).
 - 3.1- Identificar os genes codificadores de virulência (*aer*, *fimA*, *papG*, *papC*, *cnf1* e *stx*).
4. Classificar nos respectivos grupos filogenéticos, através de PCR, as estirpes de *E. coli* isoladas de placas de Levine com suplemento de cefotaxima (2 μ g/ml).

CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras de frango

Vinte e nove produtos de frango (6 cuvetes de asas, 6 cuvetes de peito, 6 cuvetes de coxas, 5 cuvetes de moelas) assim como 6 amostras de pele (correspondentes a um número indeterminado de animais), foram analisados para a detecção de isolados de *E. coli* (1 amostra = 1 cuvette) e estudo de resistência a antibióticos, com especial interesse na detecção de β -lactamases de amplo espectro (BLAE). Os produtos foram adquiridos em 3 diferentes supermercados em Vila Real, Portugal, durante o período compreendido entre Setembro e Dezembro de 2007.

3.2. Meios de cultura, provas de identificação e antibióticos utilizados

3.2.1. Meios de cultura

Durante a realização deste trabalho, foram utilizadas diversos meios de cultura necessários para a realização das diversas metodologias utilizadas. Os meios de cultura utilizados no decurso deste trabalho foram (Anexo 1):

- i) **Eosin Methylene Blue Agar (Levine)** – Meio selectivo e diferencial para o isolamento de bactérias entéricas Gram-Negativas.
- ii) **Brain-Heart-Infusion (BHI)** – Meio não selectivo, muito nutritivo, utilizado para o crescimento de bactérias.
- iii) **Mueller-Hinton agar (MH)** – Meio utilizado para a determinação da sensibilidade aos antibióticos.
- iv) **Skim milk** – Meio usado para conservar os isolados a temperaturas de congelação.

3.2.2. Provas de identificação

Para identificar com exactidão as colónias que correspondiam a *E. coli* daquelas que se assemelhavam fenotipicamente com esta espécie, procedeu-se à realização das seguintes provas bioquímicas de identificação:

- **Agar - ferro e triplo açúcar (TSI - Triple Sugar Iron):** prova de identificação que tem por base a capacidade dos microrganismos fermentarem a sacarose, lactose e/ou glicose e produzirem gás ou sulfureto de ferro.

- **Ureia:** prova de identificação que tem por base o facto de os microrganismos possuírem ou não a enzima urease capaz de hidrolisar a ureia. Para se identificar como positivo ou negativo o teste, verificamos se existe uma mudança de cor no meio devido à hidrólise da ureia.

- **IMViC – Indol, Metil-Red, Voges-proskauer e Citrato:**

- **Indol** – prova de identificação que consiste num caldo de peptona rico em triptofano, o qual, na presença da triptofanase, é degradado em indol e NH_4^+ . Após 24 horas a 37°C , a reacção positiva é indicada pela formação de um anel vermelho à superfície do meio aquando da adição de reagente de Kovac.
- **Metil-Red (MR)** – prova de identificação que tem por base a capacidade de os microrganismos degradarem a glicose com produção de ácido acético, acetilacético e fórmico, provocando consequentemente uma acidificação do meio. Após inoculação das colónias durante 24 horas a 37°C , num meio composto por glicose-fosfato, a adição do reagente vermelho de metilo permite identificar, através da mudança de cor, se a reacção é positiva.
- **Voges-Proskauer (VP)** - prova de identificação que tem por base a capacidade de os microrganismos degradarem a glicose com produção de acetil-metil-carbinol. Após inoculação das colónias durante 24 horas a 37°C , num meio composto por glicose-fosfato, a adição dos reagentes VP1 (KOH a 40%) e VP2 (α -naftanol a 5% em álcool etílico) permite identificar, através da mudança de cor, se a reacção é positiva.

- **Citrato** – prova de identificação que tem por base a capacidade de os microrganismos utilizarem o citrato de sódio como única fonte de carbono. Após a incubação das bactérias, durante 24 horas a 37°C, a reacção positiva implica a mudança de cor do meio de verde para azul.

Escherichia coli apresenta as seguintes características: fermenta a glicose e lactose com produção de gás no teste do TSI; não possui a enzima urease; possui triptofanase, degradando o triptofano com produção de indol e NH_4^+ ; degrada a glicose com produção de ácido acético, acetilacético e fórmico, sem produção de acetil-metil-carbinol e não utiliza o citrato de sódio como única fonte de carbono [TSI - (+); Ureia - (-), Indol - (+), MR - (+); VP - (-); Citrato - (-)].

- **API (Analytical Profile Index) 20E (bioMérieux)**: o sistema API 20E é uma versão miniaturizada das provas bioquímicas convencionais usada para identificação das *Enterobacteriae* e outros bacilos Gram-negativos. É um sistema de microtubos pronto a usar que permite realizar 20 provas em culturas puras isoladas apropriadamente num meio de cultura.

3.2.3. Antibióticos utilizados

No decorrer deste trabalho foram usados vários antibióticos:

- i) Utilizou-se a cefotaxima 2µg/ml, para incorporar no meio de Levine de forma a isolar as estirpes produtoras de β -lactamases de largo espectro (BLLE).
- ii) Para a realização dos antibiogramas utilizaram-se discos de antibióticos da Oxoid. Foi determinada a sensibilidade aos seguintes antibióticos:
 - Ampicilina – 10µg
 - Ácido nalidíxico – 30µg
 - Tetraciclina – 30µg
 - Sulfametoxazol-trimetropim – 1,25+23,75µg
 - Estreptomicina – 10µg

- Cefoxitina – 30µg
- Aztreonam – 30µg
- Ciprofloxacina – 5µg
- Cloranfenicol – 30µg
- Gentamicina – 10µg
- Amoxicilina + Ácido clavulânico – 20+10µg
- Amicacina – 30µg
- Tobramicina – 10µg
- Imipenemo – 10µg
- Ceftazidima – 30µg
- Cefotaxima – 30µg

Todos os antibióticos foram utilizados segundo as recomendações do CLSI (CLSI, 2010). Os halos de inibição de cada antibiótico estão indicados na tabela 3.

Tabela 3: Antibióticos usados e respectivo valor dos halos de inibição (CLSI, 2010).

Antibiótico	Halos de inibição (mm)		
	Resistente	Intermédio	Sensível
Cloranfenicol	≤12	13-17	≥18
Tetraciclina	≤14	15-18	≥19
Ácido nalidíxico	≤13	14-18	≥19
Ciprofloxacina	≤15	16-20	≥21
Ampicilina	≤13	14-16	≥17
Tobramicina	≤12	13-14	≥15
Amicacina	≤14	15-16	≥17
Gentamicina	≤12	13-14	≥15
Estreptomicina	≤11	12-14	≥15
Amoxicilina + ácido cluvulânico	≤13	14-17	≥18
Ceftazidima	≤14	15-17	≥18
Cefotaxima	≤14	15-22	≥23
Cefoxitina	≤14	15-17	≥18
Aztreonam	≤15	16-21	≥22
Imipenemo	≤13	14-15	≥16
Sulfametoxazol-trimetropim	≤10	11-15	≥16

3.3. Procedimento experimental

3.3.1. Processamento das amostras

A partir das amostras recolhidas, maceraram-se 2 a 3g de cada amostra (1 amostra = 1 cuvete), e posteriormente diluíram-se em solução salina tamponada, de forma a fomentar o crescimento bacteriano. As soluções foram colocadas na estufa a 37°C entre 24 e 48 horas. O restante de cada amostra foi guardado a temperaturas de congelação (-20°C).

Após a diluição, as amostras de frango foram semeadas com o auxílio de uma zaragatoa esterilizada em placas de meio selectivo Levine suplementadas cefotaxima (2µg/ml) e placas não suplementadas com antibiótico. Todas as placas foram, posteriormente, colocadas na estufa a 37°C, durante 24 a 48h. Após sucessivas repicagens, até ao seu completo isolamento, escolheram-se, aleatoriamente, uma colónia por placa, presumivelmente de *E. coli*, a qual foi repicada para meio de BHI agar e colocada a 37°C durante 24 horas, para potenciar o crescimento exponencial da bactéria.

As colónias seleccionadas foram identificadas por métodos microbiológicos, bioquímicos e moleculares de forma a avaliar quais correspondiam efectivamente a *E. coli*. Para tal cada isolado foi submetido à coloração pelo método de Gram e aos testes TSI, ureia, indol, Vermelho de metilo, “Voges-Proskauer” e citrato. As bactérias com morfologia de bacilos, Gram-negativas, com resultados positivos na prova do indol e vermelho de metilo, negativos para “voges-Proskauer”, teste do citrato e para o teste da ureia e que fermentam a glicose e a sacarose com produção de gás, no teste do TSI, foram identificados como sendo *Escherichia coli*. A confirmação desta espécie bacteriana realizou-se usando o sistema API20E.

Por último, os isolados de *E. coli* identificados foram guardados em meio de leite desidratado e de seguida armazenados a -20°C. Todos os cuidados de esterilização foram tomados em consideração, durante a elaboração deste trabalho experimental.

3.3.2. Estudo da sensibilidade a antibióticos

Para se proceder à determinação da sensibilidade a antibióticos, descongelaram-se todas as amostras guardadas e repicaram-se para BHI agar a 37°C, durante 24 a 48h.

Efectuou-se o método da difusão em agar de forma a determinar se os isolados são sensíveis, de sensibilidade intermédia ou resistentes através da técnica de Kirby-Bauer.

3.3.2.1. Método da difusão em agar pela técnica de Kirby-Bauer

Este método foi realizado e interpretado seguindo as normas do CLSI (CLSI, 2010).

Preparação do inóculo: semeou-se uma colónia, proveniente de uma placa com a estirpe pura, em BHI-agar e inocubou-se a 37°C, durante 24 horas. Desta placa, recolheram-se 3 a 4 colónias para um tubo de ensaio com 3ml de solução salina esterilizada (NaCl a 0,9%) até se obter uma turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland.

Inoculação da placa: com o auxílio de uma zaragatoa esterilizada, semeou-se a superfície de uma placa de MH na sua totalidade, de uma forma homogénea. Colocaram-se, de seguida e com a ajuda de uma pinça, os discos de antibiótico (até um máximo de 6 discos por placa). Incubaram-se as placas a 37°C durante 24h e mediram-se, posteriormente, os diâmetros dos halos de inibição de forma a determinar se o isolado é sensível, de sensibilidade intermédia ou resistente.

3.3.2.2. Determinação fenotípica da produção de β -lactamases de amplo espectro (BLAE)

Para verificar fenotipicamente, se os isolados de *E. coli* eram produtores de β -lactamases de amplo espectro (BLAE), colocou-se numa das placas de Muller-Hilton (MH) os antibióticos ceftazidima, cefotaxima, aztreonam e a amoxicilina + ácido clavulânico. Os discos dos antibióticos são colocados a cerca de 2 centímetros entre si e, dispostos como o indicado na Figura 3. Incubou-se a placa a 37 °C durante 24 horas. O fenótipo positivo para produção de BLAE verifica-se quando, junto da área de interface entre os discos de ceftazidima, cefotaxima e aztreonam com o de amoxicilina + ácido clavulânico, se observa uma ampliação do halo de inibição denominada de zona fantasma (“ghost zone”). Este ampliação do halo deve-se à inibição das BLAE por parte do ácido clavulânico, permitindo a actuação da amoxicilina (Figura 3) (Livermore, 1995).

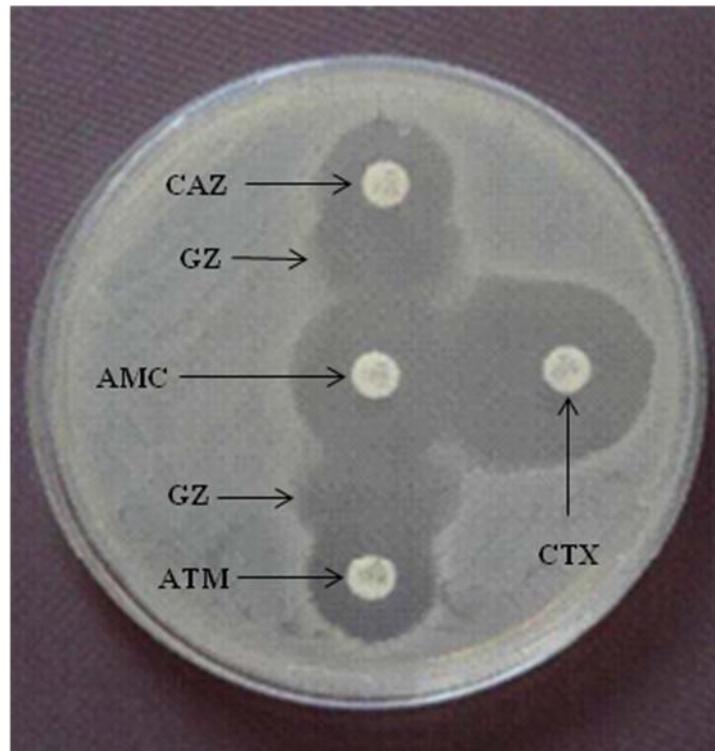


Figura 3: Fenótipo positivo para a produção de β -lactamases de amplo espectro (BLAE) (imagem do autor). AMC- amoxicilina + ácido clavulânico; CAZ- ceftazidima; CTX- cefotaxima; ATM- aztreonam; GZ- “Ghost zone”.

3.3.3. Extração e quantificação de DNA

Para se proceder à extração de DNA de *E. coli* suspendeu-se uma cultura pura, num eppendorf, com 0,5ml de água destilada esterilizada. Colocou-se num banho a 100°C durante 8 minutos, após o qual se agitou vigorosamente no vortex. Centrifugou-se a 12.000 rpm durante 2 minutos.

A quantidade de DNA extraído foi medida com um espectrofotômetro utilizando o aparelho NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific Inc., USA). Após medido o branco com água esterilizada (utilizando a mesma água utilizada para a extração de DNA), inoculou-se 1,5 μ l de DNA da amostra testada, a partir da qual o programa determinou a concentração e a pureza do DNA. O nível de pureza das amostras é indicado pela relação da absorvância a 260 e 280 nm, definindo-se como valores óptimos a absorvância entre 1,80 e 1,90 e a concentração entre 200 e 800 ng. O DNA extraído foi guardado a 4°C.

3.3.4. Reacção em cadeia da polimerase (PCR)

O produto da reacção de PCR foi preparado para um volume final de 50µl, utilizando os componentes descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Componentes e concentrações usadas para a reacção de PCR.

Componentes	Concentração	Volume por tubo	Concentração final da reacção
Primer directo	25µM	1µl	0,5µM
Primer reverso	25µM	1µl	0,5µM
BIOTAQ™ DNA polimerase	5U/µl	0.3µl	1,5U
Tampão de reacção	10X	5µl	1X
MgCl ₂	50mM	1.5µl	1,5mM
dNTP's	10mM	1µl	0,2mM
DNA	-	10µl	-
Água miliQ esterilizada	-	Até perfazer 50µl	-

As reacções em cadeia por acção da polimerase realizaram-se num termociclador Biometra T3000 Thermocycler e, os primers utilizados foram sintetizados por Sigma-Aldrich. Em todas as reacções de PCR inclui-se um controlo positivo e dois controlos negativos (um sem DNA e outro sem primers) substituídos, em ambos os casos, por volume correspondente com água miliQ estéril. Os controlos positivos utilizados fazem parte da colecção da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

3.3.4.1. Primers e condições de PCR utilizados

As sequências dos primers, condições de amplificação da reação de PCR e o tamanho do fragmento de DNA amplificado em cada caso estão descritos nas Tabelas 5 a 8.

Tabela 5: Sequência nucleotídica dos primers de PCR para genes codificadores de resistência a antibióticos em *E. coli*.

Primers (sequência 5' a 3')	Condições de amplificação	Referência (Banda obtida)
<i>gyrA</i> TACACCGGTCAACATTGAGG TTAATGATTGCCGCCGTCGG	92°C 3' 1 ciclo	Oram and Fisher, 1991 (648 pb)
	92°C 25''	
	64°C 1' 32 ciclos	
	72°C 2' 50''	
	72°C 3' 1 ciclo	
<i>parC</i> AAACCTG TTCAGCGCCGCATT GTGGTGCCGTTAAGCAAA	94°C 3' 1 ciclo	Vila <i>et al.</i> , 1996 (395 pb)
	94°C 1'	
	55°C 1' 30 ciclos	
	72°C 1'	
	72°C 3' 1 ciclo	
<i>aadA</i> GCAGCGCAATGACATTCTTG ATCCTTCGGCGCGATTTTG	94°C 5' 1 ciclo	Madsen <i>et al.</i> , 2000 (282 pb)
	94°C 1'	
	60°C 1' 35 ciclos	
	72°C 1'	
	72°C 8' 1 ciclo	
<i>cmlA</i> TGTCATTTACGGCATACTCG ATCAGGCATCCCATTCCCAT	94°C 5' 1 ciclo	Sáenz, 2004 (455 pb)
	94°C 1'	
	55°C 1' 30 ciclos	
	72°C 1'	
	72°C 7' 1 ciclo	
<i>bla</i>_{TEM} ACGCTCAGTGGAACGAAAAC TTCTTGAAGACGAAAGGGC	94°C 3' 1 ciclo	Belaouaj <i>et al.</i> , 1994 (1150 pb)
	94°C 1'	
	60°C 1' 30 ciclos	
	72°C 1'	
	72°C 10' 1 ciclo	
<i>bla</i>_{SHV} CACTCAAGGATGTATTGTG TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	96°C 5' 1 ciclo	Pitout <i>et al.</i> , 1998 (885 pb)
	96°C 15''	
	52°C 15'' 24 ciclos	
	72°C 2'	
	72°C 5' 1 ciclo	

Tabela 5 (continuação): Sequência nucleotídica dos primers de PCR para genes codificadores de resistência a antibióticos em *E. coli*.

Primers (sequência 5' a 3')	Condições de amplificação	Referência (Banda obtida)
<i>bla</i> _{OXA1} ACACAATACATATCAACTTCGC AGTGTGTTTAGAATGGTGATC	96°C 5' 1 ciclo	Steward <i>et al.</i> , 2001 (813 pb)
	96°C 1'	
	61°C 1' 35 ciclos	
	72°C 2'	
	72°C 10' 1 ciclo	
<i>bla</i> _{CTX-M9} GTGACAAAGAGAGTGCAACGG ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	94°C 3' 1 ciclo	Simarro <i>et al.</i> , 2000 (856 pb)
	94°C 45''	
	60°C 45'' 35 ciclos	
	72°C 45''	
	72°C 10' 1 ciclo	
<i>bla</i> _{CTX-M-3G} GTTACAATGTGTGAGAAGCAG CCGTTTCCGCTATTACAAAC	94°C 7' 1 ciclo	Pagani <i>et al.</i> , 2003 (800 pb)
	94°C 50''	
	60°C 40'' 35 ciclos	
	72°C 1'	
	72°C 5' 1 ciclo	
<i>bla</i> _{CMY} GATTCCTTGGACTCTTCAG TAAAACCAGGTTCCAGATAGC	95°C 3' 1 ciclo	Stapleton <i>et al.</i> , 1999 (1800 pb)
	94°C 30''	
	53°C 30'' 30 ciclos	
	72°C 30''	
	72°C 3' 1 ciclo	
<i>bla</i> _{CTX-MU} CGATGTGCAGTACCAGTAA TTAGTGACCAGAATCAGCGG	94°C 5' 1 ciclo	Batchelor <i>et al.</i> , 2005 (585 pb)
	94°C 30''	
	52°C 30'' 35 ciclos	
	72°C 1'	
	72°C 5' 1 ciclo	
<i>ampC</i> AATGGGTTTTCTACGGTCTG GGGCAGCAAATGTGGAGCAA	94°C 3' 1 ciclo	Stapleton <i>et al.</i> , 1999 (1800 pb)
	94°C 1'	
	57°C 30'' 10 ciclos	
	72°C 6'	
	72°C 10' 1 ciclo	
<i>sul1</i> TGGTGACGGTGTTCGGCATTG GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	94°C 5' 1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000 (789 pb)
	94°C 30''	
	63°C 30'' 30 ciclos	
	72°C 1'	
	72°C 8' 1 ciclo	

Tabela 5 (continuação): Sequência nucleotídica dos primers de PCR para genes codificadores de resistência a antibióticos em *E. coli*.

Primers (sequência 5' a 3')	Condições de amplificação	Referência (Banda obtida)
<i>sul2</i> <i>CGGCATCGTCAACATAACC</i> <i>GTGTGCGGATGAAGTCAG</i>	94°C 5' 1 ciclo	Maynard <i>et al.</i> , 2003 (722 pb)
	94°C 30''	
	50°C 30'' 30 ciclos	
	72°C 1' 30''	
<i>sul3</i> <i>CATTCTAGAAAACAGTCGTAGTTCG</i> <i>CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA</i>	94°C 5' 1 ciclo	Perreten and Boerlin, 2003 (990 pb)
	94°C 1'	
	51°C 1' 30 ciclos	
	72°C 1'	
<i>aac(3)II</i> <i>ACTGTGAATGGGAATACGCGTC</i> <i>CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA</i>	94°C 3' 1 ciclo	Sáenz <i>et al.</i> , 2004 (237 pb)
	94°C 1'	
	60°C 1' 30 ciclos	
	72°C 1'	
<i>aac(3)IV</i> <i>CTTCAGGATGGCAAGTTGGT</i> <i>TCATCTCGTTCTCCGCTCAT</i>	94°C 3' 1 ciclo	Sáenz <i>et al.</i> , 2004 (286 pb)
	94°C 1'	
	60°C 1' 30 ciclos	
	72°C 1'	
<i>tetA</i> <i>GTAATTCTGAGCACTGTTCGC</i> <i>CTGCCTGGACAACATTGCTT</i>	94°C 3' 1 ciclo	Guardabassi <i>et al.</i> , 2000 (937 pb)
	94°C 1'	
	60°C 1' 30 ciclos	
	72°C 1'	
<i>tetB</i> <i>CTCAGTATTCCAAGCCTTTG</i> <i>CTAAGCACTTGTCTCCTGTT</i>	95°C 5' 1 ciclo	Guardabassi <i>et al.</i> , 2000 (416 pb)
	95°C 30''	
	57°C 30'' 25 ciclos	
	72°C 20''	
<i>tetC</i> <i>TCTAACAATGCGCTCATCGT</i> <i>GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC</i>	95°C 5' 1 ciclo	Guardabassi <i>et al.</i> , 2000 (570 pb)
	95°C 30''	
	62°C 30'' 30 ciclos	
	72°C 30''	
	72°C 7' 1 ciclo	

Tabela 6: Sequência nucleotídica dos primers de PCR para o estudo dos integrões de classe 1 e 2 em *E. coli*.

Primers (sequência 5' a 3')	Condições de amplificação			Referência (Banda obtida)
<i>Int1</i> GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG ACATGGGTGTAAATCATCGTC	94°C	5'	1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000 (483 pb)
	94°C	30''		
	62°C	30''	30 ciclos	
	72°C	1'		
Região variável do integrão de classe 1 (<i>rvint1</i>) GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA	94°C	5'	1 ciclo	Levesque and Roy, 1993 (variável)
	94°C	1'		
	55°C	1'	35 ciclos	
	65°C	8'		
<i>qacEA1</i> GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG TGAGCCCCATACCTACAAAGC	94°C	5'	1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000 (287 pb)
	94°C	30''		
	62°C	30''	30 ciclos	
	72°C	1'		
<i>Int2</i> CACGGATATGCGACAAAAGGT GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	94°C	5'	1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000 (788 pb)
	94°C	30 ''		
	62°C	30 ''	30 ciclos	
	72°C	1'		
Região variável do integrão de classe 2 (<i>rvint2</i>) CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA GATGCCATCGCAAGTACGAG	94°C	5'	1 ciclo	White <i>et al.</i> , 2001 (variável)
	94°C	1'		
	60°C	1'	35 ciclos	
	72°C	6'		
	72°C	8'	1 ciclo	

Tabela 7: Sequência nucleotídica dos primers de PCR para o estudo dos factores de virulência em *E. coli*.

Primers (sequência 5' a 3')	Condições de amplificação			Referência (Banda obtida)
<i>papC</i> GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	94°C	3'	1 ciclo	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995 (328 pb)
	94°C	1'		
	63°C	1'	30 ciclos	
	72°C	1'		
	72°C	3'	1 ciclo	
<i>cnf1</i> AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT	94°C	3'	1 ciclo	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995 (498 pb)
	94°C	1'		
	63°C	1'	30 ciclos	
	72°C	1'		
	72°C	3'	1 ciclo	
<i>aer</i> TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG	94°C	3'	1 ciclo	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995 (602 pb)
	94°C	1'		
	63°C	1'	30 ciclos	
	72°C	1'		
	72°C	3'	1 ciclo	
<i>stx</i> GGCACTGTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCT	94°C	3'	1 ciclo	Paton and Paton, 1998 (255 pb)
	94°C	1'		
	63°C	1'	30 ciclos	
	72°C	1'		
	72°C	3'	1 ciclo	
<i>fimA</i> GTTGTTCTGTCTGGCTCTGTC ATGGTGTTGGTCCGTTATTC	94°C	3'	1 ciclo	Ruiz <i>et al.</i> , 2002 (447 pb)
	94°C	1'		
	55°C	1'	35 ciclos	
	72°C	1'		
	72°C	3'	1 ciclo	
<i>papGIII</i> CATTTATCGTCCTCAACTTAG AAGAAGGGATTTTGTAGCGTC	94°C	3'	1 ciclo	Ruiz <i>et al.</i> , 2002 (482 pb)
	94°C	1'		
	55°C	1'	35 ciclos	
	72°C	1'		
	72°C	3'	1 ciclo	

Tabela 8: Sequência nucleotídica dos primers de PCR para o estudo dos grupos filogenéticos em *E. coli*.

Primers (sequência 5' a 3')	Condições de amplificação			Referência (Banda obtida)
	94°C	5'	1 ciclo	
<i>chuaA</i>	94°C	30''		Clermont <i>et al.</i> , 2000
GACGAACCAACGGTCAGGAT	55°C	30''	30 ciclos	(279 pb)
TGCCGCCAGTACCAAAGACA	72°C	30''		
	72°C	7'	1 ciclo	
	94°C	5'	1 ciclo	
<i>yjaA</i>	94°C	30''		Clermont <i>et al.</i> , 2000
TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG	55°C	30''	30 ciclos	(211 pb)
ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	72°C	30''		
	72°C	7'	1 ciclo	
	94°C	5'	1 ciclo	
<i>tspE4.C2</i>	94°C	30''		Clermont <i>et al.</i> , 2000
GAGTAATGTTCGGGGCATTCA	55°C	30''	30 ciclos	(152 pb)
CGCGCCAACAAAGTATTACG	72°C	30''		
	72°C	7'	1 ciclo	

3.3.5. Electroforese em gel de agarose

Após a realização da PCR, os amplicões obtidos foram visualizados através da electroforese horizontal em gel de agarose.

Para preparar os géis utilizou-se uma concentração de agarose D-1, entre 1% a 2%, em relação ao tamanho dos fragmentos esperados. O tampão utilizado foi TBE 1X (composto por: TBE 5X: 54g/l Tris (hidroximetil) aminometano; 27,5g/l ácido bórico; 20ml EDTA 0,5M [pH 8]) e brometo de etídio com concentração final de 0,5µg/ml.

Aqueceu-se a mistura até á dissolução da agarose e, de seguida, colocou-se num suporte com um pente para formar os poços. Após o gel solidificar, depositaram-se nos poços 10µl do produto PCR junto com cerca de 2µl de tampão de carga (10% sacarose, 0,0025% azul de bromofenol em TE [10mM Tris (hidroximetil) aminometano, 1 mM EDTA pH 8]). No primeiro poço de cada gel depositou-se um marcador molecular, por vezes um amplicão positivo já estudado para o gene em questão ou um marcador de tamanho escalado.

A electroforese foi realizada a 96 Volts (V) durante 45 minutos. Para visualizar e fotografar o gel foi utilizado um transiluminador de luz ultravioleta e um capturador de imagem (Molecular Imager, Gel DOC™ XR+).

3.3.6. Sequenciação

Depois de visualizar o produto de PCR, os amplicões de diferentes genes de resistência aos antibióticos foram sequenciados. A sequenciação foi realizada através do uso dos mesmos primers que foram utilizados para a reacção de PCR. Utilizou-se um sistema de sequenciação automático em serviço externo de uma empresa especializada (StabVida - Portugal).

A análise das sequências obtidas foram realizadas através de diversas ferramentas localizadas nos links <http://molbiol-tools.ca/> e <http://www.ebi.ac.uk/> e base de dados (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) disponíveis na internet, que permitem obter o alinhamento de sequências, comparar e procurar por possíveis mutações que possam ter ocorrido.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS

4.1. Isolamento de *Escherichia coli* em placas de Levine com e sem suplemento de cefotaxima

A partir de um total de 29 amostras de carne de frango (6 de asas, 6 de peito, 6 de coxas, 6 de pele e 5 de moelas), semeadas em placas de meio selectivo Levine com e sem suplemento de cefotaxima (2µg/ml) e isolada uma colónia por placa, obtiveram-se 29 isolados (100%) de placas sem suplemento de cefotaxima e 27 isolados (93,1%) de placas com suplemento de cefotaxima. Das placas com suplemento de cefotaxima apenas não foram obtidos 2 isolados das 6 amostras de pele (Tabela 9).

Na Tabela 9 podemos observar a distribuição dos isolados obtidos a partir de placas com e sem suplemento de cefotaxima, das diferentes amostras de carne de frango utilizadas neste estudo.

Tabela 9: Número de amostras e de isolados de *Escherichia coli* de placas de Levine com e sem suplemento de cefotaxima.

Amostras	Isolados de placas sem suplemento de cefotaxima		Isolados de placas com suplemento de cefotaxima	
	N	%	n	%
Asas N=6	6	100	6	100
Peito N=6	6	100	6	100
Coxas N=6	6	100	6	100
Pele N=6	6	100	4	66,7
Moelas N=6	5	100	5	100

N - Número de amostras; n - Número de isolados; % - Percentagem de isolados

4.2. Estudo da sensibilidade aos antibióticos nos isolados de *Escherichia coli*

4.2.1. Isolados obtidos nas placas de Levine sem suplemento de cefotaxima

Dos 6 isolados de asas, 4 apresentaram resistência à tetraciclina, 3 à ampicilina e ao ácido nalidíxico, 2 à ciprofloxacina e ao cloranfenicol e 1 à estreptomicina (Tabela 10).

Tabela 10: Resistência aos antibióticos nos isolados de *E. coli* de placas sem suplemento de cefotaxima.

Antibiótico	Isolados	Isolados de	Isolados de	Isolados de	Isolados de	Total	
	de Asas	Peito	Coxas	Pele	Moela	N=29	
	N=6	N=6	N=6	N=6	N=5	n	%
AMC	0	1	2	1	0	4	13,8
CAZ	0	0	1	0	0	1	3,5
CTX	0	0	0	0	0	0	0
ATM	0	0	1	0	0	1	3,5
FOX	0	1	2	1	0	4	13,8
AMP	3	4	5	3	4	19	65,5
IMP	0	0	0	0	0	0	0
CIP	2	3	2	3	0	10	34,5
GEN	0	0	0	0	0	0	0
TET	4	5	4	3	5	21	72,4
AK	0	0	0	0	0	0	0
TOB	0	1	1	0	0	2	6,9
STR	1	2	2	1	2	8	27,6
NAL	3	5	4	3	4	19	65,5
SXT	1	1	2	2	2	8	27,6
CHL	2	2	2	3	1	10	34,5

N - Número de amostras; n - Número de isolados; % - Percentagem de isolados resistentes; AMC - amoxicilina + ácido clavulânico; CAZ - ceftazidima; CTX - cefotaxima; ATM - aztreonam; FOX - cefoxitina; AMP - ampicilina; IMP - imipenemo; CIP - ciprofloxacina; GEN - gentamicina; TET - tetraciclina; AK - amicacina; TOB - tobramicina; STR - estreptomicina; NAL - ácido nalidíxico; SXT - sulfametoxazol-trimetropim; CHL - cloranfenicol.

Dos 6 isolados provenientes de peito, 5 manifestaram resistência ao ácido nalidíxico e à tetraciclina, 4 resistência à ampicilina, 3 à ciprofloxacina, 2 ao

cloranfenicol e à estreptomicina e 1 à amoxicilina + ácido clavulânico, à cefoxitina, à tobramicina e ao sulfametoxazol-trimetropim (Tabela 10). Dos 6 isolados de coxas, 5 apresentaram resistência à ampicilina, 4 ao ácido nalidíxico e à tetraciclina, 2 à amoxicilina + ácido clavulânico, cefoxitina, ciprofloxacina, estreptomicina, sulfametoxazol-trimetropim e ao cloranfenicol, sendo que apenas foi encontrado 1 isolado resistente à ceftazidima, aztreonam e à tobramicina (Tabela 10).

Para os 6 isolados de pele, foram encontrados 3 isolados resistentes à ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina, ácido nalidíxico e cloranfenicol, 2 isolados resistentes ao sulfametoxazol-trimetropim e apenas foi encontrado 1 isolado com resistência à amoxicilina + ácido clavulânico, cefoxitina, e estreptomicina (Tabela 10). Dos 5 isolados de moela, 4 apresentaram resistência à ampicilina e ao ácido nalidíxico, 3 à tetraciclina, 2 à estreptomicina e ao sulfametoxazol-trimetropim e 1 ao cloranfenicol (Tabela 10).

A maioria dos isolados apresentou elevada percentagem de resistência à tetraciclina (72,4%), à ampicilina (65,5%) e ao ácido nalidíxico (65,5%); e ainda resistências elevadas a outros sete antibióticos: cloranfenicol (34,5%), ciprofloxacina (34,5%), sulfametoxazol-trimetropim (27,6%), estreptomicina (27,6%), cefoxitina (13,8%) e amoxicilina + ácido clavulânico (13,8%) ainda se verificou percentagens elevadas de resistência, mas menores do que as referidas anteriormente. Sendo para os antibióticos tobramicina (6,9%), ceftazidima (3,5%) e aztreonam (3,5%) onde se verificaram as menores percentagens de resistência. Do total dos isolados nenhum mostrou resistência à cefotaxima, imipenemo, gentamicina e à amicacina (Tabela 10 e Figura 4).

Como se pode verificar na Figura 4, os isolados de coxas são os que apresentam resistência a um maior número de diferentes antibióticos, sendo unicamente para isolados de coxas que se verifica resistência à ceftazidima e ao aztreonam.

Dos 6 isolados provenientes de asas, 2 foram susceptíveis a todos os antibióticos, sendo apenas encontrado 1 isolado resistente a apenas um antibiótico. Este também foi o número de isolados resistentes a quatro, cinco e seis antibióticos. Não se detectaram isolados de asas com resistência a dois, a três ou a mais de seis antibióticos (Tabela 11). Dos 6 isolados de peito, apenas 1 foi susceptível a todos os antibióticos, sendo também este o número (1/6) de isolados com resistência a três, quatro, cinco, seis e sete antibióticos, não se verificando isolados com resistência a um, a dois ou a mais de sete antibióticos. Dos 6 isolados de coxas, apenas 1 dos isolados foi resistente a dois, a

três e a cinco antibióticos, sendo também encontrado apenas 1 isolado susceptível a todos os antibióticos (Tabela 11).

Adicionalmente, dois dos isolados de coxas possuíram resistência a 9 antibióticos, não se verificando isolados com resistência a um maior número de antibióticos, bem como a um, quatro, seis, sete e oito antibióticos (Tabela 11).

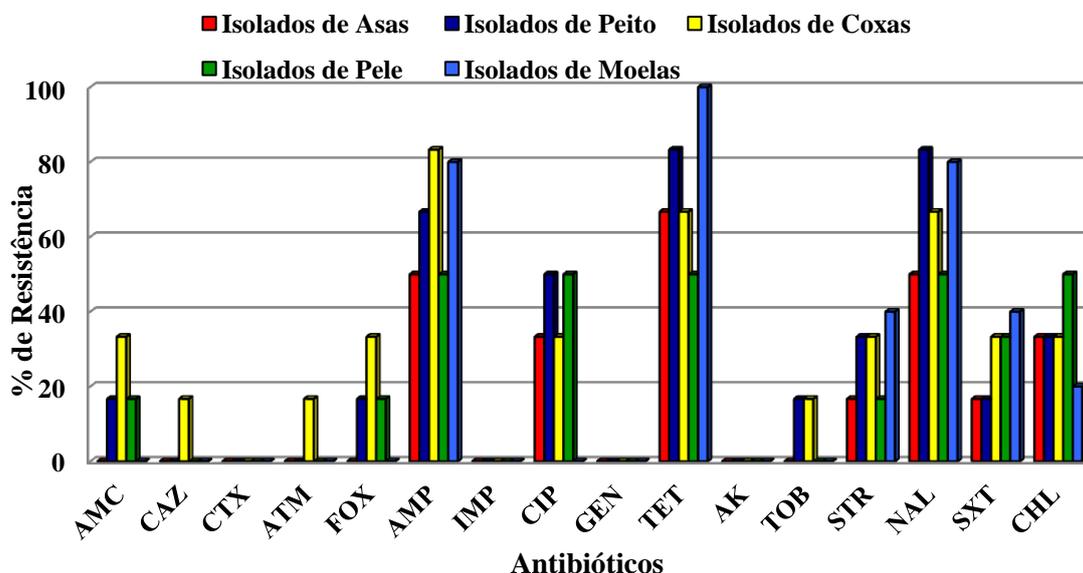


Figura 4: Resistência aos antibióticos nos isolados de *E. coli* de placas sem suplemento de cefotaxima. AMC - amoxicilina + ácido clavulânico; CAZ - ceftazidima; CTX - cafotaxima; ATM - aztreonam; FOX - cefoxitina; AMP - ampicilina; IMP - imipenemo; CIP - ciprofloxacina; GEN - gentamicina; TET - tetraciclina; AK - amicacina; TOB - tobramicina; STR - estreptomicina; NAL - ácido nalidíxico; SXT - sulfametoxazol-trimetropim; CHL - cloranfenicol.

Dos seis isolados de pele, 3 foram susceptíveis a todos os antibióticos e 1 foi resistente a cinco, seis e nove antibióticos. Não se detectaram isolados de pele com resistência a um, dois, três, quatro, sete e oito antibióticos, assim como isolados resistentes a mais de nove antibióticos. Dos 5 isolados de moela, nenhum foi susceptível a todos os antibióticos, 2 foram resistentes a dois e cinco antibióticos e apenas 1 isolado foi resistente a quatro antibióticos. Não se verificaram isolados resistentes a um e a três antibióticos, bem como isolados resistentes a mais de 5 antibióticos (Tabela 11). No total dos isolados, 24,1% (7/29) foram susceptíveis a todos os antibióticos, 20,7% (6/29) resistentes a cinco antibióticos e 10,3% (3/29) foram resistentes a dois, quatro e seis antibióticos. No total, mais de metade (55,2% - 16/29) dos isolados apresentou um fenótipo de multirresistência, sendo nos isolados provenientes de peito que se verifica a maior percentagem (83,3% - 5/6) de isolados multirresistentes (Tabela 11).

Tabela 11: Resistência aos antibióticos nos isolados de *E. coli* de placas não suplementadas com cefotaxima.

Antibióticos	Isolados	Isolados	Isolados	Isolados	Isolados	Total	
	de Asas	de Peito	de Coxas	de Pele	de Moela	n	%
0 antibióticos	2	1	1	3	0	7	24,1
1 antibiótico	1	0	0	0	0	1	3,5
2 antibióticos	0	0	1	0	2	3	10,3
3 antibióticos	0	1	1	0	0	2	6,9
4 antibióticos	1	1	0	0	1	3	10,3
5 antibióticos	1	1	1	1	2	6	20,7
6 antibióticos	1	1	0	1	0	3	10,3
7 antibióticos	0	1	0	0	0	1	3,5
8 antibióticos	0	0	0	0	0	0	0
9 antibióticos	0	0	2	1	0	1	3,5

n - Número de isolados; % - Percentagem de isolados resistentes

Os perfis de resistência obtidos estão enunciados na Tabela 12, tendo-se verificado que os fenótipos mais comuns foram: AMP-TET-NAL-CIP-CHL e AMP-TET-STR-SXT-NAL, surgindo ambos em 3 isolados. O fenótipo AMP-TET-NAL-CIP-CHL surgiu em isolados oriundos de asas, peito e coxas, ao passo que o fenótipo AMP-TET-STR-SXT-NAL surgiu em dois isolados provenientes de amostras de moelas e em um isolado proveniente de amostras de coxas. O fenótipo de resistência AMP-AMC-FOX-TET-STR-SXT-NAL-CIP-CHL surgiu em 2 isolados, sendo este o segundo fenótipo de resistência mais observado. É importante referir ainda que os isolados apresentaram vários fenótipos de resistência, sendo que apenas 7 dos 29 isolados (24,1%) se apresentaram sensíveis a todos os antibióticos (Tabela 12).

Tabela 12: Fenótipo de resistência aos antibióticos nos isolados de *E. coli* de placas não suplementadas com cefotaxima.

Fenótipo de resistência	Isolados de Asas	Isolados de Peito	Isolados de Coxas	Isolados de Pele	Isolados de Moela	Total
AMP-AMC-FOX-TET-STR-SXT-NAL-CIP-CHL	-	-	1	1	-	2
AMP-ATM-FOX-CAZ-TET-TOB-NAL-CIP-CHL	-	-	1	-	-	1
AMP-AMC-FOX-TET-STR-SXT-NAL	-	1	-	-	-	1
AMP-TET-STR-NAL-CIP-CHL	1	-	-	-	-	1
AMP-TET-SXT-NAL-CIP-CHL	-	-	-	1	-	1
AMP-TET-STR-TOB-NAL-CIP	-	1	-	-	-	1
AMP-TET-NAL-CIP-CHL	1	1	-	1	-	3
AMP-TET-STR-SXT-NAL	-	-	1	-	2	3
AMP-TET-NAL-CHL	-	-	-	-	1	1
TET-NAL-CIP-CHL	-	1	-	-	-	1
AMP-TET-SXT-NAL	1	-	-	-	-	1
AMP-AMC-NAL	-	-	1	-	-	1
AMP-TET-NAL	-	1	-	-	-	1
AMP-TET	-	-	-	-	1	1
TET-NAL	-	-	1	-	-	1
TET	1	-	-	-	-	1
Sensível a todos os antibióticos	2	1	1	3	-	7

AMC - amoxicilina + ácido clavulânico; CAZ - ceftazidima; ATM - aztreonam; FOX - cefoxitina; AMP - ampicilina; CIP - ciprofloxacina; TET - tetraciclina; TOB - tobramicina; STR - estreptomicina; NAL - ácido nalidíxico; SXT - sulfametoxazol-trimetropim; CHL - cloranfenicol.

4.2.2. Isolados obtidos nas placas de Levine com suplemento de cefotaxima

Dos 27 isolados de placas de Levine suplementadas com cefotaxima, 85,2% (23 isolados) foram positivos no teste de detecção fenotípica de β -lactamases de amplo espectro (BLAEs), apresentando uma ampliação dos halos de inibição (ghost zone) entre o disco amoxicilina + ácido clavulânico e os restantes β -lactâmicos colocados em redor, sendo produtores de β -lactamases de amplo espectro. A produção destas enzimas foi posteriormente confirmada caracterizando o tipo de β -lactamase de amplo espectro que os isolados produzem (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CMY}) (Tabela 13).

Os 4 isolados provenientes de placas de Levine com suplemento de cefotaxima, que não apresentaram uma ampliação dos halos de inibição (ghost zone) entre o disco amoxicilina + ácido clavulânico e os restantes β -lactâmicos colocados em redor (negativos no teste de detecção fenotípica de BLAEs) não foram classificadas como sendo produtoras de β -lactamases de amplo espectro. Para estes isolados pesquisou-se o gene *ampC* e sequenciou-se o amplicão obtido para determinar, por comparação com sequência tipo se existiam mutações que podiam causar resistência (Tabela 13).

Todos os 27 isolados de *Escherichia coli* apresentaram fenótipo de resistência à ampicilina, 22 ao ácido nalidíxico, 17 ao sulfametoxazol-trimetropim, verificando-se, também, 17 isolados resistentes à tetraciclina. Onze dos isolados foram resistentes à cefotaxima, 10 à ciprofloxacina, sendo encontrados, também, 10 isolados resistentes à estreptomicina. Seis foram resistentes à gentamicina, 5 à ceftaxima, 4 ao aztreonam, 3 à amoxicilina + ácido clavulânico, encontrando-se também 3 isolados resistentes à ceftazidima. Por último verificou-se que apenas um isolado foi resistente ao cloranfenicol, sendo encontrado também apenas um isolado resistente à tobramicina (Tabela 13).

Um isolado apresentou resistência a apenas um antibiótico, dois foram resistentes a três antibióticos, cinco foram resistentes a quatro antibióticos, dez foram resistentes a cinco antibióticos, seis foram resistentes a seis antibióticos, um foi resistente a sete antibióticos, um foi resistente a oito antibióticos e também apenas um isolado foi resistente a onze antibióticos (Tabela 13).

Tabela 13: Fenótipo de resistência dos isolados de *E. coli* obtidos de placas suplementadas com cefotaxima.

Amostra	Origem	Detecção	
		fenotípica de BLAEs	Fenótipo de resistência
A1A	Asas	(+)	AMP-CTX-TET-NAL-CIP
A2A	Asas	(-)*	AMP-FOX-TET-STR-GEN-SXT
A3A	Asas	(+)	AMP-CTX-TET-SXT-NAL
A4A	Asas	(+)	AMP-TET-NAL
A5A	Asas	(+)	AMP-FOX-CTX-TET-GEN-AK-TOB-SXT
A6A	Asas	(+)	AMP-ATM-CAZ-STR-SXT-NAL-CIP
P1A	Peito	(-)*	AMP-FOX-TET-STR-GEN-SXT
P2A	Peito	(+)	AMP-CTX-TET-NAL
P3A	Peito	(-)*	AMP-AMC-STR-SXT-NAL
P4A	Peito	(+)	AMP-TET-SXT-NAL
P5A	Peito	(+)	AMP-AMC-ATM-FOX-CTX-CAZ-TET-GEN-AK-SXT-NAL
P6A	Peito	(+)	AMP-STR-GEN-SXT-NAL-CIP
C1A	Coxas	(+)	AMP-ATM-TET-NAL-CIP
C2A	Coxas	(+)	AMP-CTX-TET-NAL-CIP
C3A	Coxas	(+)	AMP-CTX-TET-STR-NAL-CIP
C4A	Coxas	(+)	AMP-TET-SXT-NAL
C5A	Coxas	(+)	AMP-ATM-TET-SXT-NAL
C6A	Coxas	(+)	AMP-STR-SXT-NAL-CIP
Pe1A	Pele	(+)	AMP-CTX-TET-NAL-CIP
Pe3A	Pele	(+)	AMP-CTX-NAL-CIP
Pe4A	Pele	(+)	AMP-TET-SXT-NAL
Pe5A	Pele	(+)	AMP-STR-SXT-NAL-CIP
M1A	Moelas	(+)	AMP-GEN-SXT-NAL-CHL
M3A	Moelas	(+)	AMP-CTX-TET-STR-SXT-NAL
M4A	Moelas	(-)*	AMP-AMC-FOX-STR-SXT-NAL
M5A	Moelas	(+)	AMP-CTX-CAZ
M6A	Moelas	(+)	AMP

BLAEs - β -lactamases de amplo espectro; AMC - amoxicilina + ácido clavulânico; CAZ - ceftazidima; CTX - cefotaxima; ATM - aztreonam; FOX - cefoxitina; AMP - ampicilina; CIP - ciprofloxacina; GEN - gentamicina; TET - tetraciclina; AK - ampicilina; TOB - tobramicina; STR - estreptomicina; NAL - ácido nalidíxico; SXT - sulfametoxazol-trimetropim; CHL - cloranfenicol.

* Os fenótipos e mecanismos de resistência dos isolados de *E. coli* obtidos de placas suplementadas com cefotaxima, com resultado negativo no teste de detecção fenotípica de BLAEs, são apresentados na Tabela 15.

4.2.3. Caracterização genotípica dos mecanismos de resistência

Na análise dos isolados de *Escherichia coli* obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima, procedeu-se à caracterização dos mecanismos de resistência a diferentes antibióticos (tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina, sulfametoxazol-trimetropim e quinolonas). Nos isolados que foram positivos no teste de detecção fenotípica de BLAEs, procedeu-se à confirmação do tipo de β -lactamase de amplo espectro que os isolados produzem pesquisando e sequenciando os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CMY}. Para os isolados que obtiveram um resultado negativo no teste de detecção fenotípica de BLAEs, procedeu-se à pesquisa e sequenciação da região do promotor e/ou atenuador do gene *ampC*. Posteriormente procedeu-se à comparação com sequência tipo (sequência nucleotídica do gene *ampC*, na mesma região, de *E. coli* K-12), para verificar se existiam mutações que podiam atribuir o carácter de resistência aos isolados em causa.

O estudo dos genes codificadores dos diferentes mecanismos de resistência aos antibióticos ou a pesquisa de mutações que conferem a respectiva resistência, procedeu-se através da técnica de PCR.

Para determinar os diferentes mecanismos de resistência à tetraciclina, pela técnica de PCR, foi estudada a presença dos genes *tetA*, *tetB*, *tetC*. Para o cloranfenicol analisou-se o gene *cmlA*. Para o sulfametoxazol pesquisaram-se os genes *sul1*, *sul2* e *sul3*. Para a estreptomicina analisou-se o gene *aadA*. A resistência à gentamicina foi testada a partir da amplificação dos genes de acetiltransferases *aac(3)-II* e *aac(3)-IV*. No caso das quinolonas pesquisaram-se os genes *gyrA* e *parC* e sequenciaram-se os amplicões obtidos para determinar, por comparação com sequência tipo (com os números de acesso no GenBank X06373 e M58408, respectivamente), se existiam mutações que podiam causar a resistência.

Na Tabela 14 pode-se observar os isolados de *Escherichia coli* obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima, isolados produtores de β -lactamases de amplo espectro (positivos para o teste de detecção fenotípica de BLAEs) e, isolados com resultado negativo para o teste de detecção fenotípica de BLAEs (não produtores de BLAE), os respectivos fenótipos de resistência e mecanismos de resistência a diferentes antibióticos.

Tabela 14: Fenótipos e mecanismos de resistência aos antibióticos detectados nos isolados de *E. coli* obtidos de placas suplementadas com cefotaxima.

Amostra	Origem	Detecção fenotípica de BLAEs	Fenótipo de resistência (não β -lactâmico)	Mecanismo de resistência		
				Genes de resistência detectados	Mutações aminoacídicas	
					<i>gyrA</i>	<i>parC</i>
A1A	Asas	(+)	TET-NAL-CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-14a} ; <i>tetA</i>	S83L+D87N	S80I
A2A	Asas	(-)	TET-STR-GEN-SXT	<i>tetA</i> ; <i>aadA</i> ; <i>aac(3)-II</i> ; <i>sul1</i>	-	-
A3A	Asas	(+)	TET-SXT-NAL	<i>bla</i> _{CTX-M-1} ; <i>tetB</i> ; <i>sul2</i>	S83L+D87N	-
A4A	Asas	(+)	TET-NAL	<i>bla</i> _{TEM-52} ; <i>tetB</i>	S83L+D87N	-
A5A	Asas	(+)	TET-GEN-AK-TOB-SXT	<i>bla</i> _{TEM-52} ; <i>tetA</i> ; <i>aac(3)-II</i> ; <i>sul2</i>	-	-
A6A	Asas	(+)	STR-SXT-NAL-CIP	<i>bla</i> _{TEM-52} ; <i>aadA</i> ; <i>sul2</i>	S83L+D87N	S80I
P1A	Peito	(-)	TET-STR-GEN-SXT	<i>tetA</i> ; <i>aadA</i> ; <i>aac(3)-II</i> ; <i>sul1</i>	-	-
P2A	Peito	(+)	TET-NAL	<i>bla</i> _{CTX-M-14a} ; <i>tetA</i>	S83L+D87N	-
P3A	Peito	(-)	STR-SXT-NAL	<i>aadA</i> ; <i>sul1</i>	S83L+D87N	-
P4A	Peito	(+)	TET-SXT-NAL	<i>bla</i> _{TEM-52} ; <i>tetA</i> ; <i>sul1</i> ; <i>sul2</i>	S83L+D87N	-
P5A	Peito	(+)	TET-GEN-AK-SXT-NAL	<i>bla</i> _{TEM-52} ; <i>tetA</i> ; <i>aac(3)-II</i> ; <i>sul2</i>	S83L+D87N	-
P6A	Peito	(+)	STR-GEN-SXT-NAL-CIP	<i>bla</i> _{TEM-52} ; <i>aadA</i> ; <i>aac(3)-II</i> ; <i>sul2</i>	S83L+D87N	S80I
C1A	Coxas	(+)	TET-NAL-CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-9} ; <i>tetA</i>	S83L+D87N	S80I
C2A	Coxas	(+)	TET-NAL-CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-9} ; <i>tetA</i>	S83L+D87N	S80I

Tabela 14 (Continuação): Fenótipos e mecanismos de resistência aos antibióticos detectados nos isolados de *E. coli* obtidos de placas suplementadas com cefotaxima.

Amostra	Origem	Detecção fenotípica de BLAEs	Fenótipo de resistência (não β-lactâmico)	Mecanismo de resistência		
				Genes de resistência detectados	Mutações aminoacídicas	
					<i>gyrA</i>	<i>parC</i>
C3A	Coxas	(+)	TET-STR-NAL-CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-9} ; <i>tetA</i>	S83L+D87N	S80I
C4A	Coxas	(+)	TET-SXT-NAL	<i>bla</i> _{TEM-52} ; <i>tetA</i> ; <i>sul1</i> ; <i>sul2</i>	S83L+D87N	-
C5A	Coxas	(+)	TET-SXT-NAL	<i>bla</i> _{TEM-52} ; <i>tetA</i> ; <i>sul2</i>	S83L+D87N	-
C6A	Coxas	(+)	STR-SXT-NAL-CIP	<i>bla</i> _{TEM-52} ; <i>aadA</i> ; <i>sul2</i>	S83L+D87N	S80I
Pe1A	Pele	(+)	TET-NAL-CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-9} ; <i>tetA</i>	S83L+D87N	S80I
Pe3A	Pele	(+)	NAL-CIP	<i>bla</i> _{TEM-52}	S83L+D87N	n.d.
Pe4A	Pele	(+)	TET-SXT-NAL	<i>bla</i> _{TEM-52} ; <i>tetA</i> ; <i>sul1</i> ; <i>sul2</i>	S83L+D87N	-
Pe5A	Pele	(+)	STR-SXT-NAL-CIP	<i>bla</i> _{TEM-52} ; <i>aadA</i> ; <i>sul2</i>	S83L+D87N	S80I
M1A	Moelas	(+)	GEN-SXT-NAL-CHL	<i>bla</i> _{CTX-M-14a} ; <i>aac(3)-II</i> ; <i>sul3</i> ; <i>cmlA</i>	S83L+D87N	-
M3A	Moelas	(+)	TET-STR-SXT-NAL	<i>bla</i> _{CTX-M-1} ; <i>tetA</i> ; <i>sul2</i>	S83L+D87N	-
M4A	Moelas	(-)	STR-SXT-NAL	<i>aadA</i> ; <i>sul1</i>	S83L+D87N	-
M5A	Moelas	(+)	-	<i>bla</i> _{CTX-M-14a}	-	-
M6A	Moelas	(+)	-	<i>bla</i> _{TEM-52}	-	-

BLAEs – β-lactamases de amplo espectro; TET – tetraciclina; NAL – ácido nalidíxico; CIP – ciprofloxacina; STR – estreptomicina; GEN – gentamicina; SXT – sulfametoxazol-trimetopim; AK – amicacina; TOB – tobramicina; CHL – cloranfenicol; S – serina; L – leucina; D – ácido aspártico; N – asparagina; I – isoleucina; n.d. - não detectada

Dos 27 isolados de *Escherichia coli* obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima, 23 (85,2%) foram produtores de β -lactamases de amplo espectro (positivos para o teste de detecção fenotípica de BLAEs) e, 4 não foram produtores de β -lactamases de amplo espectro (negativos para o teste de detecção fenotípica de BLAEs) (Tabela 14).

Dos 23 isolados produtores de β -lactamases de amplo espectro, 56,5% (13/23) possuíam o gene *bla*_{TEM-52}, 4 possuíam o gene *bla*_{CTX-M-14a}, sendo também encontrado em 4 isolados o gene *bla*_{CTX-M-9}. O gene *bla*_{CTX-M-1} foi encontrado em apenas 2 dos isolados. Nenhum dos isolados apresentou em simultâneo mais de um gene *bla* (Tabela 14). Dos 17 isolados com fenótipo de resistência à tetraciclina, 88,2% (15/17) manifestaram o gene *tetA* e 2 contiveram o gene *tetB*. Dos 11 isolados com fenótipo de resistência à estreptomicina, 8 possuíam o gene *aadA* e 3 não continham o gene pesquisado. O isolado com fenótipo de resistência ao cloranfenicol possuía o gene *cmlA*. Todos os 4 isolados com fenótipo de resistência à gentamicina possuíam o gene *aac(3)-II*, não tendo sido detectado nenhum isolado resistente a este antibiótico contendo o gene *aac(3)-IV* (Tabela 14).

Dos 13 isolados com fenótipo de resistência ao sulfametoxazol-trimetropim, 92,3% (12/13) possuíam o gene *sul2*, dos quais 4 se detectaram em conjunto com o gene *sul1*. O gene *sul3* esteve presente em apenas 1 dos isolados (Tabela 14).

Dos 20 isolados resistentes às quinolonas, todos apresentaram fenótipo de resistência ao ácido nalidíxico, sendo que 10 evidenciaram em conjunto fenótipo de resistência ao ácido nalidíxico e à ciprofloxacina. Todos os 20 isolados com fenótipo de resistência ao ácido nalidíxico, possuíam o gene *gyrA* com duas mutações que provocam alterações aminoacídicas (substituição no triplete 83 da produção de serina por leucina e no triplete 87 da produção de ácido aspártico por asparagina) (Tabela 14 e Figura 8).

Dos 20 isolados com fenótipo de resistência ao ácido nalidíxico, que possuem as mutações acima referidas, 9 isolados possuíam também o gene *parC* com uma mutação que causa a alteração aminoacídica (substituição no triplete 80 da produção de serina por isoleucina). Num dos isolados com fenótipo de resistência à ciprofloxacina não foi detectada qualquer mutação no gene *parC* (Tabela 14 e Figura 9).

Ref. <i>gyrA</i>	GACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTCGGCGGTCATGACACGATTGTCCGC
P6A	GACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAACACGATCGTCCGT ***** **
	83 87
Ref. <i>gyrA</i>	ATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTATATGCTGGTAGACGGTCAGGGTAACTTCGGTTCT
P6A	ATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGGTAACTTCGGTTCC *****
Ref. <i>gyrA</i>	ATCGACGGCGACTCTGCGGCGGCAATGCGTTATACGGAAATCCGTCTGGCGAAAATTGCC .
P6A	ATCGACGGCGACTCTGCGGCGGCAATGCGTTATACGGAAATCCGTCTGGCGAAAATTGCC *****
Ref. <i>gyrA</i>	CATGAACTGATGGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTCGATTTTCGTTGATAACTATGACGGC
P6A	CATGAACTGATGGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTCGATTTTCGTTGATAACTATGACGGC *****
Ref. <i>gyrA</i>	ACGGAAAAAATTCCGGACGTCATGCCAACCAAAATTCCTAACCTGCTGGTGAACGGTTCT
P6A	ACGGAAAAAATTCCCGACGTCATGCCAACCAAAATTCCTAACCTGCTGGTGAACGGTTCT *****
Ref. <i>gyrA</i>	TCCGGTATCGCCGTAGGTATGGCAACCAACATCCCGCCGCACAACCTGACGGAAGTCATC
P6A	TCCGGTATCGCCGTAGGTATGGCAACCAACATCCCGCCGCACAACCTGACGGAAGTCATC *****
Ref. <i>gyrA</i>	AACGGTTGTCTGGCGTATATTGATGATGAAGACATCAGCATTGAAGGGCTGATGGAACAC
P6A	AACGGTTGTCTGGCGTATATCGATGATGAAGACATCAGCATTGAAGGGCTGATGGAACAC *****
Ref. <i>gyrA</i>	ATCCCGGGGCCGACTTCCCGACGGCGGCAATCATTACGGTCGTCGCGGTATTGAAGAA
P6A	ATCCCGGGGCCGACTTCCCGACGGCGGCAATCA----- *****

Figura 5: Sequência nucleotídica do gene *gyrA* selvagem publicado por Swandberg and Wang, 1987 em comparação com os isolados que apresentaram um fenótipo de resistência ao ácido nalidíxico. As mutações, nos tripletos que implicam substituições aminoacídicas, estão assinaladas a vermelho.

Ref. <i>parC</i> P6A	GTTCAGCGCCGCATTGTGTATGCGATGTCTGAACTGGGCCTGAATGCCAGCGCCAAATTT -----TGGGCCTGAATGCCAGCGCCAAATTT *****
Ref. <i>parC</i> P6A	AAAAATCGGCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATAGC AAAAATCGGCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATC ***** * 80
Ref. <i>parC</i> P6A	GCCTGTTATGAAGCGATGGTCCTGATGGCGCAACCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTT GCCTGTTATGAAGCGATGGTCCTGATGGCGCATCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTT *****
Ref. <i>parC</i> P6A	GATGGTCAGGGGAACCTGGGGCGCGCCGGACGATCCGAAATCGTTCGCGGCAATGC GTTAC GATGGTCAGGGGAACCTGGGGCGCGCCGGACGATCCGAAATCGTTCGCGGCAATGC GTTAC *****
Ref. <i>parC</i> P6A	ACCGAATCCCGGTTGTTCGAAATATTCCGAGCTGCTATTGAGCGAGCTGGGGCAGGGGACG ACCGAATCCCGGTTGTTCGAAATATTCCGAGCTGCTATTGAGCGAGCTGGGGCAGGGGACG *****
Ref. <i>parC</i> P6A	GCTGACTGGGTGCCAAACTTCGACGGCACTTTGCAGGAGCCGAAATGCTACCTGCCCGT GCTGACTGGGTACCAACTTCGACGGCACTTTGCAGGAGCCGAAATGCTACCTGCCCGT *****
Ref. <i>parC</i> P6A	CTGCCAAACATTTTGCTTAACGGCACCACCGGTATTGCCGTCGGCATGGCGACCGATATT CTGCCAAACATTTTGCTTAACGGCACCA----- *****

Figura 6: Sequência nucleotídica do gene *parC* selvagem publicado por Kato *et al.*, 1990 em comparação com os isolados que apresentaram um fenótipo de resistência à ciprofloxacina. As mutações, nos tripletos que implicam substituições aminoacídicas, estão assinaladas a vermelho.

Na Tabela 15 pode-se observar os isolados de *Escherichia coli* obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima, que evidenciaram resultado negativo para o teste de detecção fenotípica de BLAEs, os respectivos fenótipos de resistência, os mecanismos de resistência a diferentes antibióticos, assim como as mutações encontradas no gene *ampC*.

Em todos os 4 isolados não produtores de β -lactamases de amplo espectro (negativos para o teste de detecção fenotípica de BLAEs) foram detectadas mutações pontuais na região promotora/atenuadora do gene *ampC* nas posições -42; -18; -1; +58 (Figura 7). Dos 2 isolados com fenótipo de resistência à tetraciclina, todos os isolados contiveram o gene *tetA*, não se verificando nenhum isolado com o gene *tetB*. Todos os 4 isolados com fenótipo de resistência à estreptomicina possuíam o gene *aadA*. Dos 4 isolados com fenótipo de resistência ao sulfametoxazol-trimetropim, os 4 possuíam o gene *sul1*. Os dois isolados que apresentavam um fenótipo de resistência à gentamicina possuíam o gene *aac(3)-II* (Tabela 15).

Tabela15: Fenótipos e mecanismos de resistência aos antibióticos detectados nos isolados de *E. coli* obtidos de placas suplementadas com cefotaxima, com resultado negativo para o teste de detecção fenotípica de BLAEs.

Amostra	Origem	Fenótipo de resistência	Mecanismo de resistência		Mutações no gene <i>ampC</i> nas posições	
			Genes de resistência detectados	Mutações aminoacídicas		
				<i>gyrA</i>		<i>parC</i>
A2A	Asas	AMP-CTX-TET-STR-GEN-SXT	<i>tetA; aadA; aac(3)-II; sul1</i>	-	-	-42; -18; -1; +58
P1A	Peito	AMP-FOX-TET-STR-GEN-SXT	<i>tetA; aadA; aac(3)-II; sul1</i>	-	-	-42; -18; -1; +58
P3A	Peito	AMP-AMC-STR-SXT-NAL	<i>aadA; sul1</i>	S83L+D87N	-	-42; -18; -1; +58
M4A	Moelas	AMP-AMC-FOX-STR-SXT-NAL	<i>aadA; sul1</i>	S83L+D87N	-	-42; -18; -1; +58

BLAEs – β -lactamases de amplo espectro; AMP – ampicilina; AMC – amoxicilina + ácido cluvulânico; FOX – Cefoxitina; CTX – cefotaxima; TET – tetraciclina; NAL – ácido nalidíxico; CIP – ciprofloxacina; STR – estreptomicina; GEN – gentamicina; SXT – sulfametoxazol-trimetropim; AK – amicacina; TOB – tobramicina; CHL – cloranfenicol; S – serina; L – leucina; D – ácido aspártico; N – asparagina; n.d. - não detectada

<i>E. coli</i> K-12	-----GCTATCCTGACAGTTGTCACGCTGATTGGTGTTCGTTACAATCTAACGCATCGCC
A2A	CTGGGGGCTATCTTGACAGTTGTCACGCTGATTGGTATCGTTACAATCTAACGTATCGCC

	-42 -18 -1
<i>E. coli</i> K-12	AATGTAATCCGGCCCGCCTATGGCGGGCCGTTTTGTATGGAAACCAGACCTATG
A2A	AATGTAATCTGGCCCGCCTATGGCGGGCCGTTTTGTATGGAAACCAGACCTATG

	+58

Figura 7: Sequência nucleotídica do atenuador/promotor do gene *ampC* de *E. coli* K-12 em comparação com os isolados obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima, que evidenciaram resultado negativo para o teste de detecção fenotípica de BLAEs. As mutações estão assinaladas a vermelho.

Dois dos isolados apresentaram um fenótipo de resistência ao ácido nalidíxico, sendo que ambos possuíam o gene *gyrA* com duas mutações que provocam alterações aminoacídicas (substituição no tripleto 83 da produção de serina por leucina e no tripleto 87 da produção de ácido aspártico por asparagina). Nenhum dos isolados apresentou fenótipo de resistência à ciprofloxacina (Tabela 15).

4.3. Caracterização dos integrões

Analisou-se a presença de integrões de classe 1 e 2 nos 27 isolados de *Escherichia coli* obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima (isolados positivos e negativos no teste de detecção fenotípica de BLAEs) com fenótipo de resistência ao sulfametoxazol-trimetropim. Amplificou-se por PCR um fragmento de gene codificador da integrase do tipo 1 e do tipo 2 (*intl1* e *intl2*, respectivamente) e observou-se a presença de integrões de classe 1 em oito dos isolados e de integrões de classe 2 em quatro isolados. Os dois genes codificadores das integrases não foram detectados em simultâneo em nenhum dos isolados.

Os integrões de classe 1, em regra, possuem uma região conservada em 3' onde se incluem os genes *qacEΔ1* e *sul1*. Todos os isolados que possuem o integrão de classe 1 (8 isolados) amplificaram o gene *qacEΔ1* e *sul1*.

Nos 12 isolados que amplificaram o gene *intl1* ou *intl2*, a região variável do integrão de classe 1 e 2, respectivamente, foi analisada através de PCR e posterior sequenciação. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 16 e 17.

Tabela16: Estudo das regiões variáveis dos integrões de classe 1 em isolados de *E. coli* obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima (isolados positivos e negativos no teste de detecção fenotípica de BLAEs) com fenótipo de resistência ao sulfametoxazol-trimetropim.

“Genes cassete” da região variável do integrão de classe 1	Deteccção do gene <i>qacEΔ1+sul1</i>	Amostra	Origem	Deteccção fenotípica de BLAEs
<i>aadA1</i>	(+)	A2A	Asas	(-)
	(+)	P1A	Peito	(-)
	(+)	P3A	Peito	(-)
	(+)	M4A	Moelas	(-)
<i>dfrA1</i>	(+)	P4A	Peito	(+)
	(+)	C4A	Coxas	(+)
	(+)	Pe4A	Pele	(+)
	(+)	M3A	Moelas	(+)

BLAEs – β-lactamases de amplo espectro.

Tabela17: Estudo das regiões variáveis dos integrões de classe 2 em isolados de *E. coli* obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima (isolados positivos e negativos no teste de detecção fenotípica de BLAEs) com fenótipo de resistência ao sulfametoxazol-trimetropim.

“Genes cassette” da região variável do integrão de classe 2	Amostra	Origem	Deteção fenotípica de BLAEs
<i>dfrA1+sat2+aadA1</i>	A6A	Asas	(+)
	P6A	Peito	(+)
	C6A	Coxas	(+)
	Pe5A	Pele	(+)

BLAEs – β -lactamases de amplo espectro.

Sequenciaram-se dois tipos diferentes de regiões variáveis do integrão de classe 1 e apenas um tipo de região variável do integrão de classe 2 (Tabela 16 e 17).

Dos 8 isolados que possuem integrões de classe 1, 4 manifestaram a região variável *aadA1*, ao passo que os outros 4 manifestaram a região variável *dfrA1*. Os isolados que manifestaram a região variável *aadA1* são provenientes de asas, peito e moelas, sendo todos negativos no teste de detecção fenotípica de BLAEs. Os isolados que manifestaram a região variável *dfrA1* são todos positivos para o teste de detecção fenotípica de BLAEs, sendo provenientes de amostras de peito, coxas, pele e moelas (Tabela 16).

Os 4 isolados que possuíam integrões de classe 2 revelaram a região variável *dfrA1+sat2+aadA1* e são todos positivos no teste de detecção fenotípica de BLAEs. Os isolados são provenientes de amostras de asas, peito, coxas e pele (Tabela 17).

Os genes encontrados nas regiões variáveis são responsáveis por resistências aos antibióticos. O gene *dfrA1* confere resistência ao trimetropim e o gene *aadA1* codifica resistência à estreptomicina. O gene *sat2* codifica uma acetiltransferase capaz de inactivar a estreptomicina.

4.4. Produção de factores de virulência

Analisou-se, nos 27 isolados de *Escherichia coli* obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima (isolados positivos e negativos no teste de detecção fenotípica de BLAEs), através da técnica de PCR, a presença dos genes codificadores de factores de virulência *fimA*, *aer*, *papGIII*, *papC*, *cnf1* e *stx*. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 18.

Tabela18: Estudo dos genes codificadores de virulência em isolados de *E. coli* obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima (isolados positivos e negativos no teste de detecção fenotípica de BLAEs).

Factor de virulência	Amostra	Origem
<i>aer</i>	A1A; A3A; A4A; A5A; A6A	Asas
	P2A; P3A; P4A; P5A; P6A	Peito
	C1A; C2A; C3A; C4A; C6A	Coxas
	Pe1A; Pe3A; Pe4A; Pe5A	Pele
	M4A	Moelas
<i>fimA</i>	A4A; A5A; A6A	Asas
	P4A; P5A; P6A	Peito
	C4A; C6A	Coxas
	Pe3A; Pe4A; Pe5A	Pele
<i>papC</i>	P3A	Peito
	M4A	Moelas
<i>papGIII</i>	n.d.	-
<i>cnf1</i>	n.d.	-
<i>stx</i>	n.d.	-

n.d. - não detectado

Dos 6 genes codificadores de factores de virulência estudados (*fimA*, *aer*, *papGIII*, *papC*, *cnf1* e *stx*), o gene *aer* foi o mais detectado, sendo encontrado em 74,1% (20/27) dos isolados, seguido do gene *fimA* manifestando-se em 40,7% (11/27) dos isolados, por último o gene *papC* que apenas foi detectado em 2 isolados, sendo que, os restantes factores de virulência não foram detectados (Tabela 18).

Dos 20 isolados que manifestaram o gene *aer*, em apenas 7 dos isolados (A1A; A2A; P2A; P3A; C1A; C2A; Pe1A) se detectou unicamente este gene codificador de

virulência, em todos os restantes isolados este gene codificador de virulência (*aer*), foi detectado em conjunto com outro factor de virulência (*fimA* ou *papC*). O gene *aer* foi detectado em isolados provenientes de todas as origens (asas, peito, coxas, pele e moelas). Dos 20 isolados que manifestaram o gene *aer*, 15 foram provenientes de amostras de asas, peito e coxas, distribuídos equitativamente por estas três origens, 4 são originários de amostras de pele, sendo que apenas 1 isolado foi proveniente de amostras de pele (Tabela 18).

O gene *fimA* manifestou-se em 11 dos isolados, todos possuindo também o gene *aer*. Dos 11 isolados que manifestaram o gene *fimA*, 9 são provenientes de amostras de asas, peito e pele, distribuídos equitativamente por estas três origens e 2 são provenientes de amostras de coxas (Tabela 18).

O gene *papC* foi detectado em apenas 2 dos isolados, em conjunto com o gene *aer*, sendo que um tem origem em amostras de peito e outro em amostras de moelas (Tabela 18).

4.5. Classificação filogenética de *Escherichia coli*

Nos 27 isolados de *Escherichia coli* obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima (isolados positivos e negativos no teste de detecção fenotípica de BLAEs) realizou-se o estudo da caracterização do grupo filogenético mediante a técnica de PCR. Os resultados estão apresentados na Tabela 19.

Dos 27 isolados estudados, 59,3% (16/27) pertenceram aos grupos filogenéticos denominados comensais (A ou B1) e 40,7% (11/27) pertenceram aos grupos filogenéticos mais comumente envolvidos em infecções extra-intestinais e que possuem a maioria dos factores de virulência (B2 ou D) (Tabela 19).

Dos 5 isolados pertencentes ao grupo filogenético A, dois isolados são provenientes de amostras de moelas, um de amostras de peito, um de amostras de coxas e um de amostras de pele. Todos os 5 isolados pertencentes a este grupo filogenético são positivos para o teste de detecção fenotípica de BLAEs; os 11 isolados pertencentes ao grupo filogenético B1, são também, positivos para o teste de detecção fenotípica de BLAEs. Dos 11 isolados pertencentes ao grupo filogenético B1, 4 isolados são provenientes de amostras de coxas, dois de amostras de asas, dois de amostras de peito, dois de amostras de pele e por último, 1 é originário de amostras de moelas. Foi a este grupo filogenético que pertenceram um maior número de isolados 11/27(40,7%) (Tabela 19).

Dos 3 isolados pertencentes ao grupo filogenético B2, apenas um isolado (A3A) foi positivo para o teste de detecção fenotípica de BLAEs, sendo este isolado proveniente de amostras de asas. Os restantes 2 isolados (A2A e P1A) apresentaram um resultado negativo no teste de detecção fenotípica de BLAEs, sendo que um é proveniente de amostras de asas e o outro proveniente de amostras de peito (Tabela 19).

Dos 8 isolados pertencentes ao grupo filogenético D, 2 isolados apresentaram um resultado negativo para o teste de detecção fenotípica de BLAEs (P3A e M4A), sendo que um é proveniente de amostras de asas e o outro de amostras de moelas. Os restantes 6 isolados pertencentes a este grupo filogenético, manifestaram um resultado positivo para o teste de detecção fenotípica de BLAEs. Dos 6 isolados pertencentes ao grupo filogenético D e que apresentaram um teste positivo para a detecção fenotípica de BLAEs, 4 são provenientes de amostras de peito, coxas, pele e moelas, sendo distribuídos equitativamente por estas quatro origens; os restantes dois isolados são provenientes de amostras originárias de asas (Tabela 19).

Tabela19: Estudo da caracterização do grupo filogenético em isolados de *E. coli* obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima (isolados positivos e negativos no teste de detecção fenotípica de BLAEs).

Grupo filogenético	Amostras	Origem	Deteção fenotípica de BLAEs
A	P4A	Peito	(+)
	C4A	Coxas	(+)
	Pe4A	Pele	(+)
	M1A	Moelas	(+)
	M6A	Moelas	(+)
B1	A1A	Asas	(+)
	A5A	Asas	(+)
	P2A	Peito	(+)
	P5A	Peito	(+)
	C1A	Coxas	(+)
	C2A	Coxas	(+)
	C3A	Coxas	(+)
	C5A	Coxas	(+)
	Pe1A	Pele	(+)
	Pe3A	Pele	(+)
M3A	Moelas	(+)	
B2	A2A	Asas	(-)
	A3A	Asas	(+)
	P1A	Peito	(-)
D	A4A	Asas	(+)
	A6A	Asas	(+)
	P3A	Peito	(-)
	P6A	Peito	(+)
	C6A	Coxas	(+)
	Pe5A	Pele	(+)
	M4A	Molas	(-)
	M5A	Moelas	(+)

CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO

A microflora bacteriana intestinal dos animais de consumo, assim como os seus produtos constituem ambientes favoráveis para a sobrevivência, transferência e disseminação de bactérias resistentes, entre animais e o Homem. A comunidade científica reconhece a necessidade de realizar a avaliação da susceptibilidade aos antibióticos em “bactérias indicadoras” (como *Escherichia coli*) de diversas origens, tendo em vista o combate o aumento da resistência antimicrobiana (Schroeder *et al.*, 2003; Angulo *et al.*, 2004; Oguttu *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2008).

Um melhor conhecimento do impacto de diferentes antibióticos, em diferentes nichos, constitui um passo importante no controlo da emergência e disseminação da resistência em geral.

Este trabalho teve como objectivo, estudar a colonização por *E. coli* em frangos para consumo, detectar as taxas de resistência a distintos antibióticos, com especial relevo aos antibióticos β -lactâmicos, tendo especial interesse a pesquisa de estirpes produtoras de β -lactamases de amplo espectro (BLAE), bem como a pesquisa da presença de factores de virulência.

No que respeita às amostras de carne de frango, semeadas em placas de Levine não suplementadas com cefotaxima, obtivemos isolados de *E. coli* de todas as amostras (100%), o que consiste com os resultados obtidos em dois estudos realizados com amostras de carne de frango na Tunísia (Soufi *et al.*, 2009; Soufi *et al.*, 2011). Os valores encontrados, no nosso estudo, são superiores aos valores encontrados em estudos realizados com amostras de carne de frango nos Estados Unidos da América, no Japão, no Vietname e em Espanha (43%, 60%, 63,3% e 68,1%, respectivamente) (Sáenz *et al.*, 2001; Schroeder *et al.*, 2003; Van *et al.*, 2008; Hiroi *et al.*, 2011).

Neste estudo obteve-se uma percentagem de resistência à ampicilina de 65,5% (isolados provenientes de amostras de asas, peito, coxas, pele e moela). A elevada percentagem de resistência (65,5%) detectada no presente estudo, é similar à identificada num estudo recente em isolados de *E. coli* provenientes de carcaças de frangos, na Tunísia (Soufi *et al.*, 2011). No entanto, a percentagem de resistência detectada é superior à encontrada em diversos estudos realizados na Dinamarca (15%) (Jakobsen *et al.*, 2010), na Tunísia (53%) (Soufi *et al.*, 2009), no Japão (48,3%) (Hiroi *et al.*, 2011), em Espanha (47%) (Sáenz *et al.*, 2001), e na Alemanha (>30%) (Guerra *et*

al., 2003) em isolados de *E. coli* provenientes de carne de frango. Um estudo efectuado por Van e colaboradores, no Vietname, em 2008 e, outro realizado por Ahmed *et al.*, (2009) no Japão revelaram percentagens de 84,2% e 73,9, respectivamente, de isolados resistentes à ampicilina, sendo estas percentagens mais elevadas do que a que se verifica no presente estudo (Van *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2009)

Os isolados obtidos neste trabalho foram susceptíveis ao imipenemo, amicacina, gentamicina e cefotaxima. Para o caso do imipenemo, amicacina, e cefotaxima os dados obtidos são corroborados com outros estudos em carne de frango realizados em diversos países (Sáenz *et al.*, 2001; Soufi *et al.*, 2009; Hiroi *et al.*, 2011; Soufi *et al.*, 2011). Por outro lado, os mesmos estudos referidos anteriormente, detectaram percentagens de resistência relativamente baixa à gentamicina (1,7% a 17%), o que difere dos resultados obtidos (Sáenz *et al.*, 2001; Soufi *et al.*, 2009; Hiroi *et al.*, 2011; Soufi *et al.*, 2011). Um outro estudo realizado no Vietname por Van e colaboradores, detectou uma percentagem de isolados de *E. coli* provenientes de amostras de carne de frango de 47,4% de isolados resistentes à gentamicina (Van *et al.*, 2008). Um outro realizado por Ahmend *et al.*, (2009) no Japão revelou que 7,2% dos isolados provenientes de amostras de carne de frango eram resistentes à gentamicina e que 5,8% eram resistentes à cefotaxima (Ahmed *et al.*, 2009).

A percentagem de resistência às quinolonas testadas neste estudo (ácido nalidíxico e ciprofloxacina) foi elevada, sendo que 65,5% dos isolados apresentou resistência ao ácido nalidíxico (isolados provenientes de amostras de asas, peito, coxas, pele e moelas) e de 34,5% à ciprofloxacina (isolados provenientes de amostras de asas, peito, coxas e pele). Um estudo realizado na Tunísia por Soufi e colaboradores, em 2011, com carne de frango, apresentou 72,3% de isolados resistentes ao ácido nalidíxico e 19,9% à ciprofloxacina. Sendo que o valor de resistência encontrado para a primeira quinolona é ligeiramente superior ao encontrado na presente investigação. Quando comparados, os valores de resistência para a ciprofloxacina obtidos nos referidos trabalhos, verifica-se que a percentagem de resistência obtida por Soufi e colaboradores, é cerca de metade da resistência obtida no presente trabalho (34,5%) (Soufi *et al.*, 2011). Outro trabalho desenvolvido pelo mesmo autor com carne de frango, também na Tunísia em 2009, demonstrou uma percentagem de resistência ao ácido nalidíxico semelhante à obtida neste estudo, no entanto a percentagem de isolados resistentes à ciprofloxacina, encontrada pelo referido autor, foi reduzida (7%) (Soufi *et al.*, 2009). Dois outros estudos desenvolvidos a cabo com carne de frango no Japão e na

Dinamarca, também detectaram uma percentagem de resistência à ciprofloxacina baixa (6,7% e 7%) (Jakobsen *et al.*, 2010; Hiroi *et al.*, 2011). Outros estudos realizados com isolados provenientes de carne de frango demonstram que a percentagem de resistência a estas duas quinolonas é diferente, sendo que a percentagem de isolados resistentes ao ácido nalidíxico é superior à percentagem de isolados resistentes à ciprofloxacina, situação que também se verifica no nosso trabalho (Sáenz *et al.*, 2001; Guerra *et al.*, 2003; Van *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2009; Soufi *et al.*, 2009; Soufi *et al.*, 2011). As elevadas percentagens de resistência às quinolonas registadas poderá estar associada ao facto de estes serem usados comumente na produção intensiva de aves.

No presente trabalho, a percentagem de isolados resistentes ao sulfametoxazol-trimetropim (isolados provenientes de amostras de asas, peito, coxas, pele e moelas) foi de 27,6%. O valor obtido é inferior aos valores encontrados em estudos realizados em Espanha, Japão e Tunísia (34%, 50,7% e 77%, respectivamente) com amostras de carne de frango (Sáenz *et al.*, 2001; Ahmed *et al.*, 2009; Soufi *et al.*, 2009) No entanto, outro realizado na Alemanha por Guerra e colaboradores, também com amostras de carne de frango, revelou uma percentagem de resistência ao sulfametoxazol-trimetropim ligeiramente inferior (21%) à encontrada por nós (Guerra *et al.*, 2003).

A resistência à tetraciclina, nos isolados obtidos de placas de Levine não suplementadas, foi a que atingiu valores mais elevados, sendo de 72,4% (isolados provenientes de amostras de asas, peito, coxas, pele e moelas). Estudos levados a cabo por Soufi e colaboradores, em 2009 e 2011, na Tunísia, e por Van e colaboradores, em 2008, no Vietname, com carne de frango, revelaram percentagens de resistência à tetraciclina muito elevadas (83%, 95,2% e 84,2% respectivamente) (Soufi *et al.*, 2009; Van *et al.*, 2008; Soufi *et al.*, 2011). Por outro lado, outros autores detectaram percentagens de resistência em isolados de *E. coli* provenientes de amostras de frango, mais baixas do que as detectadas no nosso estudo (Sáenz *et al.*, 2001; Ahmed *et al.*, 2009; Hiroi *et al.*, 2011), e mesmo percentagens reduzidas de resistência (8%) (Jakobsen *et al.*, 2010).

Neste trabalho obteve-se uma percentagem de resistência ao cloranfenicol de 34,5% (isolados provenientes de amostras de asas, peito, coxas, pele e moela). Um estudo levado a cabo por Van e colaboradores no Vietname em isolados de *E. coli* provenientes de carne de frango, obteve uma percentagem de isolados resistentes ao cloranfenicol (57,9%) superior à encontrada pelo nosso grupo de investigação (Van *et al.*, 2008). No entanto, a percentagem de resistência detectada é superior à encontrada

em diversos estudos realizados na Tunísia (7% e 19,3%) (Soufi *et al.*, 2009; Soufi *et al.*, 2011), no Japão (10% e 17,4%) (Ahmed *et al.*, 2009; Hiroi *et al.*, 2011), em Espanha (8%) (Sáenz *et al.*, 2001) e na Dinamarca (1%) (Jakobsen *et al.*, 2010), em isolados de *E. coli* provenientes de carne de frango.

A percentagem de resistência à tobramicina encontrada neste estudo foi de 6,9% (isolados provenientes de amostras de peito e coxas). O valor encontrado está de acordo com os valores encontrados nos estudos realizados por Sáenz e colaboradores, em 2001 em Espanha (6%), e por Soufi e colaboradores, e 2009 na Tunísia (7%), com isolados de *E. coli* provenientes de amostras de carne de frango (Sáenz *et al.*, 2001; Soufi *et al.*, 2009).

A frequência de resistência à estreptomicina obtida neste estudo foi de 27,6% (isolados provenientes de amostras de asas, peito, coxas, pele e moela). Outros dois estudos levados a cabo por Soufi e colaboradores na Tunísia, um em 2009 e outro em 2011, realizados com isolados de *E. coli* provenientes de amostras de carne de frango, obtiveram-se valores de resistência à estreptomicina (80 % e 69,3%, respectivamente) muito superiores ao por nós encontrado (Soufi *et al.*, 2009; Soufi *et al.*, 2011). Outros dois estudos realizados no Vietname e no Japão, também com isolados de *E. coli* provenientes de amostras de carne de frango, registaram igualmente valores de resistência à estreptomicina elevados (63,2% e 66,6%, respectivamente), sendo estes valores, cerca do dobro do valor de resistência à estreptomicina obtido no nosso estudo (27,6%) (Van *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2009). Um trabalho realizado por Jakobsen *et al.*, (2010), na Dinamarca, também com isolados provenientes de carne de frango, evidenciou uma percentagem de isolados resistentes à estrptomicina reduzida (7%) (Jakobsen *et al.*, 2010).

A percentagem de resistência aos β -lactâmicos amoxicilina + ácido clavulânico e cefoxitina foi de 13,8 %, sendo que os isolados resistentes foram provenientes de amostras de peito, coxas e pele, em ambos os casos. Para a amoxicilina + ácido clavulânico, os resultados obtidos foram corroborados com os dados obtidos nos estudos levados a cabo em Espanha por Sáenz *et al.*, (2001) (13%), no Vietname por Van *et al.*, (2008) (15,8%) e no Japão por Ahmed *et al.*, (2009) (10%), sendo todos realizados com isolados de *E. coli* provenientes de amostras de carne de frango (Sáenz *et al.*, 2001; Van *et al.*, 200; Ahmed *et al.*, 2009). Por outro lado, estudos levados a cabo por Soufi e colaboradores em 2009 e 2011, detectaram percentagens de resistência em isolados de *E. coli* provenientes de amostras de frango, mais baixas (3,6%) do que as

detectadas por nós e mesmo nenhum isolado resistente à amoxicilina + ácido clavulânico (Soufi *et al.*, 2009; Soufi *et al.*, 2011). Para a cefoxitina, a percentagem de resistência detectada é superior à encontrada em diversos estudos realizados em Espanha (6%) (Sáenz *et al.*, 2001) e na Tunísia (0% e 1,2%) (Soufi *et al.*, 2009; Soufi *et al.*, 2011), em isolados de *E. coli* provenientes de carne de frango. Um estudo realizado por Ahmed e colaboradores, no Japão revelou que os isolados provenientes de amostras de carne de frango apresentavam uma percentagem de resistência à cefoxitina de 23,2% (Ahmed *et al.*, 2009).

No presente trabalho, a percentagem de resistência aos antibióticos β -lactâmicos ceftazidima e aztreonam foi de 3,5 %, sendo que para ambos os antibióticos, os isolados que evidenciaram a resistência são provenientes de amostras de coxas. A percentagem de resistência encontrada para estes β -lactâmicos, apesar de reduzida, é superior à encontrada em estudos realizados em Espanha (Sáenz *et al.*, 2001), e na Tunísia (Soufi *et al.*, 2009; Soufi *et al.*, 2011). Por outro lado a percentagem de resistência detectada para estes antibióticos, é inferior à encontrada por Ahmed *et al.*, (2009) num estudo realizado no Japão com isolados de *E. coli* provenientes de amostras de carne de frango, 13% para a ceftazidima e 15,9 % para o aztreonam (Ahmed *et al.*, 2009).

A percentagem de multirresistência encontrada no nosso estudo foi de 55,2 %. Dois estudos realizados no Japão por Ahmed *et al.*, (2009) e Hiroi *et al.*, (2011) com amostras de carne de frango encontraram multirresistência (40,6% e 25,9%, respectivamente) numa percentagem inferior (Ahmed *et al.*, 2009; Hiroi *et al.*, 2011). O valor encontrado, esta de acordo com os valores encontrados nos estudos realizados por Guerra *et al.*, (2003) na Alemanha (61%), com isolados de *E. coli* provenientes de amostras de carne de frango (Guerra *et al.*, 2003). Dois estudos realizados por Soufi *et al.*, (2009 e 2011) na Tunísia encontraram multirresistência em 96 % e 90%, respectivamente, dos isolados (Soufi *et al.*, 2009; Soufi *et al.*, 2011).

Nas placas de Levine suplementadas com antibiótico obtiveram-se a partir de 29 amostras de carne de frango (6 de asas, 6 de peito, 6 de coxas, 6 de pele e 5 de moelas), 27 isolados (93,1%) (6 de asas, 6 de peito, 6 de coxas, 4 de pele e 5 de moelas). Dos 27 isolados obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima, 23 isolados (5 de asas, 4 de peito, 6 de coxas, 4 de pele e 4 de moelas) apresentaram fenótipo positivo de produção de β -lactamases de amplo espectro (BLAE). O que corresponde a uma percentagem de 85,2% (23/27) de estirpes produtoras de β -lactamases de amplo espectro (BLAE). Um outro estudo realizado em Portugal, com isolados de *E. coli*

provenientes de amostras de carcaças de frango adquiridas em talhos, por Machado *et al.*, (2008), detectou estirpes produtoras de β -lactamases de amplo espectro (BLAE) em 60% dos isolados. Apesar da percentagem de estirpes BLAE encontrada ser elevada, ainda se encontra abaixo do valor encontrado no presente trabalho (85,2%) (Machado *et al.*, 2008). Um estudo realizado na Holanda por Overdeest e colaboradores em 2011, com isolados de *E. coli* provenientes de amostras de carne de frango, encontrou estirpes BLAE em 79,8% dos isolados (Overdeest *et al.*, 2011). A percentagem de estirpes BLAE encontrada por Overdeest *et al.*, (2011) vai de encontro aos resultados obtidos.

Um trabalho levado a cabo por Yuan *et al.*, (2009), com isolados provenientes de amostras de fígado de frangos doentes, realizado na China, detectou estirpes BLAE em 60,8% dos casos. Apesar de se tratar de amostras provenientes de animais doentes, a percentagem de estirpes BLAE encontrada é inferior à encontrada no presente estudo. Um trabalho realizado na Dinamarca por Jensen e colaboradores em 2006, com isolados de *E. coli* provenientes de amostras de bifés de carne de vaca, importada da Alemanha, vendidos em talhos na Dinamarca, detectou 2,8% (apenas 1 isolado) isolados BLAE, sendo este valor muito inferior ao encontrado (Jensen *et al.*, 2006). Outros estudos realizados com alimentos, mas de origem vegetal (saladas com alface e tomate) realizados em Espanha, por Mesa *et al.*, (2006) e por Egea *et al.*, (2011) com isolados de *E. coli*, detectaram 1,3% e 3%, respectivamente, de estirpes de *E. coli* BLAE, sendo o valor de estirpes BLAE encontradas nas saladas muito inferior à encontrada no nosso estudo (Mesa *et al.*, 2006; Egea *et al.*, 2011).

A percentagem de estirpes de *E. coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro (BLAE) encontrada no presente estudo (85,2%), é superior à encontrada por outros realizados na Bélgica por Smet *et al.*, (2008) (45%), em Portugal por Costa *et al.*, (2009) (38,2%), em Espanha por Blanc *et al.*, (2006) (26,6%) e por um outro estudo realizado em Portugal por Machado *et al.*, (2008) (10%), realizados com isolados de *E. coli* provenientes de fezes de galinhas saudáveis (Blanc *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2008; Smet *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009).

Poucos trabalhos têm sido publicados com estirpes de *E. coli* provenientes de amostras de alimentos, com vista a avaliar a presença e/ou ausência de estirpes BLAE. No entanto no que concerne a animais destinados ao consumo humano, os estudos são mais abundantes e variados (estudos realizados com fezes de animais vivos, dos estábulos e fezes retiradas de animais abatidos destinados à alimentação).

Vários estudos realizados com amostras fecais de animais, demonstraram que estirpes de *E. coli* BLAE estão presentes em animais saudáveis destinados ao consumo humano, como aves (frangos e perus) (Briñas *et al.*, 2003; Smet *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009; Carneiro *et al.*, 2010), suínos (Kozak *et al.*, 2008; Escudero *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2010), bovinos (Jouini *et al.*, 2007), peixes (Sousa *et al.*, 2011) e coelhos (Blanc *et al.*, 2006; Mesa *et al.*, 2006). Outros demonstraram, igualmente, que estirpes *E. coli* BLAE se encontram em humanos e em ambiente hospitalar (Machado *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2007), outros têm como objectivo avaliar o papel dos alimentos como veículo de transmissão de estirpes multirresistentes, nomeadamente de estirpes BLAE (Oguttu *et al.*, 2008; Heider *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Doi *et al.*, 2010).

Todos os trabalhos referidos anteriormente, bem como o presente, demonstram que estirpes de *E. coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro (BLAE) estão presentes em diferentes nichos, assim como disseminadas ao longo de toda a cadeia alimentar. A utilização massiva de antibióticos β -lactâmicos em medidas profiláticas e no tratamento dos animais, parece ter sido a causa do início do aparecimento e da selecção de bactérias produtoras de β -lactamases de amplo espectro, o que poderá explicar a elevada percentagem de BLAEs encontrada.

O gene *bla*_{TEM} foi detectado em 56,5% dos 23 isolados BLAE (13/23) (3 de asas, 3 de peito, 3 de coxas, 3 de pele e 1 de moelas), que após sequenciar o amplicão obtido por PCR foi identificado como *bla*_{TEM-52}. O gene *bla*_{TEM-52} já foi detectado amostras de carne de frango em estudos realizados em Portugal (Machado *et al.*, 2008) e na Holanda (Overdevest *et al.*, 2011), bem como em isolados provenientes de outros alimentos de origem animal em estudos realizados na Dinamarca (Jensen *et al.*, 2006), assim como em animais para consumo (incluindo peixes) e mesmo em animais selvagens, em estudos realizados em Portugal, Espanha, França e Bélgica (Blanc *et al.*, 2006; Cloeckert *et al.*, 2007; Poeta *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009; Carneiro *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2011).

O gene *bla*_{CTX-M-1} foi encontrado em apenas dois isolados (1 de asas e 1 de moelas). Este gene também foi detectado num isolado proveniente de carcaças de frango adquiridas em talhos, por Machado *et al.*, (2008) num estudo realizado em Portugal; bem como em isolados provenientes de carne de frango, num estudo realizado por Overdevest *et al.*, (2011), na Holanda (Machado *et al.*, 2008; Overdevest *et al.*, 2011). O gene *bla*_{CTX-M-1} detectado no nosso estudo foi analisado por outros autores

estando a sua presença identificada em isolados fecais de frangos, suínos, animais selvagens entre outros (Briñas *et al.*, 2005; Blanc *et al.*, 2006; Girlich *et al.*, 2007; Escudero *et al.*, 2007; Radhouani *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2010)

O gene *bla*_{CTX-M-9} foi encontrado em 4 isolados (3 de asas e 1 de pele). Outros autores identificaram a sua presença em estudos realizados em Espanha com isolados provenientes de animais para consumo (frangos, suínos e coelhos) (Briñas *et al.*, 2005; Blanc *et al.*, 2006; Escudero *et al.*, 2007), assim como em ambiente hospitalar (Brizio *et al.*, 2006; Doi *et al.*, 2010).

O gene *bla*_{CTX-M-14a} está amplamente disseminado na família *Enterobacteriaceae* em diversos países, incluindo Portugal, onde foi identificado em animais para consumo, animais selvagens, animais de companhia e mesmo em ambiente hospitalar (Costa *et al.*, 2004; Briñas *et al.*, 2005; Jouini *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2007; Poeta *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009; Carneiro *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2010). No nosso trabalho o gene *bla*_{CTX-M-14a} foi detectado em 4 dos 23 isolados BLAE (1 de asas, 1 de peito e 2 de moelas).

Os quatro tipos de BLAEs identificados: *bla*_{TEM-52}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9} e *bla*_{CTX-M-14a}, já foram anteriormente descritos em Portugal (Brizio *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2007; Poeta *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009; Carneiro *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2010; Radhouani *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2011).

Dos 23 isolados BLAE obtidos, todos apresentaram um fenótipo de resistência à ampicilina. O mecanismo predominante de resistência à ampicilina detectado neste trabalho foi a produção de β -lactamases do tipo TEM. Outros autores detectaram este mesmo mecanismo em isolados de *E. coli* BLAE provenientes de alimentos (Briñas *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2008), de animais para consumo (Briñas *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2009; Carneiro *et al.*, 2010), em humanos (Briñas *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2007) e mesmo em animais selvagens (Poeta *et al.*, 2008).

O mecanismo de resistência à tetraciclina através de bombas de efluxo é o mais abundante em bactérias Gram-negativas, encontrando-se os genes *tetA* e *tetB*, como codificadores de resistência a este agente, mais frequentemente em isolados de *E. coli* (Chopra and Roberts, 2001; Poole, 2005; Roberts, 2005). Dezassete, dos 23 isolados BLAE, apresentaram um fenótipo de resistência à tetraciclina. Destes 17, o gene *tetA* foi detectado em 15 e o gene *tetB* em 2 isolados. Os genes *tetA* e *tetB* já foram descritos como predominantes na resistência à tetraciclina em outros estudos levados a cabo com isolados de *E. coli* BLAE provenientes de amostras de animais para consumo (Carneiro

et al., 2010; Gonçalves *et al.*, 2010), em animais selvagens (Poeta *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009; Poeta *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2010; Radhouani *et al.*, 2010) e mesmo em animais de companhia (Costa *et al.*, 2008a).

No presente estudo foram identificadas 4 estirpes, das 23 BLAE, resistentes à gentamicina, sendo todas produtoras do gene codificante de AAC(3)-II. Para *Escherichia coli* pode-se observar várias que modificam este antibiótico, inactivando-o. O gene codificante da enzima AAC(3)-II já foi identificado anteriormente em estudos realizados com isolados de *E. coli* provenientes de amostras de animais para consumo (Guerra *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2009), animais selvagens (Costa *et al.*, 2008b; Radhouani *et al.*, 2010) e animais de companhia (Costa *et al.*, 2008a).

Nos 11 isolados (dos 23 BLAE) com fenótipo de resistência à estreptomicina, 8 apresentaram o gene *aadA*. Este resultado encontra-se de acordo com estudos efectuados por outros autores com amostras fecais de animais para consumo (Costa *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2010), animais selvagens (Costa *et al.*, 2008b; Poeta *et al.*, 2008; Poeta *et al.*, 2009) e animais de companhia (Costa *et al.*, 2008a).

Apenas 1, dos 23 isolados BLAE, apresentou um fenótipo de resistência ao cloranfenicol, sendo identificado o gene *cmlA* como sendo o responsável pela resistência a este antibiótico. Este gene já foi encontrado, como responsável pela resistência ao cloranfenicol em estudos realizados com estirpes de *E. coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro provenientes de animais para consumo (Costa *et al.*, 2009) e animais selvagens (Poeta *et al.*, 2008; Poeta *et al.*, 2009).

No nosso estudo foram identificadas 20 estirpes, das 23 BLAE, resistentes ao ácido nalidíxico e 10 à ciprofloxacina, sendo que estas últimas, evidenciaram um fenótipo de resistência ao ácido nalidíxico. Todos os 20 isolados resistentes ao ácido nalidíxico possuíam o gene *gyrA* com duas mutações que provocam alterações aminoacídicas (substituição no tripleto 83 da produção de serina por leucina e no tripleto 87 da produção de ácido aspártico por asparagina). Os 10 isolados resistentes à ciprofloxacina possuíam o gene *parC* com uma mutação no tripleto 80 que causa alteração aminoacídica (serina por isoleucina).

As mutações nos tripletos 83 e 87 do gene *gyrA* e no tripleto 80 do gene *parC*, são descritas por outros autores, como sendo as mais frequentes em estudos realizados com estirpes provenientes de amostras de animais para consumo (Jouine *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2009; Hordijk *et al.*, 2011), animais selvagens (Costa *et al.*, 2008b; Poeta *et*

al., 2009), de humanos (Moon *et al.*, 2010; Bansal and Tandon *et al.*, 2011) e mesmo de animais de companhia (Costa *et al.*, 2008a).

As mutações no gene *gyrA*, no caso do triplete 83 conduzem à incapacidade de formar as pontes de hidrogénio. A substituição no triplete 87 implica a perda de um aminoácido carregado negativamente. O conjunto destas duas mutações é importante na interacção da quinolona com o complexo DNA girase-DNA. A substituição no triplete 80 do gene *parC* provoca a perda da capacidade para formar pontes de hidrogénio (Sáenz, 2004).

Mutações no triplete 83, do gene *gyrA*, de serina por um ácido hidrofóbico (como a leucina) confere um grau de resistência superior, do que a mesma mutação no triplete 87. Quando ocorrem em conjunto mutações nos dois tripletos (83 e 87), os níveis de resistência podem ser cerca de duas a três vezes superiores, quando comparados com espécies que apenas possuem mutação em um dos locais (Drlica and Zhao, 1997). Em regra, a mutação no triplete 83, do gene *gyrA*, está associada a um moderado nível de resistência, no entanto, a co-existência de uma mutação no triplete 83 e, de uma outra ou duas no gene *parC* está associada a um maior grau de resistência. A existência em conjunto de três mutações (duas no gene *gyrA* e uma no gene *parC*), esta associada a um elevado nível de resistência, sendo que a existência conjunta de quatro mutações (duas no gene *gyrA* e duas no gene *parC*) está associada a níveis muito elevados de resistência (Drlica and Zhao, 1997). Tal ocorre porque, o grau de susceptibilidade está directamente relacionado com a localização e com o número das mutações ocorridas (Trees *et al.*, 1998).

As estirpes portadoras de BLAEs apresentam, frequentemente, um fenótipo de multirresistência que abrange vários antibióticos não β -lactâmicos. De acordo com os resultados do presente estudo, assim como, os resultados publicados por outros, verifica-se uma clara associação de estirpes produtoras de β -lactamases de amplo espectro à resistência a vários outros antibióticos, tais como sulfonamidas, quinolonas, aminoglicósidos, entre outros (Brizio *et al.*, 2006; Poeta *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009; Carneiro *et al.*, 2010; Radhouani *et al.*, 2010). Esta informação é de extrema importância, na medida em que pode ser fundamental para uma melhor compreensão de possíveis mecanismos de co-selecção que ocorrem em estirpes BLAE devido ao uso de antibióticos não β -lactâmicos.

De realçar, que no nosso estudo foram detectadas 4 estirpes (1 de asas, 2 de peito e 1 de moelas) com hiperprodução de β -lactamases do tipo AmpC (os 4 isolados de

Escherichia coli obtidos de placas com Levine suplementadas com cefotaxima, que evidenciaram resultado negativo para o teste de detecção fenotípica de BLAEs). Esta hiperprodução, é originada por mutações pontuais no promotor deste gene nas posições -42 (C→T); -18 (G→A) e -1 (C→T) e na região atenuadora na posição +58 (C→T).

Sabe-se que, não são apenas as mutações que ocorrem na região promotora do gene *ampC* que contribuem para a hiperprodução de β-lactamases do tipo AmpC, mas, também, as mutações que ocorrem na região atenuadora, uma vez que estas destabilizam a estrutura *hairpin*, o que faz com que a transcrição aumente (Smet *et al.*, 2008).

As mutações nas posições -42 (C→T); -18 (G→A); -1 (C→T) e +58 (C→T) na região promotora/atenuadora do gene *ampC*, já foram descritas anteriormente por outros autores em isolados de *E. coli* provenientes de amostras fecais de aves (frango e avestruzes), em estudos realizados em Portugal (Costa *et al.*, 2009; Carneiro *et al.*, 2010) e em estudos realizados em Espanha (Briñas *et al.*, 2002; Briñas *et al.*, 2003). Estas mutações, também, já foram descritas em isolados de *E. coli* provenientes de amostras fecais de animais de consumo (Briñas *et al.*, 2005; Escudero *et al.*, 2010) e, mesmo, em isolados de *E. coli* provenientes de humanos (Briñas *et al.*, 2002). A hiperprodução cromossomal de AmpC constitui um possível mecanismo de diminuição da sensibilidade à cefotaxima e à ceftazidima dado que mutações nas posições -42; -18; -1 e +58 na região atenuadora/promotora do gene *ampC* foram descritas anteriormente pela sua importância no aumento do nível de transcrição do gene *ampC* (Caroff *et al.*, 1999; Nelson and Elisha *et al.*, 1999; Briñas *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2009).

A presença de integrões com genes cassete que conferem resistência aos antibióticos aumenta a frequência das estirpes bacterianas multirresistentes. No nosso estudo, analisou-se a presença dos integrões nos 27 isolados de *E. coli* obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima (isolados positivos e negativos no teste de detecção fenotípica de BLAEs), sendo que foram encontrados 8 isolados que continham um integrão de classe 1 e quatro isolados apresentaram um integrão de classe 2. Os integrões de classe 1 possuem, por norma, na região conservada 3' os genes *qacEΔ1* e *sul1*, sendo a ausência destes genes descrita com pouca frequência (Sáenz, 2004; Sunde, 2005), sendo que no nosso estudo em todos os isolados que possuíam o integrão de classe 1 foram detectados os genes *qacEΔ1* e *sul1*.

Dos 8 isolados que possuíam o integrão de classe 1, quatro apresentaram a região variável *aadA1* e os restantes quatro apresentaram a região variável *dfrA1*.

Todos os isolados que continham a região variável *aadA1* (isolados provenientes de amostras de asas, peito e moelas), apresentaram um resultado negativo no teste de detecção fenotípica de BLAEs, por outro lado, os quatro isolados que continham a região variável *dfrA1* (isolados provenientes de amostras de peito, coxas, pele e moelas), foram todos positivos no teste de detecção fenotípica. Os genes cassete *aadA1* e *dfrA1* encontrados têm sido frequentemente detectados em outros estudos em isolados de *E. coli* provenientes de alimentos, animais de consumo, de humanos, animais de companhia e mesmo em animais selvagens (Sunde, 2005; Skurnik *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2008b; Machado *et al.*, 2008; Poeta *et al.*, 2008; Vinué *et al.*, 2008)

Os 4 isolados onde foram detectados integrões de classe 2 (isolados provenientes de amostras de asas, peito, coxas e pele) apresentaram a região variável composta pelos genes cassete *dfrA1 + sat 2+ aadA1*, apresentando todos um resultado positivo no teste de detecção fenotípica de BLAEs. Esta região variável encontra-se descrita por Machado e colaboradores (2008) em isolados de *E. coli* provenientes de animais de consumo (galinhas e porcos), num estudo realizado em Portugal (Machado *et al.*, 2008).

O facto de, alguns isolados albergarem integrões e apresentarem graus elevados de resistência a determinados antibióticos, contrariamente ao que acontece nos isolados que não apresentam o integrões, pode ser explicado devido à presença de genes de resistência nas regiões variáveis e/ou conservadas dos integrões, ou pela inclusão de genes de resistência e integrões no mesmo elemento transponível (Vinué *et al.*, 2008). Tendo em conta os resultados obtidos, podemos verificar que a resistência à estreptomicina e ao sulfametoxazol-trimetropim encontra-se nos genes incluídos nos integrões, facto que lhes confere uma maior capacidade de disseminação.

Muitas das estirpes potencialmente patogénicas estão presentes na flora entérica, sendo que o seu potencial patogénico está directamente relacionado com a presença de factores de virulência (Tiba *et al.*, 2008). No presente estudo, a pesquisa da presença dos genes codificadores de factores de virulência foi realizada nos 27 isolados de *E. coli* obtidos de placas de Levine com suplemento de cefotaxima (isolados positivos e negativos no teste de detecção fenotípica de BLAEs). O gene codificador de virulência *aer* foi detectado em 20 isolados (isolados provenientes de amostras de todas as origens), sendo o mais detectado. O gene *fimA* foi detectado em 11 dos 27 isolados (isolados provenientes de amostras de asas, peito, coxas e pele). Num estudo realizado por Carneiro *et al.*, (2010), em Portugal com isolados provenientes de amostras fecais de avestruzes, detectou que em todos os isolados BLAE se verificava a presença dos

genes codificadores de virulência *aer* e *fimA* (Carneiro *et al.*, 2010). Os resultados obtidos no nosso estudo, vão de encontro aos resultados obtidos por Carneiro e colaboradores (2010) e por Ruiz e colaboradores (2002), onde o gene *fimA* e o gene *aer* foram os mais detectados (Ruiz *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2010).

O gene *papC* foi detectado em apenas 2 isolados (isolados provenientes de amostras de peito e moelas). Um estudo levado a cabo por Tiba *et al.*, (2008) com isolados clínicos, detectou este gene numa percentagem superior à encontrada por nós (Tiba *et al.*, 2008). A percentagem de factores de virulência em isolados clínicos é superior à percentagem de genes codificadores de virulência encontrada no presente estudo (Ruiz *et al.*, 2002; Tiba *et al.*, 2008; Ewers *et al.*, 2009).

A classificação filogenética de *E. coli* baseia-se em sequências de DNA utilizadas como determinantes. As estirpes que foram identificadas nos grupos A e B1 são associadas a bactérias comensais não causadoras de infecções extra-intestinais. As estirpes enquadradas nos grupos B2 e D estão associadas a bactérias implicadas em infecções extra-intestinais, sendo mais patogénicas (Clermont *et al.*, 2000). No nosso estudo, dos 27 isolados de *E. coli* provenientes de placas com suplemento de cefotaxima, 16 pertenceram aos grupos filogenéticos denominados comensais (A ou B1) e 11 pertenceram aos grupos filogenéticos mais comumente envolvidos em infecções extra-intestinais e que possuem a maioria dos factores de virulência (B2 ou D).

Dos 27 isolados, 5 foram identificadas como pertencentes ao grupo A (isolados provenientes de amostras de peito, coxas, pele e moelas) e 11 ao grupo B1 (isolados provenientes de amostras de todas as origens). Todos os isolados pertencentes a estes dois grupos filogenéticos apresentaram um resultado positivo no teste de detecção fenotípica de BLAEs. Três dos isolados pertenceram ao grupo B2 (isolados provenientes de amostras de asas e peito), sendo que 2 destes isolados apresentaram um resultado negativo no teste de detecção fenotípica de BLAEs. Por último, 8 isolados pertenceram ao grupo D (isolados provenientes de amostras de todas as origens). Dos 8 isolados pertencentes a este grupo, 2 apresentaram um resultado negativo no teste de detecção fenotípica de BLAEs.

Os resultados obtidos no nosso estudo vão de encontro aos resultados obtidos em outros dois, um realizado em Portugal e outro na Austrália, ambos realizados com amostras de *E. coli* provenientes de amostras fecais de frango (Costa *et al.*, 2009; Obeng *et al.*, 2011). Um estudo levado a cabo por Ewers e colaboradores (2009), na Alemanha, com isolados de *E. coli* provenientes de amostras fecais de frangos, obteve resultados

que diferem dos obtidos por nós, uma vez que, detectou uma percentagem mais elevada de estirpes pertencentes aos grupos mais comumente envolvidos em infecções extra-intestinais e mais virulentos (B2 e D), comparativamente com a percentagem de estirpes classificadas nos grupos tipicamente comensais (A e B1) (Ewers *et al.*, 2009). Um outro trabalho realizado em Portugal por Machado *et al.*, (2008), com isolados de *E. coli* provenientes de amostras de carne e fezes de frango, detectou que os isolados obtidos se distribuíam equitativamente entre os grupos tipicamente comensais (A e B1) e os grupos mais frequentemente envolvidos em processos de infecções extra-intestinais (Machado *et al.*, 2008).

A descrição de estirpes de *E. coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro, classificadas filogeneticamente nos grupos B2 e D (grupos mais virulentos e causadores de infecções) em Portugal, tem sido descrita em isolados provenientes de animais para consumo (frangos) e de carne de frango (Machado *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009). Contudo, também têm sido descritas estirpes de *E. coli* proveniente de isolados de nichos completamente distintos dos descritos anteriormente (ecossistemas selvagens) (Poeta *et al.*, 2008; Poeta *et al.*, 2009; Radhouani *et al.*, 2010).

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a presença de estirpes comensais de *Escherichia coli* de carne de frango, com perfis de resistência distintos a vários antimicrobianos e com genes codificadores de virulência.

De um modo geral, podemos concluir:

1. Foram isolados estirpes de *E. coli* de todas as amostras de carne de frango semeadas em placas de Levine não suplementadas com cefotaxima. Mais de metade dos isolados (16/29) apresentaram um fenótipo de multiresistência.
2. Das amostras de carne de frango semeadas em placas de Levine suplementadas com cefotaxima, foram obtidas estirpes de *E. coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro (BLAE) em 79,3% das amostras.
3. O tipo de BLAE predominante nos isolados de *E. coli* de amostras de carne de frango é o tipo TEM, sendo em todos os isolados identificada a variante TEM-52. Também foram identificadas estirpes BLAE do tipo CTX (variantes CTX-M-1; CTX-M-9 e CTX-M14a).
4. Nos isolados que evidenciaram um fenótipo de resistência às quinolonas, verificou-se que a resistência a estes antibióticos era devida a mutações no gene *gyrA* (no triplete 83, ocorrendo a troca aminoacídica de serina por leucina e no triplete 87 da produção de ácido aspártico por asparagina) e *parC* (no triplete 80, verificando-se a troca aminoacídica de serina por isoleucina).
5. Os 23 isolados BLAE apresentaram, frequentemente, resistência a outros antibióticos, nomeadamente, tetraciclina, estreptomicina e sulfametoxazol-trimetropim.
6. Dos isolados provenientes de placas de Levine suplementado com cefotaxima foram identificados 4 com hiperprodução de β -lactamases do tipo AmpC. A hiperprodução do gene *ampC* é originada por mutações na região promotora/atenuadora nas posições -42; -18; -1 e +58.

7. A maioria dos isolados de *E. coli* resistentes ao sulfametoxazol-trimetropim apresentam “genes cassete” incluídos em integrões de classe 1 ou classe 2, detectando-se uma diversidade na organização genética dos mesmos. A inclusão de genes de resistência em integrões favorece a co-selecção mediante o uso de antibióticos não relacionados, o que pode explicar o surgimento de estirpes multirresistentes.
8. Foi identificada a presença de genes codificadores de factores de virulência nos 27 isolados provenientes de placas de Levine suplementadas com cefotaxima. O gene *aer* foi identificado em 20 isolados, o gene *fimA* em 11 isolados e o gene *papC* em 2 isolados.
9. Dos 27 isolados provenientes de placas de Levine com suplemento de cefotaxima, 16 pertenceram aos grupos filogenéticos tipicamente comensais (A e B1) e 11 pertenceram aos grupos filogenéticos mais comumente envolvidos em infecções extra-intestinais (B2 e D).

O presente estudo demonstrou que, a presença de estirpes de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro (BLAEs) em isolados provenientes de amostras de carne de frango, é elevada, o que indica que estes animais constituem um reservatório de bactérias resistentes, que podem ser transferidas a outros animais e ao Homem ao longo de toda a cadeia alimentar.

Com os resultados obtidos no presente trabalho, pretende-se alertar para a presença de estirpes de bactérias comensais, como *Escherichia coli*, com um perfil de multirresistência, bem como estirpes produtoras de β -lactamases de amplo espectro (BLAEs), em isolados de alimentos (aparentemente inócuos), cuja presença, por si só coloca um desafio à segurança alimentar, uma vez que levanta questões no que respeita à disseminação dos genes responsáveis pela resistência.

Assim, todos os cuidados higio-sanitários ao longo de toda a cadeia alimentar devem ser assegurados, para evitar que estirpes que apresentam um fenótipo de resistência contaminem o Homem e transfiram para a sua microflora endógena, bem como para espécies potencialmente patogénicas, os genes de resistência.

Porque, uma vez que ocorra contaminação do Homem, poderá ocorrer, através de processos de contaminação cruzada, a transferência dos genes de resistência para a

microflora endógena do Homem, bem como para espécies potencialmente patogénicas para o Homem.

Os dados obtidos neste trabalho são importantes para alertar para a disseminação de estirpes BLAE, assim como, para a necessidade de estabelecer políticas de uso prudente de antibióticos em animais de consumo, bem como em humanos. De salientar a importância de continuar estudos de vigilância da resistência aos antibióticos, tendo em vista a evolução da resistência no tempo, em diferentes nichos, assim como o estudo de factores que influenciam a sua selecção e disseminação.

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, S. L., J. O'Connor, T. Robin, B. L. Zimmer, and J. M. Janda.** 2003. Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**:4852-4854.
- Ahmed, A. M., H. Shimabukuro, and T. Shimamoto.** 2009. Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella* from retail chicken meat in Japan. *Journal of Food Science*. **74**:405-410.
- Ambler, R. P.** 1980. The Structure of β -Lactamases. *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*. **289**:321-331.
- Angulo, F. J., N. L. Baker, S. J. Olsen, A. Anderson, and T. J. Barrett.** 2004. Antimicrobial Use in Agriculture: Controlling the Transfer of Antimicrobial Resistance to Humans. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. **15**:78-85.
- Antunes, P., J. Machado, and L. Peixe.** 2006. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **58**:297-304.
- Appelberg, R.** 2010. Virulência Microbiana. In: Ferreira, W. F. C., J. C. F. Sousa, e N. Lima. 2010. *Microbiologia*. LIDEL – Edições Técnicas, Lda. pp. 261-282.
- Babic, M., A. M. Hujer, and R. A. Bonomo.** 2006. What's new antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Update*. **9**:142:156.
- Bansal, S., and V. tendon.** 2011. Contribution of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes to ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **37**:253-255.
- Barbosa, T. M., and S. B. Levy.** 2000. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates*. **3**:303-311.
- Batchelor, M., K. Hopkins, E. J. Threlfall, F. A. Clifton-Hadley, A. D. Stallwood, R. H. Davies, and E. Liebana.** 2005. *bla*CTX-M Genes in Clinical *Salmonella* Isolates Recovered from Humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **49**:1319-1322.
- Belaouaj, A., C. Lapoumeroulie, M. M. Canica, G. Vedel, P. Nénot, R. Krishnamoorthy, and G. Paul.** 1994. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like β -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiology Letters*. **120**:75-80.
- Bennett, P. M.** 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*. **153**:347-357.

Blanc, V., R. Mesa, M. Saco, S. Lavilia, G. Prats, E. Miro, F. Navarro, P. Cortés, and M. Llagostera. 2006. ESBL-and plasmidic class C β -Lactamases-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Veterinary Microbiology*. **118**:299-304.

Blattner, F. R., G. I. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453–1461.

Bonacorsi, S. P. P., O. Clermont, C. Tinsley, I. Le Gall, J. C. Beaudoin, J. Elion, X. Nassif, and E. Bingen. 2000. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. *Infection and Immunity*. **68**:2096-2101.

Bonten, M. J., R. Willems, and R. A. Weinstein. 2001. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *The Lancet Infectious diseases*. **1**:314-325.

Bradford, P. 2001. Extended-spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Importance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*. **14**:933-951.

Briñas, L., M. Zarazaga, Y. Sáenz, F. Ruiz-Larrea, and C. Torres. 2002. β -Lactamases in Ampicillin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Foods, Humans, and Healthy Animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **46**:3156-3163.

Briñas, L., M. A. Moreno, M. Zarazaga, C. Porrero, Y. Sáenz, M. Garcia, L. Domínguez, and C. Torres. 2003. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 β -Lactamases in *Escherichia coli* Fecal-Sample Isolates from Healthy Chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **47**:2056-2058.

Briñas, L., M. A. Moreno, T. Teshager, Y. Sáenz, M. C. Porrero, L. Domínguez, and C. Torres. 2005. Monitoring and Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* Strains from Healthy and Sick Animals in Spain in 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**:1262-1264.

Brizio, A., S. Vasco, A. R. Gonçalves, L. M. Lito, J. M. Cristino, M. J. Salgado, and A. Duarte. 2006. Survey of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from a Portuguese hospital and characterization of a novel class 1 integron (In60A) carrying the *bla*_{CTX-M-9} gene. *Journal of Antimicrobial Agents*. **28**:320-324.

Bronzwaer, S. L. A. M., O. Cars, U. Buchholz, S. Mölstad, W. Goettsch, I. K. Veldhuijzen, J. L. Kool, M. J. W. Sprenger, J. E. Degener, and participants in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. 2002. A European study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Diseases*. **8**:278-282.

Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **39**:1211-1233.

Bush, K. 2001. New beta-lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clinical Infections Diseases*. **32**:1085-1089.

Carattoli, A. 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*. **32**:243-259.

Carneiro, C., C. Araújo, A. Gonçalves, L. Vinué, S. Somalo, E. Ruiz, I. Uliyakina, J. Rodrigues, G. Igrejas, P. Poeta, and C. Torres. 2010. Detection of CTX-M-14 and TEM-52 Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Fecal *Escherichia coli* Isolates of Captive Ostrich in Portugal. *Foodborne Pathogens and Disease*. **7**:191-194.

Caroff, N., E. Espaze, L. Bérard, H. Richet, and A. Reynaud. 1999. Mutations in the *ampC* promoter of *Escherichia coli* isolates resistant to oxyiminocephalosporins without extended spectrum β -lactamase production. *FEMS. Microbiology Letters*. **173**:459-465.

Casewell, M., C. Friis, E. Marco, P. McMullin, and I. Phillips. 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **52**:159-161.

Chopra, I. and M. Roberts. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **65**:232-60.

Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**:4555-4558.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement (M100-S20). Clinical and Laboratory Standards Institute. Vol. 30. Wayne, PA

Cloekaer, A., K. Praud, B. Doublet, A. Bertini, A. Carattoli, P. Butaye, H. Imberechts, S. Bertrand, J. Collard, G. Arlet, and F. Weill. 2007. Dissemination of an Extended-Spectrum- β -Lactamase *bla*_{TEM-52} Gene-Carrying Inc11 Plasmid in Various *Salmonella enterica* Serovars Isolated from Poultry and Humans in Belgium and France between 2001 and 2005. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**:1872-1875.

Cohen, M. L. 1997. Epidemiological factors influencing the emergence of antimicrobial resistance. In: *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread* (Eds. John Wiley e Sons), pp.233-237.

Collins, C. M., and R. M. Hall. 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **39**:155-162.

Comissão Europeia. Jornal Oficial da União Europeia. 2003. Regulamento (CE) nº1831/2003.

Comissão Europeia. Jornal Oficial da União Europeia. 2007. Regulamento (CE) nº1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. **L-322:12-29.**

Cooksey, R., J. Swenson, N, Clark, E. Gay, and C. Thornsberry. 1990. Patterns and mechanisms of beta-lactam resistance among isolates of *Escherichia coli* from hospitals in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **34:739-745.**

Costa, D., P. Poeta, L. Briñas, Y. Sáenz, J. Rodrigues, and C. Torres. 2004. Detection of CTX-M-1 and TEM-52 β -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **53:960-961.**

Costa, D. 2006. Ecologia das antibiorresistências em *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli*. Dissertação de Doutoramento em Ciências Biomédicas. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar. Universidade do Porto.

Costa, D., P. Poeta, Y. Sáenz, A. C. Coelho, M. Matos, L. Vinué, J. Rodrigues, and C. Torres. 2008a. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Veterinary Microbiology.* **127:97-105.**

Costa, D., P. Poeta, Y. Sáenz, L. Vinué, A. C. Coelho, M. Matos, B. Rojo-Bezares, J. Rodrigues, and C. Torres. 2008b. Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolates Recovered from Wild Animals. *Microbial Drug Resistance.* **14:71-77.**

Costa, D., L. Vinué, P. Poeta, A. C. Coelho, M. Matos, Y. Sáenz, S. Somalo, M. Zarazaga, J. Rodrigues, and C. Torres. 2009. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Veterinary Microbiology.* **138:339-344.**

Decreto-Lei nº 243/2001, de 5 de Setembro. Diário da República - I Série – A. Nº **206:5754-5765.**

Degener, J. E. 1999. The consequences of bacterial resistance to antibiotics. *Geneesmiddelen Bulletin, No 6.*

Doi, Y., D. L. Paterson, P. Egea, A. Pascual, L. López-Cerero, M. D. Navarro, J. M. Adams-Haduch, Z. A. Qureshi, H. E. Sidjabat, and J. Rodríguez-Baño. 2010. Extended-spectrum and CMY-type β -lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburg, USA and Seville, Spain. *Clinical Microbiology and Infection.* **16:33-38.**

Drlica, K., and X. Zhao. 1997. DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **61:377-392.**

DWD (Drinking Water Directive). 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998. Official Journal of the European Communities. **L-330:32-54.**

Egea, P., L. López-Cerero, M. D. Navarro, J. Rodríguez-Baño, and A. Pascal. 2011. Assessment of the presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in eggshells and ready-to-eat products. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **30**:1045-1047.

Escudero, E., L. Vinué, T. Teshager, C. Torres, and M. A. Moreno. 2010. Resistance mechanisms and farm-level distribution of fecal *Escherichia coli* isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins in pigs in Spain. *Research in Veterinary Science*. **88**:83-87.

EU (European Union). 1999. A strategy against the microbial threat. A council resolution of 8 June 1999 on antibiotic resistance. *Official Journal of the European Communities*.**195**:1-3.

Ewers, C., E. Antão, I. Diehl, H. Philipp, and L. H. Wieler. 2009. Intestine and Environment of the Chicken as Reservoirs for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains with Zoonotic Potential. *Applied and Environmental Microbiology*. **75**:184-192.

Fuchs, L. Y., L. Chihu, C. Conde, V. M. González, A. H. Noguez, E. Calderón, N. Avonce, and C. Ovando. 1994. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. Instituto Nacional de Salud Pública Cuernavaca, México. *Salud Pública de México*. **36**:428-438.

Girlich, D., L. Poirel, A. Carattoli, I. Kempf, M. Lartigue, A. Bertini, and P. Nordmann. 2007. Extended-Spectrum β -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* Isolates from Healthy Poultry in France. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**:4681-4685.

Gonçalves, P. M. R. 2005. *Escherichia coli* com detecção do gene *iss* por PCR, micoplasmas e salmonelas na qualidade sanitária de frangos de corte ao abate. Tese de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Gonçalves, A., C. Torres, N. Silva, C. Carneiro, H. Radhouani, C. Coelho, C. Araújo, J. Rodrigues, L. Vinué, S. Somalo, P. Poeta, and G. Igrejas. 2010. Genetic Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* Isolates of Pigs from a Portuguese Intensive Swine Farm. *Foodborne Pathogens and Disease*. **12**:1569-1573.

Gordon, D. M., O. Clermont, H. Tolley, and E. Denamur. 2008. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*. **10**:2484-2496.

Griffiths, A. J. F., J. H. Miller, D. S. R. C. Lewontin, and W. M. Gelbart. 1998. Introdução à Genética. Sexta edição, Guanabara Koogan S. A.

Gross, W. B. 1991. Colibacillosis. In: Calnek B. W., H. J. Barnes, C. W. Beard, W. M. Reid, and H. W. Jr. Yoder, Editors: *Diseases of Poultry*. 9^ªed. Iowa State University Press, Ames, IA, USA.

- Guardabassi, L. C., L. Dijkshoorn, J. M. Collard, J. E. Olsen, and A. Dalsgaard.** 2000. Distribution and in-vitro transference of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *Journal of Medical Microbiology*. **49**:929-936.
- Guerra, B., E. Junker, A. Schroeter, B. Malorny, S. Lehmann, and R. Helmuth.** 2003. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **52**:489-492.
- Gupta, V.** 2007. An update on newer β -lactamases. *Indian Journal of Medical Research*. **126**: 417-427.
- Hancock, L. E.** 2005. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *The Lancet Infectious Diseases*. **5**:209-218.
- Hammerum, A. M., and O. E. Heuer.** 2009. Human health Hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clinical Infectious Diseases – Food Safety*. **48**:916-921.
- Heider, L. C., A. E. Hoet, T. E. Wittum, M. L. Khaita, B. C. Love, C. L. Huston, P. S. Morley, J. A. Funk, and W. A. Gebreyes.** 2009. Genetic characterization and Phenotypic Characterization of the *bla*_{CMY} Gene from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Isolated from Food-Producing Animals, Humans, the Environment, and Retail Meat. *Foodborne Pathogens and Disease*. **6**:1235-1240.
- Hermann, T.** 2007. Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **64**:1841-1852.
- Hiroi, M.m T. Harada, F. Kawamori, N. Takahashi, T. Kanda, K. Sugiyama, T. Masuda, Y. Yoshikawa, and N. Ohashi.** 2011. A survey of β -lactamase-producing *Escherichia coli* in farm animals and raw retail meat in Shizuoka Prefecture, Japan. **64**:153-155.
- Hooper, D. C.** 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infectious Diseases*. **27**:54-63.
- Hordijk, J., K. Veldman, C. Dierikx, A. Essen-Zandbergen, J. A. Wagenaar, and D. Mevius.** 2011. Prevalence and characteristics of quinolone resistance in *Escherichia coli* in veal calves. *Veterinary Microbiology*. **Doi**:10.1016/j.vetmic.2011.10.006.
- Houvinen, P.** 2001. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases*. **32**:1608-1614.
- Huycke, M. M., Sahm, D. F. and Gilmore, M. S.** 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases*. **4**:239-249.
- Ito, C. A., A. C. Gales, M. C. Tognim, P. Munerato, and L. M. D. Costa.** 2008. Quinolone-resistant *Escherichia coli*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. **12**:5-9.

Jacoby, G. A., N. Chow, and K. B. Waites. 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **47**:559-562.

Jakobsen, L., A. Kurbasic, L. Skjot-Rasmussen, K. Ejrnaes, L. J. Porsbo, K. Pedersen, L. B. Jensen, H. Emborg, Y. Agerso, K. E. P. Olsen, F. M. Aarestrup, N. Frimodt-Moller, and A. M. Hammerum. 2010. *Escherichia coli* isolates from broiler chicken meat, broiler chickens, pork, and pigs share phylogroups and antimicrobial resistance with community-dwelling Humans and patients with Urinary Tract Infection. *Foodborne Pathogens and Disease*. **Doi**: 10.1089/fdp.2009.0409.

Janda, J. M., and S. L. Abbott. 2006. *The Enterobacteria*. 2.ed. Washington: American Society for Microbiology. pp.23-59.

Jensen, L. B., H. Hasman, Y. Agerso, H. D. Emborg, and F. M. Aarestrup. 2006. First description of oxyimino-cephalosporin-resistant, ESBL-carrying *Escherichia coli* isolated from meat sold in Denmark. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **57**:793-794.

Johnson, J. R., I. P. Delavar, M. Kuskowski, and A. L. Stell. 2001a. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*. **183**:78-88.

Johnson, J. R., T. T. O'Brian, M. Kuskowski, and J. N. Maslow. 2001b. Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and *papA* alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia. *Infection and Immunity*. **69**:5363-5374.

Johnson, J. R., E. Oswald, T. T. O'Bryan, M. A. Kuskowski, and L. Spanjaard. 2002. Phylogenetic distribution of virulence-associated among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. *Journal of Infectious Diseases*. **185**:774-784.

Jordan, F., M. Pattison, M. Alexander, and T. Farager. 2001. *Poultry diseases*. USA, W. B. Saunders, 5th edition.

Jouini, A., L. Vinué, K. B. Slame, Y. Sáenz, N. Klibi, S. Hammami, A. Boudabous, and C. Torres. 2007. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum β -lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **60**:1137-1141.

Junior, M. A. S., E. S. Ferreira, e G. C. Conceição. 2004. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. *NewsLab*. **63**:152-174.

Kapil, A. 2005. The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate. *Indian Journal of Medical Research*. 121:83-91.

Kato, J., Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Higara, and H. Suzuki. 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Cell*. **63**:393-404.

Kern, W. V., M. Steib-Bauert, K. With, S. Reuter, H. Bertz, U. Frank, and H. Von-Baum. 2005. Fluoroquinolone consumption and resistance in hematology-oncology patients: ecological analysis in two university hospitals 1999-2002. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **55**:57-60.

Kozak, G. K., P. Boerlin, N. Janecko, R. J. Red-Smith, and C. Jardine. 2008. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Swine and Wild Small Mammals in the Proximity of Swine Farms and in Natural Environments in Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology.* **75**:559-566.

Kuhnert, P., P. Boerlin, and J. Frey. 2000. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *Fems Microbiology Reviews.* **24**:107-117.

Levesque, C., and P. H. Roy. 1993. PCR analysis of integrons. In: Persing, D. H., T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. Whith, (Eds.). *Diagnostic Molecular Microbiology.* American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp. 590-594.

Levy, S. B. 1998. The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American.* **278**:32-39.

Li, X. Z., M. Mehrotra, S. Chimire, and L. Adewoye. 2007. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary Microbiology.* **121**:197-214.

Linares-Rodriguez, J. F. and J. L. Martínez-Menéndez. 2005. Resistencia a los antimicrobianos y virulência bacteriana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* **23**:86-93.

Lindgren, P. K., A. Karlsson, and D. Hughs. 2003. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **47**:3222-3232.

Livermore, D. M. 1995. B-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* **8**:557-584.

Machado, E., T. M. Coque, R. Cantón, Â. Novais, J. C. Sousa, F. Baquero, and L. Peixe. 2007. High diversity of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **60**:1370-1374.

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

Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parcker. 2000. *Brock Biology of Microorganisms.* Tenth Edition. Prentice Hall INC.

Madsen, L., F. M. Aarestrup, and J. E. Olsen. 2000. *Brock Biology of Microorganisms.* Tenth Edition. Prentice Hall INC.

Martel, A., L. A. Devrise, A. Decostere, and F. Haesebrouck. 2003. Presence of macrolide resistance genes in streptococci isolated from pigs and carcasses. *International Journal of Food Microbiology*. **84**:27-32.

Master, P. A., T. A. O'Brian, J. Zurlo, D. Q. Miller, and N. Joshi. 2003. Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. *Archives of Internal Medicine*. **163**:402-410.

Maynard, C., J. M. fairbrother, S. Bekal, F. Sanschagrin, R. C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Larivière, and J. Harel. 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **47**:3214-3221.

Mazel, D., B. Dychinco, V. A. Webb, and J. Davies. 2000. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **44**:1568-1574.

Mendonça, N., J. Lsitão, V. Manageiro, E. Ferreira, the Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal, and M. Caniça. 2007. Spread of Extended-Spectrum β -Lactamase CTX-M-Producing *Escherichia coli* Clinical Isolates in Community and Nosocomial Environments in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**:1946-1955.

Mesa, R. J., V. Blanc, A. R. Blanch, P. Cortés, J. J. González, S. Lavilla, E. Miró, M, Muniesa, M. Saco, M. T. Tórtola, B. Mirelis, P. Coll, M. Llagostera, G. Prats, and F. Navarro. 2006. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **58**:211-215.

Moon, D. C., S. Y. Seol, M. Gurung, J. S. Jin, C. H. Choi, J. Kim, Y. C. Lee, D. T. Cho, and J. C. Lee. 2010. Emergence of a new mutation and its accumulation in the topoisomerase IV gene confers high levels of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **35**:76-79.

Moreillon, P. 2000. Moyens de defense des bactéries. *Revue Médicale de la Suisse Romande* **120**:641-650.

Nelson, E. C., and B. G. Elisha. 1999. Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **43**:957-959.

Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham, and M. Schaechter. 1990. Physiology of the bacterial cell-a molecular approach. Sinauer Associates, Sunderland, USA.

Nikaido, H. 2003. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **67**:593-656.

Obeng, A. S., H. Rickard, O. Ndi, M. sexton, and M. Barton. 2011. Antibiotic resistance, Phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. *Veterinary Microbiology*. **Doi:10.1016/j.vetmic.2011.07.010**.

Oguttu, J. W., C. M. Veary, and J. A. Picard. 2008. Antimicrobial drug resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry abattoir workers at risk and broilers on antimicrobials. *Journal of the South African Veterinary Association.* **79**:161-166.

Oram, M., and L. M. Fisher. 1991. 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the Polymerase Chain Reaction. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* **35**:387-389.

Oteo, J., J. Campos, F. Baquero, and Spanish members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). 2002. Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2001). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **50**:945-952.

Overdeest, I., I. Willemsen, M. Rijnsburger, A. Eustace, L. Xu, P. Hawkey, M. Heck, P. Savelkoul, C. Vandenbroucke-Grauls, K. Zwaluw, X. Huijsdens, and J. Kluytmans. 2011. Extended-Spectrum β -Lactamase Genes of *Escherichia coli* in Chicken Meat and Humans, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases.* **17**:1216-1222.

Páez, G. A. C., M. A. Sánchez, and M. Z. Morales. 2005. Resistencia de *Escherichia coli* a las Fluoroquinolonas. *Revista de la Facultad de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad El Bosque.* **10**:7-16.

Pagani, L., E. Dell'Amico, R. Migliavacca, M. M. D'Andrea, E. Giacobone, G. Amicosante, E. Romero, and G. M. Rossolini. 2003. Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -lactamases in Nosocomial Isolates of Enterobacteriaceae from a Hospital in North Italy. *Journal of Clinical Microbiology.* **41**:4264-4269.

Paterson, D. L., and R. A. Bonomo. 2005. Expanded-spectrum β -Lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews.* **18**:657-686.

Paton, C. J., and A. W. Paton. 1998. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews.* **11**:450-479.

Pereira, J. M. 2010. Elementos Genéticos Móveis. In: Ferreira, W. F. C., J. C. F. Sousa, e N. Lima. 2010. *Microbiologia. LIDEL – Edições Técnicas, Lda.* pp. 261-282.

Pérez, D. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud.* **22**:57-67.

Perrenten, V. and P. Boerlin. 2003. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* **47**:1169-1172.

Piddock, L. J. V. 2006. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews.* **19**:382-402.

Pitou, J. D. D., K. S. Thomson, N. D. Hanson, A. F. Ehrhardt, E. S. Moland, and C. C. Sanders. 1998. β -lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins

in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **42**:1350-1354.

Poeta, P. 2006. Resistência a Antibióticos, Factores de Virulência e Bacteriocinas em Estirpes Comensais de *Enterococcus* spp. de Animais e Humanos. Dissertação de Doutoramento. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Poeta, P., H. Radhouani, G. Igrejas, A. Gonçalves, C. Carvalho, J. Rodrigues, L. Vinué, S. Somalo, and C. Torres. 2008. Seagulls of the Berlengas Natural Reserve of Portugal as Carriers of Fecal *Escherichia coli* Harboring CTX-M and TEM Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**:7439-7441.

Poeta, P. e J. Rodrigues. 2008. Identificação de bactérias com interesse em microbiologia médica. Parte 1 *Escherichia coli*. Série Didáctica – Ciências Aplicadas 355.

Poeta, P., H. Radhouani, L. Pinto, A. Martinho, V. Rego, R. Rodrigues, A. Gonçalves, J. Rodrigues, V. Estepa, C. Torres, and G. Igrejas. 2009. Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *Journal of Basic Microbiology*. **49**:584-588.

Poole, K. 2004. Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **61**:2200-2223.

Poole, K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **56**:20-51.

Radhouani, H., L. Pinto, C. Coelho, A. Gonçalves, R. Sargo, C. Torres, G. Igrejas, and P. Poeta. 2010. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M classes in faecal samples of common buzzards (*Buteo buteo*). *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. **65**:171-173.

Ramos, C. G. S. 2002. Estudo dos padrões de Resistência aos β -lactâmicos e Inibidores de β -lactamases em Estirpes de *Escherichia coli* Uropatogénicas Isoladas em Animais. Relatório de Estágio. Centro de Bacteriologia. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

Roberts, M. C. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letter*. **245**:195-203.

Rodríguez, M. A. R., J. G. González-Piñera, J. B. Penié, N. L. Alonso, A. Areu, e A. P. Núñez. 1998. Tetraciclina. *Acta Medica*. **8**:75-79.

Ruiz, J., K. Simon, J. P. Horcajada, M. Velasco, M. Barranco, G. Roig, A. Moreno-Martínez, J. A. Martínez, T. J. Anta, J. Mensa, and J. Vila. 2002. Differences in Virulence Factors among Clinical Isolates of *Escherichia coli* Causing Cystitis and Pyelonephritis in Women and Prostatitis in Men. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**:4445-4449.

- Sabaté, M., E. Moreno, T. Pérez, A. Andreu, and G. Prats.** 2006. Pathogenicity island markers incommensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clinical Microbiology Infectious Diseases*. **12**:880–886.
- Sáenz, Y., M. Zarazaga, L. Briñas, M. Lantero, F. Ruiz-Larrea, and C. Torres.** 2001. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. **18**:353-358.
- Sáenz, Y.** 2004. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistència a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* no patógenas de alimentoss y de la microflora intestinal de humanos y animales. Dissertação de Doutoramento na área de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade de La Rioja.
- Sáenz, Y., L. Briñas, E. Domínguez, J. Ruiz, M. Zarazaga, J. Vila, and C. Torres.** 2004. Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-resistant *Escherichia coli* Strains of Human, Animal, and Food Origins. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. **48**:3996-4001.
- Samaha-Kfoury, J. N, G. F. Araj.** 2003. Recent developments in β -lactamases and extended Spectrum β -lactamases. *British Medical Journal*. **327**:1209-1213.
- Schroeder, C. M., D. G. White, B. Ge, Y. Zhang, P. F. McDermontt, S. Ayers, S. Zhao, and J. Meng.** 2003. Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Great Washington, DC, USA. *International Journal of Food Microbiology*. **85**:197-202.
- Schroeder, C. M., D. G. White, and J. Meng.** 2004. Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Food Microbiology*. **21**:249-255.
- Seffton, A. M.** 2002. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. *Drugs*. **62**:557-566.
- Simarro, E., F. Navarro, J. Ruiz, E. Miró, J. Gómez, and B. Mirelis.** 2000. *Salmonella enterica* serovar Virchow with CTX-M-like β -lactamase in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**: 4676-4678.
- Skurnik, D., R. Ruimy, A. Andremont, C. Amorin, P. Rouquet, B. Picard, and E. Denamur.** 2006. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **57**:1215-1219.
- Smet, A., A. Martel, D. Persoons, J. Dewulf, M. Heyndrickx, B. Catry, L. Herman, F. Haesebrouck, and P. Butaye.** 2008. Diversity of Extended-Spectrum β -Lactamases and Class C β -Lactamases among Cloacal *Escherichia coli* Isolates in Belgian Broiler Farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **52**:1238-1243.
- Soufi, L., M. S. Abbassi, Y. Sáenz, L. Vinué, S. Somalo, M. Zarazaga, A. Abbas, R. Dbaya, L. Khanfir, A. B. Hassen, S. Hammami, and C. Torres.** 2009. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. *Foodborne Pathogens and Disease*. **6**:1067-1073.

- Soufi, L., Y. Sáenz, L. Vinué, M. S. Abbassi, E. Ruiz, M. Zarazaga, A. B. Hassen, S. Hammami, and C. Torres.** 2011. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *International Journal of Food Microbiology*. **144**:497-502.
- Sousa, J. C.** 2000. Enterobacteriaceae. In: Ferreira, W. F. C. e J. C. F. Sousa. *Microbiologia*, Vol.2. LIDEL – Edições Técnicas, Lda; pp. 99-109.
- Sousa, J. C.** 2006. *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. 2ª Edição. Edições Universidade Fernando Pessoa.
- Sousa, J. C. F., L. V. Peixe, H. Ferreira, M. E. Pinto, M. S. J. Nascimento M. I. Sousa, e M. Cabral.** 1998. Antimicrobianos. In: Ferreira, W. F. C e J. C. F. Sousa. 1998. *Microbiologia*, Vol. 1. LIDEL – Edições Técnicas, Lda. pp. 239-269.
- Sousa, J. C. F. e L. V. Peixe.** 2010. Antibióticos Antibacterianos. In: Ferreira, W. F. C., J. C. F. Sousa, e N. Lima. 2010. *Microbiologia*. LIDEL – Edições Técnicas, Lda. pp. 453-469.
- Sousa, M., C. Torres, J. Barros, S. Somalo, G. Igrejas, and P. Poeta.** 2011. Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) as Carriers of SHV-12 and TEM-52 Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Containing *Escherichia coli* Isolates. *Foodborne Pathogens and Disease*. **8**:1139-1141.
- Speer, B. S., N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers.** 1992. Bacterial resistance to tetracycline: Mechanisms, Transfer, and Clinical Significance. *Clinical Microbiology Reviews*. **5**:387-399.
- Stapleton, P. D., K. P. Shannon, and G. L. French.** 1999. Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 beta-lactamase production and loss of an outer membrane protein. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **43**:1206-1210.
- Steward, C. D., J. K. Rasheed, S. K. Hubert, J. W. Biddle, P. M. Raney, G. J. Anderson, P. P. Williams, K. L. Brittain, A. Oliver, J. E. Jr. McGowan, and F. C. Tenovar.** 2001. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum β -lactamase detection methods. *Journal of Clinical Microbiology*. **39**:2864-2872.
- Sunde, N.** 2005. Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **56**:1019-1024.
- Sussman, M.** 1997. *Escherichia coli*: mechanisms of virulence. United Kingdom. Cambridge University.
- Swanberg, S. L., and J. C. Wang.** 1987. Cloning and DNA sequencing of the *Escherichia coli gyrA* coding for the A subunit of DNA gyrase. *Journal of Molecular Biology*. **197**:729-736.

Tenover, F. C. 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American Journal of Medicine. **119**:S3-S10.

Thaker, M., P. Spanogiannopoulos, and G. D. Wright. 2010. The tetracycline resistome. Cellular and molecular Life Sciences. **67**:419-431.

Thielman, N. M. and R. L. Guerrant. 1999. *Escherichia coli*. In: Yu, V. L., T. C. Jr. Merigan, S. L. Barriere, Editors: Antimicrobial Therapy and Vaccines, Williams & Wilkins Press. Baltimore, USA.

Tiba, M. R., T. Yano, and D. S. Leite. 2008. Genotypic Characterization of Virulence Factors in *Escherichia coli* Strains from Patients with Cystitis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. **50**:255-260.

Todar, K. 2002. Pathogenic *E. coli*. Bacterial Diseases of Humans. Todar's Online Textbook of bacteriology. (<http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html>).

Torres, A., and S. Payne. 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Molecular Microbiology. **23**:825-833.

Trees, D. L., A. L. Sandul, W. L. Whittington, and J. S. Knapp. 1998. Identification of Novel Mutation Patterns in the *parC* Gene of Ciprofloxacin-Resistant Isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **42**:2103-2105.

Tutenel, A. V., D. Pierard, J. Van Hoof, and L. De Zutter. 2003. Molecular Characterization of *Escherichia coli* O157 – Contamination Routes in cattle Slaughterhouse. Journal of Food Protection, **66**: 1564-1569.

Van Bambeke, F., Y. Glupczynski, P. Plésiat, J. C. Pechère, and P. M. Tulkens. 2003. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **51**:1055-1065.

Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. 1993. The Threat of Multiresistant Microorganisms. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. **12**:27-30.

Van, T. T. H., J. Chin, T. Chaoman, L. T. Tran, and P. Coloe. 2008. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. **124**:217-223

Veloso, A. C. A. 2006. Optimização de estratégias de Alimentação para Identificação de Parâmetros de um Modelo de *E. coli*. Utilização do Modelo em Monitorização e Controlo. Tese de Doutoramento. Universidade do Minho.

Vila, J., J. Ruiz, P. Goñi, and M. T. Jiménez de Anta. 1996. Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. Antimicrobial Agents Chemotherapy. **40**:491-493.

Vinué, L., Y. Sáenz, S. Somalo, E. Escudero, M. A. Moreno, F. Ruiz-Larrea, and C. Torres. 2008. Prevalence and diversity of integrons and associated resistances genes in faecal

Escherichia coli of healthy humans in Spain. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **62**:934-937.

Wegener, H. C. 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. Current Opinion in Microbiology. **6**:439-445.

Weldhagen, G. 2004. Integrons and β -lactamases – a novel perspective on resistance. International Journal of Agents. **23**:556-562.

White, P. A., and W. D. Rawlinson. 2001. Current status of the *aadA* and *dfx* gene cassette families. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **47**:495-496.

White, P. A., C. J. McIver, and W. D. Rawlinson. 2001. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. Antimicrobial Agents Chemotherapy. **45**:2658-2661.

WHO (World Health Organization). 2000. Report on infectious diseases 2000: Overcoming Antimicrobial Resistance. (<http://www.who.int/infectious-disease-report/index.html>).

Wilke, M. S., A. L. Lovering, and N. C. J. Strynadka. 2005. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. Current Opinion in Microbiology. **8**:525-533.

Wirth, T., D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L. H. Wieler, H. Karch, P. R. Reeves, M. C. J. Maiden, H. Ochman, and M. Achtman. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Molecular Microbiology. **60**:1136-1151.

Witte, W. 1997. Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance bacterial pathogens. In: Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread. John Wiley e Sons, England.

Woo, P. C. Y., A. P. C. To, S. K. P. Lau, and K. Y. Yuen. 2003. Facilitation of horizontal transfer of antimicrobial resistance by transformation of antibiotic-induced cell-wall-deficient bacteria. Medical Hypotheses. **61**:503-508.

Wright, G. D. 2003. Mechanisms of resistance to antibiotics. Current Opinion in Chemical Biology. **7**:563-569.

Wu, S., A. Dalsgaard, A. R. Vieira, H. Emborg, and L. B. Jensen. 2009. Prevalence of tetracycline resistance and genotypic analysis of populations of *Escherichia coli* from animals, carcasses and cuts processed at a pig slaughterhouse. International Journal of Food Microbiology. **135**:254-259.

Yamamoto, S., A. Terai, K. Yuri, H. Kurazono, Y. Takeda, and O. Yoshida. 1995. Detection of virulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Immunology and Medical Microbiology. **12**:85-90.

Yang, H., S. Chen, D. G. White, S. Zhao, P. McDermott, R. Walker, and J. Meng. 2004. Characterization of multipleantimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. Journal of Clinical Microbiology. **42**:3483-3489.

Yuan, Li., J. Liu, G. Hu, Y. Pan, Z. Liu, J. Mo, and Y. Wei. 2009. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from chickens in Henan Province, China. *Journal of Medical Microbiology*. **58**:1449-1453.

CAPÍTULO 8 - ANEXOS

Anexo 1 – Meios de cultura utilizados

- i) **Eosin Methylene Blue Agar (Levine)** – Meio selectivo e diferencial para o isolamento de bactérias entéricas Gram-Negativas.

Composição:

- Peptona – 10 g/l
- Lactose – 10 g/l
- Fosfato dipotássico hidrogenado – 2 g/l
- Iosina Y – 0,4 g/l
- Azul-de-metileno – 0,065 g/l
- Agar – 15 g/l
- pH – $6,6 \pm 2$

Método:

Suspender 37,5 gramas em 1 litro de água destilada. Deixar em ebulição para dissolver completamente. Esterilizar em autoclave 15 minutos a 121°C.

- ii) **Brain-Heart-Infusion (BHI)** – Meio não selectivo, muito nutritivo, utilizado para o crescimento de bactérias.

Composição:

- Cérebro de vitelo e coração de vaca sólidos – 17,5 g/l
- Protease peptona – 10g/l
- Glucose – 2g/l
- Cloreto de sódio – 5 g/l
- Fosfato dissódico – 2,5 g/l
- Agar – 15 g/l (adicionar caso se pretenda o meio sólido)
- pH – $7,4 \pm 0,2$, a 25 °C

Método:

Dissolver 37 gramas em 1 litro de água destilada. Esterilizar em autoclave 15 minutos a 121°C.

iii) Mueller-Hinton Agar (MH) – Meio utilizado para a determinação da sensibilidade aos antibióticos.

Composição:

- Infusão desidratada de carne de vitelo – 300 g/l
- Hidrolisado de caseína 17,5 g/l
- Amido – 1,5 g/l
- Agar – 17 g/l
- pH – $7,3 \pm 0,1$, a 25 °C

Método:

Dissolver 38 gramas em 1 litro de água destilada. Esterilizar em autoclave 15 minutos a 121°C.

iv) Skim milk – Meio utilizado para conservar os isolados a temperaturas de congelamento.

Composição:

- Leite em pó a 10%, dissoluto em água esterilizada e desionizada, com teor em gordura $\leq 1,5$ g/l e teor em proteínas ≥ 34 g/l.
- Agar – 17 g/l

Método:

Dissolver 100 gramas em 1 litro de água destilada. Esterilizar em autoclave 5 minutos a 121°C.