Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Sequenciação aplicada à microbiologia clínica moderna: pesquisa e identificação de espécies bacterianas multirresistentes de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.

Dissertação de Mestrado em Genética Molecular Comparativa e Tecnológica

Ana Carolina Felisberto Sabença

Orientador: Professor Doutor Gilberto Paulo Peixoto Igrejas

Coorientador: Professor Doutor Richard Bonnet

Vila Real, 2019

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Sequenciação aplicada à microbiologia clínica moderna: pesquisa e identificação de espécies bacterianas multirresistentes de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.

Dissertação de Mestrado em Genética Molecular Comparativa e Tecnológica

Ana Carolina Felisberto Sabença

Orientador: Professor Doutor Gilberto Paulo Peixoto Igrejas

Coorientador: Professor Doutor Richard Bonnet

Composição do Júri:

_____

_____

_____

_____

Vila Real, 2019

Este trabalho foi expressamente elaborado como Dissertação original para obtenção do grau de Mestre em Genética Molecular Comparativa e Tecnológica, sendo apresentada na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

"Our great weakness lies in giving up. The most certain way to succeed is always to try just one more time"

-Thomas Edison

Orientador Científico:

Professor Doutor Gilberto Paulo Peixoto Igrejas

Departamento de Genética e Biotecnologia

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

Coorientador Científico:

Professor Doutor Richard Bonnet

Service de Bactériologie-Parasitologie-Mycologie

Centre National de Référence de la résistance aux antibiotiques

CHU de Clermont-Ferrand

Agradecimentos

Ao terminar esta etapa, não poderia deixar de manifestar o meu verdadeiro agradecimento a todas as pessoas que me auxiliaram, direta ou indiretamente, no decorrer deste projeto científico e pessoal.

Ao Magnífico Reitor da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), na pessoa do Professor Doutor António Augusto Fontainhas Fernandes, pela disponibilidade e facilidades concedidas durante a realização deste trabalho.

À Diretora do Mestrado em Genética Molecular Comparativa e Tecnológica, Professora Doutora Raquel Chaves e à Vice-Diretora, Professora Doutora Paula Lopes. A todos os Professores que lecionaram no Mestrado em Genética Molecular Comparativa e Tecnológica.

Ao meu orientador, o Professor Doutor Gilberto Igrejas, pelo apoio, pelo rigor científico e sentido crítico que me incutiu. Pela oportunidade de realizar esta dissertação fora do país, em Clermont-Ferrand, e pela preocupação demonstrada ao longo desta etapa.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Richard Bonnet, por me ter recebido no seu laboratório, em Clermont-Ferrand, pela ajuda prestada e por estar sempre disponível para responder às minhas dúvidas.

A todo o pessoal técnico de Clermont-Ferrand, principalmente à Racha, ao Aurélien, à Emilie, ao Alexis, ao Laurent e à Pascaline, pois sem eles este trabalho não teria sido possível.

Ao laboratório de Microbiologia da UTAD, representado pela Professora Doutora Patrícia Poeta, pela disponibilidade e auxílio prestado e à Mestre Vanessa Silva pela ajuda concedida sempre que lhe era possível.

Aos meus amigos, Telma, Mariana, Filipe, Verónica, que este ano estiveram mais perto, mas também à Sara e ao Dias que mesmo longe tiveram sempre uma palavra amiga. A vocês agradeço pela vossa amizade e apoio dado, por me fazerem rir o tempo todo e por estarem sempre presentes.

A toda a minha família, principalmente, aos meus Pais e irmão pelo amor e apoio constantes. Obrigada por tornarem esta etapa possível e por todos os valores que me transmitiram.

A todos muito OBRIGADA.

“Sequenciação aplicada à microbiologia clínica moderna: pesquisa e identificação de espécies bacterianas multirresistentes de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.”

Resumo

O intenso uso de antibióticos tanto na medicina humana como na medicina veterinária, contribui para o desenvolvimento e para a disseminação da resistência em distintos grupos de bactérias. Este é um problema de saúde pública global que requer uma abordagem multidisciplinar e holística, pois a resistência bacteriana aos antibióticos está a disseminar-se e a evoluir de forma semelhante em humanos, animais e no meio ambiente.

A Organização Mundial de Saúde considera os *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* essenciais para monitorizar o nível de resistência aos antibióticos. Estas bactérias podem atuar como reservatório de genes de resistência a antibióticos que podem ser transferidos para outras bactérias patogénicas representando um problema mundial.

Alguns genes de resistência estão localizados em plasmídeos sendo rapidamente disseminados para outras espécies bacterianas, incluindo isolados de populações de animais selvagens. Assim, embora os animais selvagens não estejam em contacto direto com antibióticos, são indiretamente afetados pelo uso geral excessivo de antibióticos noutros contextos.

Um total de 21 estirpes de *Enterococcus* spp., isoladas em carne picada, almôndegas e hambúrgueres, assim como um total de 45 estirpes de Enterobacteriaceae, isoladas em animais selvagens, em animais para consumo e em carne, foram selecionadas da nossa coleção de estirpes bacterianas. Estas foram identificadas usando espetrometria de massa tendo sido identificadas 3 espécies diferentes de *Enterococcus* spp. [*E. faecium* (n=16), *E. gallinarum* (n=3) e *E. durans* (n=2)] e 45 *E. coli*. Através do método da difusão em agar pela técnica de Kirby-Bauer, interpretado segundo as normas do EUCAST encontraram-se 19 enterococos resistentes à vancomicina (VREs) e estes isolados apresentaram resistência à teicoplanina (84,2%), eritromicina (84,2%) e ampicilina (68,4%). Através da sequenciação do genoma, usando a tecnologia Illumina, foram detetados, mais frequentemente, os genes *vanA*, *erm*(B) e *aac*(6')-*Ii*.

Por outro lado, em *E. coli* foram detetados 28 isolados produtores de ESBLs que eram resistentes à ampicilina (100%), ticarcilina (100%), piperacilina (100%), cefuroxima (96,4%) e

cefotaxima (96,4%). Relativamente aos genes que codificam para ESBLs o mais frequente foi o *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ que estava, maioritariamente associado ao plasmídeo IncI1. Outros genes foram detetados, contudo aqueles com maior frequência foram os genes *tet*(A) (64,3%), *tetR* (64,3%) e *sul2* (53,6%). No que respeita o estudo do *background* genético, foram detetados 17 tipos de MLST diferentes e um total de 41761 SNP.

A informação obtida com a sequenciação do genoma completo das bactérias no decorrer deste trabalho foi essencial para melhorar o conhecimento sobre a disseminação de estirpes resistentes nos animais selvagens, nos animais para consumo, assim como, na carne que deles deriva e as possíveis implicações envolvidas na transferência para outros animais ou humanos. Futuramente, e tendo em conta o conceito *One Health*, podem ser realizados estudos no sentido de investigar a prevalência de bactérias resistentes a antibióticos tanto em seres humanos como em amostras do meio ambiente, possibilitando a identificação das vias de transmissão de bactérias resistentes a antibióticos e dos seus genes de resistência.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., resistência, antibióticos, animais, carne processada.

“Sequencing applied to modern clinical microbiology: research and identification of multiresistant bacterial species of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp.”

Abstract

The intense use of antibiotics in both human and veterinary medicine contributes to the development and spread of resistance in different groups of bacteria. This is a global public health problem which requires a multidisciplinary and holistic approach because bacterial resistance to antibiotics is spreading and evolving in similar ways in humans, in animals and in the environment.

Escherichia coli and *Enterococcus* spp. are considered by the World Health Organization as essential microorganisms for monitoring the level of antibiotic resistance. These bacteria may act as reservoir of antibiotic resistance genes that can be transferred to other pathogenic bacteria and represent a worldwide problem.

Some resistance genes are located on plasmids that are rapidly disseminated to other bacterial species, including isolates from wild animal populations. Thus, even though wild animals are not in direct contact with antibiotics, they are indirectly affected by the excessive general use of antibiotics in other settings.

A total of 21 *Enterococcus* spp. strains isolated from minced meat, meatballs and hamburgers, as well as a total of 45 Enterobacteriaceae strains isolated from wildlife, animals for consumption and meat were selected from our previously studied collection of bacterial strains. These strains were identified using mass spectrometry and 3 different species of Enterococcus spp. [*E. faecium* (n = 16), *E. gallinarum* (n = 3) and *E. durans* (n = 2)] and 45 *E. coli* were identified. Using the Kirby-Bauer agar diffusion method, interpreted according to EUCAST standards, 19 vancomycin resistant enterococci (VREs) were found and these isolates showed resistance to teicoplanin (84.2%), erythromycin (84.2%) and ampicillin. (68.4%). Whole-genome sequencing of bacteria using Illumina technology detected most frequently the *vanA*, *erm*(B) and *aac*(6 ')-*Ii* genes.

On the other hand, in *E. coli*, were detected 28 ESBL-producing isolates that were resistant to ampicillin (100%), ticarcillin (100%), piperacillin (100%), cefuroxime (96.4%) and cefotaxime (96.4%). Regarding ESBL-coding genes, the most frequent was $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, which was mostly associated with IncI1 plasmid. Other genes were detected but the most frequent were *tet*(A)

(64.3%), *tetR* (64.3%) and *sul2* (53.6%) genes. Regarding the genetic background study, were detected 17 different MLST types and a total of 41761 SNP.

The data obtained from whole-genome sequencing of bacteria is essential to improve the knowledge about the spread of resistant strains in wild animals, animals for consumption, as well as in meat derived from them and the possible implications involved in transfer to other animals or humans. In the future, and considering the One Health concept, studies may be conducted to investigate the prevalence of antibiotic resistant bacteria both in humans and in environmental samples enabling the identification of antibiotic resistant bacteria as well antibiotic resistant genes and their transmission pathways.

Keywords: *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., resistance, antibiotics, animals, processed meat.

Trabalhos Apresentados

- Comunicações em formato poster em conferências Nacionais

Sabença C, Beyrouthy R, Bonnet R, Poeta P, Igrejas G (2019). *Sequencing Applied to Modern Clinical Microbiology*. Livro de Resumos da *3rd International Caparica Conference in Antibiotic Resistance* (pág. 175). Caparica, Portugal.

- Comunicações orais em Conferências Nacionais

Sabença C, Beyrouthy R, Bonnet R, Poeta P, Igrejas G (2019). *DNA Sequencing as a Solution to Antibiotic Resistant Bacteria?*. Livro de Resumos do *Congresso da Ciência – Conhecimentos D'Ouro* (pág. 17). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

Índice Geral

Agradecimentos XI
Resumo XIII
Abstract XV
Trabalhos Apresentados XVII
Índice Geral XIX
Índice de Tabelas XXIII
Índice de Figuras XXV
Lista de abreviaturas XXIX
Capítulo 1 – Introdução 1
1. Problemática da disseminação da resistência aos antibióticos 1
2. Bactérias indicadoras da resistência a antibióticos 2
2.1. *Escherichia coli* 2
2.1.1. Características gerais e fisiológicas da espécie 2
2.1.2. Resistência aos antibióticos em *Escherichia coli* 3
2.2. *Enterococcus* spp. 4
2.2.1. Classificação e características gerais 4
2.2.2. Resistência aos antibióticos em *Enterococcus* spp. 5
3. Antibióticos 6
3.1. Mecanismos de ação dos antibióticos 7
3.1.1. Inibição da síntese da parede celular 8
3.1.2. Inibição da síntese da membrana celular 10
3.1.3. Interferência na síntese de ácidos nucleicos 10
3.1.4. Inibição da síntese de proteínas 11
3.1.5. Inibição dos metabolismos celulares 13
3.2. Mecanismos de resistência aos antibióticos 15
3.2.1. Destruição enzimática ou modificação do antibiótico 16
3.2.1.1. Diversidade de ESBLs 17
3.2.2. Alteração do alvo molecular do antibiótico 19
3.2.3. Permeabilização seletiva 20

3.2.4. Bombas de Efluxo ... 20
3.3. Genética aplicada à resistência aos antibióticos ... 21
3.3.1. Plasmídeos ... 22
3.3.2. Sequências de Inserção e Transposões ... 23
3.3.3. Integrões ... 25
4. Metagenómica ... 26
5. Tecnologias de Sequenciação ... 27
5.1. Sequenciação de Sanger ... 27
5.2. Plataforma *454 Roche* ... 30
5.3. Plataforma *Ion Torrent* ... 31
5.4. Plataforma *AB SOLiD* ... 32
5.5. Plataforma *Illumina* ... 35
5.6. Plataforma *Pacific Bioscience* ... 38
5.7. Plataforma *Oxford Nanopore* ... 40
6. Objetivos ... 41
Capítulo 2 – Materiais e métodos ... 43
1. Sub-cultura das estirpes bacterianas ... 43
1.1. *Enterococcus* spp. ... 43
1.2. *Escherichia coli* ... 43
2. Identificação dos isolados por espetrometria de massa ... 43
3. Identificação fenotípica da resistência aos antibióticos pelo método de Kirby e Bauer ... 44
4. Extração de DNA ... 47
5. Sequenciação do DNA por *Illumina* ... 47
5.1. Diluição e quantificação do DNA ... 47
5.2. Preparação das bibliotecas de DNA ... 48
5.3. Purificação das bibliotecas de DNA ... 48
5.4. Validação e quantificação das bibliotecas de DNA ... 49
5.5. *Pooling* e desnaturação das bibliotecas de DNA ... 49
5.6. Lançamento da sequenciação ... 49
6. Deteção de genes a partir dos dados de *Illumina* ... 50
7. Extração de DNA plasmídico pelo método de Kado e Liu ... 51

8. Sequenciação de plasmídeos por Nanoporo 52
8.1. Preparação do DNA 52
8.2. Reparação do DNA e *end-prep* 52
8.3. Ligação dos *Native barcode* 52
8.4. Ligação dos adaptadores e lavagem 53
8.5. *Priming* e *loading* das amostras na *flow cell* 54
Capítulo 3 – Resultados 57
1. *Enterococcus* spp. 57
1.1. Identificação dos isolados por espetrometria de massa 57
1.2. Estudo da sensibilidade aos antibióticos nos isolados de *Enterococcus* spp. 57
1.3. Sequenciação e deteção de genes 60
2. *Escherichia coli* 63
2.1. Identificação dos isolados por espetrometria de massa 63
2.2. Estudo da sensibilidade aos antibióticos nos isolados de *Escherichia coli* 63
2.3. Sequenciação e deteção de genes 65
2.4. Extração de DNA plasmídico 68
2.5. Sequenciação por Nanoporo 70
2.6. Análise de *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) 71
Capítulo 4 – Discussão 73
Capítulo 5 – Conclusões 83
Capítulo 6 – Referências 85

Índice de Tabelas

Tabela 1: Plataformas de sequenciação massiva disponíveis hoje em dia.....29
Tabela 2: Diâmetros dos halos de inibição dos antibióticos usados em *E. coli* e *Enterococcus* spp. Adaptado de CA-SFM/EUCAST, 2016.....46
Tabela 3: Soluções a preparar previamente ao protocolo.....51
Tabela 4: Resistências antimicrobianas detetadas nos isolados de Enterococci Resistentes à Vancomicina (VREs).....58
Tabela 5: Fenótipos de resistência nos diferentes isolados de VREs.....60
Tabela 6: Genes de resistência detetados nos diversos isolados de VREs.....62
Tabela 7: Fenótipos de resistência em *Escherichia coli* produtoras de ESBLs.....64
Tabela 8: Genes de resistência detetados em isolados de *Escherichia coli* produtoras de ESBLs.....67
Tabela 9: Tamanho das bandas presentes na Figura 23.....68
Tabela 10: Plasmídeos detetados pelo *plasmidfinder* das amostras de *E. coli* de origem selvagem que expressam $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$.....69

Índice de Figuras

Figura 1: Alvos da ação e respetivos antibióticos. 8
Figura 2: Diferenças das estruturas membranares das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Adaptado de: https://cen.acs.org/articles/93/web/2015/04/New-Spin-Old-Gram-Stain.html 9
Figura 3: Representação esquemática da biossíntese de peptidoglicano e mecanismo de ação da vancomicina. A ligação do antibiótico ao terminal D-Ala-D-Ala dos precursores do peptidoglicano previne a transpeptidação e a transglicosilação, interrompendo a síntese da parede celular resultando na morte da bactéria. Adaptado de Munita and Arias, 2016. 10
Figura 4: Locais de ação de grupos de antibióticos inibitórios da síntese dos ácidos nucleicos. Na replicação do DNA e na transcrição do RNA: a rifampicina liga-se à RNA polimerase e evita a ligação da DNA polimerase, inibindo, assim, a transcrição; a ciprofloxacina e as novobiocinas ligam-se à DNA girase, impedindo o enrolamento do DNA. Adaptado de Walsh, 2003b. 11
Figura 5: Inibição proteica provocada por antibióticos e respetivos locais de atuação no ribossoma procariota. Adaptado de Tortora, Funke and Case, 2019. 13
Figura 6: Molécula de ácido fólico. I- Anel de pteridina; II- p-aminobenzóico (PABA); III- Ácido glutâmico. 13
Figura 7: Metabolismo do ácido fólico e local de inibição dos antibióticos trimetoprim e sulfametoxazol. O folato, ou ácido fólico, é necessário para a síntese quer de purinas quer de pirimidinas, componentes essenciais do DNA. Os antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim bloqueiam etapas do metabolismo do folato e, portanto, bloqueiam a síntese de purinas e pirimidinas. Adaptado de Walsh, 2003b. 14
Figura 8: Representação dos diversos tipos de mecanismos de resistência bacteriana. Adaptado de Tortora, Funke and Case, 2019. 16
Figura 9: Composição do plasmídeo R. O plasmídeo R transporta genes para resistência a canamicina (Km) e cloranfenicol (Cm). A região RTF no plasmídeo R contém genes que codificam as proteínas necessárias para a replicação e transferência do plasmídeo. O Tn4 está inserido no plasmídeo R e transporta genes que conferem resistência à estreptomicina (Sm) e à sulfonamida (Su). As setas nos genes indicam o sentido da transcrição. Adaptado de Willey, Sherwood and Woolverton, 2007. 23

Figura 10: A IS1 tem 768 pares de bases (bp) de comprimento, contém o gene da transposase com sequências nucleotídicas repetitivas invertidas (IR) de 23 bp em cada extremidade do gene, e é flanqueada por repetições diretas (DR) de 9 bp. Adaptado de Pierce, 2012. 24
Figura 11: Constituição de diferentes transposões. (A) Organização típica de um transposão. Sequências repetitivas invertidas (IR) flanqueiam os genes funcionais. (B) Organização típica de um transposão composto. A sequência é transposta juntamente com dois elementos IS que o flanqueiam (aqui os ISs estão numa orientação direta, mas podem ser invertidos). Pelo menos uma das transposases precisa de estar ativa. Os DRs internos dos elementos IS podem estar ausentes. Adaptado de Darmon and Leach, 2014. 25
Figura 12: Integração de uma cassete génica na parte estável de um integrão. O *intI* medeia a recombinação entre o local *attC* da cassete génica e o local *attI* do integrão, para que a cassete possa ser integrada atras do promotor P*c*, permitindo a expressão génica. Adaptado de Darmon and Leach, 2014. 26
Figura 13: Representação esquemática do processo se sequenciação de Sanger. Adaptado de Garrido-Cardenas *et al.*, 2017. 28
Figura 14: Reação de transformação da luciferina em oxiluciferina, com libertação de luz. (A) O ATP é gerado pela ATP sulfurilase a partir do APS, na presença de pirofosfato, que é utilizado como cofactor. Cadeia *template* a azul; *Primer* a verde; DNA polimerase a rosa. (B) Pirograma. A altura de cada pico corresponde ao número de nucleótidos incorporados. Adaptado de Garrido-Cadernas *et al.*, 2017. 31
Figura 15: Plataforma *Ion Torrent*. Quando uma base é incorporada, um único ião H + é libertado sendo detetado por um sensor CMOS-ISFET. Apenas um tipo de dNTPs está presente durante cada ciclo; vários dNTPs idênticos podem ser incorporados durante um ciclo, aumentando os iões libertados. Adaptado de Goodwin, McPherson and McCombie, 2016. 32
Figura 16: Uso da técnica *color-space coding* na determinação da ordem dos nucleótidos por ligação sequencial de sondas fluorescentes. (A) Cada sonda é um octâmero, que consiste em (na direção 3' para 5') 2 bases específicas da sonda, seguidas por 6 bases degenera degeneradas (nnnzzz) com um dos 4 fluoróforos existentes ligados à extremidade 5'. As 2 bases específicas da sonda consistem numa das 16 combinações possíveis de 2 bases. (B) Ao adaptador P1 e ao *template* com o *primer* (n) são ligadas sondas representando as 16 combinações possíveis de 2 bases. Neste exemplo, as duas bases específicas complementares ao *template* são AT. Após o *annealing* e a

ligação da sonda, a fluorescência é registada antes da clivagem das últimas 3 bases da sonda degenerada. A extremidade 5' da sonda clivada é fosforilada (não mostrada) antes da ligação da próxima sonda. *Annealing* e ligação da próxima sonda. Extensão completa do *primer* (n) até ao primeiro ciclo consistido por 7 ciclos de ligação. A nova cadeia, a partir do *primer* (n), é desnaturada a partir do adaptador/*template* e o segundo ciclo de sequenciação é realizado com o *primer* (n-1). Adaptado de Voelkerding, Dames and Durtschi, 2009. 34
Figura 17: Sequenciação por síntese *Illumina*. Nos *clusters* criados pela *bridge amplification* são colocados os *primers*, todos os quatro nucleótidos marcados com fluorescência e os nucleótidos bloqueados em 3'-OH são adicionados à *flow cell* com a DNA polimerase. Após o passo de incorporação, os nucleótidos não utilizados são lavados e o sistema de deteção captura a imagem. Uma vez concluída a aquisição de imagens, o fluoróforo é então clivado e o grupo 3'-OH é regenerado. Um novo ciclo de incorporação de nucleótidos fluorescentes começa. Os dados são alinhados e comparados a uma referência, e as diferenças de sequenciação são identificadas. Adaptado de Mardis, 2008. 37
Figura 18: Plataforma *Pacific Bioscience*. (A) *SMRTbell*. Dois adapatadores em forma de *hairpin* permitem a sequenciação circular contínua. (B) ZMW são os locais onde ocorre a sequenciação e à mediada que um nucleótido é incorporado, a câmara regista a luz emitida. (C) PacBio output. Uma câmara regista as alterações de cor de todos os ZMW. Cada mudança de cor corresponde a uma base. Adaptado de Goodwin, McPherson and McCombie, 2016.....39
Figura 19: Plataforma *Oxford Nanopore*. (A) *Leader-hairpin template*. O adaptador *leader* interage com a proteína motor e o poro para direcionar o fragmento de DNA. (B) Uma corrente elétrica atravessa o poro e à medida que o DNA também atravessa, uma alteração na voltagem da corrente é detetada. Cada alteração da voltagem da corrente é específica de cada base. Adaptado de Eisenstein, 2017.....41
Figura 20: (A) Cartucho que contém todos os reagentes necessários; (B) *Flow cell*. 50
Figura 21: Percentagem de espécies de enterococos isoladas a partir de amostras de carne.....57
Figura 22: Resistências antimicrobianas detetadas no total de isolados de VREs 59
Figura 23: Genes de resistência detetados nas diferentes espécies de VREs 61
Figura 24: Padrões de resistência antimicrobiana e percentagem das estirpes de *E. coli* produtoras de ESBLs. AMP-Ampicilina; TIC-Ticarcilina; PIL-Piperacilina; CXM-Cefuroxima; COX-Cefotaxima; CXN-Cefalexina; FEP-Cefepima; TMP-Trimetoprim; SXT-

Trimetoprim/sulfametoxazol; NAL-Ácido nalidíxico; OFX-Ofloxacina; FIX-Cefixima; TEM-Temocilina; CZD-Ceftazidima; CIP-Ciprofloxacina; NXN-Norfloxacina; ATM-Aztreonam; AMC-Amoxicilina+ácido clavulânico; CHL-cloranfenicol; GMN-Gentamicina; TMN-Tobramicina; PTZ-Piperacilina+tazobactam; ETP-Ertapenem; MEC-Mecilinamo; NTM-Netilmicina; IPM-Imipenem; AKN-Amicacina; FOX-Cefoxitina; FOS-Fosfomicina; CST-Colistina. 63
Figura 25: Percentagem de genes ESBL detetados em *E. coli* 65
Figura 26: Percentagem de genes de resistência detetados em *E. coli* 66
Figura 27: Gel de agarose a 0,7% com DNA plasmídico. Poços 1-9: Amostras; Poços 10-13: Marcadores moleculares. Neste gel são visíveis três padrões de bandas diferentes. Primeiro padrão nos poços 1 e 6; segundo padrão nos poços 2, 8 e 9; terceiro padrão nos poços 5 e 7. Nos poços 3 e 4 podemos observar um *smear*. 68
Figura 28: (A) Representação esquemática dos plasmídeos IncI1 pBLSE2-101 e pBLSE-J31. O primeiro anel indica as coordenadas do círculo completo do plasmídeo. Os dois anéis externos representam os *open reading frames forward* e *reverse*, respetivamente. (B) Análise comparativa das sequências dos plasmídeos codificadores do gene $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, pBLSE2-101 e pBLSE-J31. Blocos verticais entre as sequências indicam regiões de similaridade compartilhada. A cor azul indica a correspondência na mesma direção e a cor vermelha indica a correspondência invertida. 71
Figura 29: Rede das estirpes com base na diferença de SNPs (Total de SNPs: 41761). 72

Lista de abreviaturas

ABC - *ATP-binding cassete*
AKN - amicacina
AMC - amoxicilina+ácido clavulânico
AMP – ampicilina usada em *E. coli*
API - ampicilina usada em *Enterococcus* spp.
APS - adenosina 5' fosfossulfato
ARIBA - *antimicrobial resistance identification by assembly*
ATM - *amplicon tagment mix*
ATM - aztreonam
ATP - adenosina trifosfato
BAM 1D - *barcode adapter mix*
BHI - *brain-heart infusion*
ESBLs - β-lactamases de largo espectro
bp - pares de bases
CARD - *the comprehensive antibiotic resistance database*
CCD - c*harge coupled device*
CG - *Complete Genomics*
CHL - cloranfenicol
CIP - ciprofloxacina
CMOS - *complementary metal-oxide semiconductor*
COX - cefotaxima
cPAL - *combinatorial probes anchor ligation*
CRT - terminação reversível cíclica
CST - colistina
CXM - cefuroxima
CXN - cefalexina
CZD - ceftazidima
ddNTP - didesoxinucleótidos
DNA - ácido desoxirribonucleico
DNBs - nanoesferas de DNA
dNTPs - deoxinucleótidos
DRs - sequências curtas de repetição direta
EB – tampão de eluição
ERY - eritromicina
ETP - ertapenem
FEP - cefepima
FIX - cefixima
FLB - *flush buffer*
FLT - f*lush tether*
FOS - fosfomicina
FOX - cefoxitina
GME - gentamicina usada em *Enterococcus* spp.
GMN – gentamicina usada em *E. coli*
HCCA - ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico
HT1 - h*ybridization buffer*
IMViC - teste do indol, vermelho de metilo, "Voges-Proskauer" e citrato
IPM - imipenem
IR - sequência nucleotídica repetitiva invertida
IS - sequência de inserção
ISFET - *ion-sensitive field-effect transistor*

LB - l*oading beads*

LFB - *L fragment buffer*

LIN - linezolida

LVX - levofloxacina

MATE - *multidrug and toxic compound extrusion*

MEC - mecilinamo

MFS - *major facilitator superfamily*

MH - meio Mueller-Hinton

mRNA - RNA mensageiro

NAL - ácido nalidíxico

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NGS - *next generation sequencing*

NPM - *nextera PCR master mix*

NT - *neutralize tagment buffer*

NTM - netilmicina

NXN - norfloxacina

OFX - ofloxacina

PABA - ácido p-aminobenzóico

PacBio - *Pacific Biosciences*

PCR - Reação em cadeia por ação da polimerase

PIL - piperacilina

PPi - pirofosfato

PTN - pristinamicina

PTZ - piperacilina+tazobactam

RIF - rifampina

RNA - ácido ribonucleico

RND - *resistance-nodulation-division*

rRNA - RNA ribossómico

SQB - *sequencing buffer*

SMR - *small multidrug resistance*

SMRT - sequenciação em tempo real de molécula única

SNA - adição de um único nucleótido

SNP - *single nucleotide polymorphisms*

SOLiD - sequenciação por ligação e deteção de oligonucleótidos

ST - *sequence type*

SXT - trimetoprim/sulfametoxazol

TAE - tris-Acetato-EDTA

TCEP - tris-(2-carboxietil)-fosfina

TD - *tagment DNA buffer*

TEC - teicoplanina

TEM - temocilina

TET - tetraciclina

TIC - ticarcilina

TIRF - *total internal reflection fluorescence*

TMN - tobramicina

TMP - trimetoprim

tRNA - RNA transferência

TSA - *trypticase soy agar*

TSI - teste do triplo açúcar-ferro

VNC - vancomicina

VRE - enterococos resistentes à vancomicina

WHO - *World Health Organization*

ZMW - *zero-mode waveguide*

Capítulo 1 – Introdução

1. Problemática da disseminação da resistência aos antibióticos

A pressão seletiva causada pelo uso intensivo de antibióticos na medicina humana, na medicina veterinária, na agricultura, na pecuária, na aquacultura e na tecnologia de alimentos associada a vários mecanismos de transferência genética entre bactérias, contribui para o surgimento e propagação da resistência em diferentes grupos de bactérias (Gold, 2002). Deste modo, a resistência aos antibióticos representa um problema de saúde pública, devido ao desenvolvimento de bactérias multirresistentes, patogénicas ou comensais de seres humanos e animais, e à sua disseminação no meio ambiente (Allen *et al.*, 2010).

A multirresistência em bactérias é caracterizada pela aquisição da não-suscetibilidade a pelo menos um agente em três ou mais classes de antibióticos (Magiorakos *et al.*, 2012). Devido à pressão seletiva que os antibióticos exercem sobre as bactérias, estes agem como indutores da expressão de genes bacterianos que codificam mecanismos de resistência, sendo o poder de seleção proporcional ao tempo de exposição das bactérias ao antibiótico (Butaye, Devriese and Haesebrouck, 2003).

Em animais, para além de serem utilizados como terapêutica, os antibióticos foram utilizados em doses subterapêuticas como indutores de crescimento, prevenindo o aparecimento de infeções e fomentando o aumento de peso (Torres and Zarazaga, 2002). Contudo, a partir de 2006, esta prática é proibida na Comunidade Europeia [Regulamento (CE) Nº 1831/2003], pois estudos indicavam um aumento da resistência aos antibióticos em bactérias de diversos ecossistemas. Atualmente, nenhum antibiótico pode ser utilizado como promotor de crescimento animal na União Europeia pelo que, também, já têm vindo a ser implementadas medidas de contenção a nível mundial (WHO, 2001).

A resistência antimicrobiana pode ser facilmente transferida entre fronteiras, devido à deslocação de indivíduos portadores de bactérias resistentes e à consequente disseminação destas resistências entre bactérias geograficamente distantes. Deste modo, a resistência aos antibióticos não é apenas um problema local, mas antes um problema global, salientando a necessidade de uma política mundial, relativa à utilização prudente de agentes antimicrobianos em medicina humana e veterinária, de forma a evitar a propagação das resistências (Hammerum, 2012).

2. Bactérias indicadoras da resistência a antibióticos

A necessidade de realizar a vigilância e avaliação da suscetibilidade aos antibióticos em bactérias de origem humana, animal e do meio ambiente é considerada uma medida de combate ao aumento da resistência antimicrobiana (WHO, 2001). Por este motivo é necessária uma constante monitorização da resistência bacteriana, principalmente em bactérias "indicadoras de resistência", dada a sua presença numa grande diversidade de nichos ecológicos, permitindo comparar as resistências entre os vários ecossistemas e avaliar a pressão seletiva exercida pelo uso dos antibióticos (Sáenz, 2004).

Dois microrganismos considerados particularmente importantes no controlo da evolução da resistência aos antibióticos em diferentes ecossistemas são *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. (van den Bogaard and Stobberingh, 2000). Embora estas bactérias, geralmente, não causem doenças, podem atuar como reservatório de genes de resistência a antibióticos, que podem ser transmitidos para outras bactérias patogénicas. Adicionalmente, é importante referir que quer *Enterococcus* spp., quer *E. coli*, possuem uma capacidade exímia para adquirir e transmitir genes de resistência mesmo a bactérias filogeneticamente afastadas e que, por estas razões, podem representar um problema à escala mundial, com grandes repercussões no domínio da saúde pública (Martel *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2006).

2.1. *Escherichia coli*

2.1.1. Características gerais e fisiológicas da espécie

Escherichia coli é uma enterobactéria isolada pela primeira vez em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich, a partir do qual derivou o seu nome (Shulman, Friedmann and Sims, 2007). Filogeneticamente, *E. coli* pertence à família Enterobacteriaceae e caracteriza-se por ser uma bactéria com forma de bacilo Gram-negativo, anaeróbia facultativa, fermentadora da glucose e lactose, móvel com flagelos perítricos, não-esporulante, produtora de catalase e citocromo-oxidase negativa (Ferreira and Sousa, 1998; Sousa, 2006). Apesar de possuir um potencial patogénico, esta bactéria é, predominantemente, comensal que habita o trato gastrointestinal de humanos e diversos animais, tendo um papel importante na digestão, decomposição e proteção do intestino, sendo por isso um importante bioindicador da contaminação fecal (Belluco *et al.*, 2016). Pode, ainda, ser isolada da água, do solo ou de plantas, apresentando uma distribuição ubiquitária (Ferreira and Sousa, 1998).

E. coli é composta por um nucleoide superenrolado e estima-se que o seu genoma seja composto por 3 milhões de pares de bases, codificando 4700 genes e 2500 proteínas (Sousa, 2006; Bennett, 2008). A maioria das estirpes de *E. coli* são comensais e sintetizam vitamina K e B12. Os fenótipos comensais ou patogénicos em *E. coli* estão relacionados com diferenças genómicas (genomas podem diferir até 20%) e consequentes padrões de expressão génica (Ochman and Jones, 2000; Van Elsas *et al.*, 2011). Esta bactéria, embora esteja implicada em processos fisiológicos importantes, também representa um agente etiológico significativo de infeções comunitárias, sendo uma das principais causas de infeções no trato urinário e de infeções extraintestinais como a meningite neonatal em humanos, pneumonia, abcessos, septicemia e bacteriemia (Ferreira and Sousa, 1998; Diekema *et al.*, 1999; Daza, Gutiérrez and Piédrola, 2001; Duriez *et al.*, 2001; Fluit *et al.*, 2002; Oteo *et al.*, 2006). As estirpes patogénicas de *E. coli* podem manifestar diferentes níveis de gravidade para o hospedeiro, mas muitas conduzem a uma série de doenças e ao aumento da taxa de mortalidade mundial (LeCointre *et al.*, 1998; Sokurenko *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 1999).

Foi provado, por Kåhrström em 2012 (Kåhrström, 2012), que *E. coli* está envolvida em processos carcinogénicos, uma vez que o processo inflamatório seleciona a microbiota intestinal de forma a favorecer a proliferação de *E. coli*, que é incentivada a produzir uma genotoxina, a colibactina, que promove o aparecimento do cancro colorretal.

Para identificar esta bactéria, é geralmente realizada a cultura das amostras em meios seletivos, aliada à observação microscópica, através da técnica de Gram, e ainda realizadas provas do perfil bioquímico (teste do indol, vermelho de metilo, "Vosgues-Proskauer" e citrato (IMViC), teste do triplo açúcar-ferro (TSI) e teste da ureia). Os meios de agar MacConkey ou de Levine podem ser usados para o seu isolamento. Em agar MacConkey, são produzidas colónias de tonalidade rosa, uma vez que este microrganismo utiliza a lactose, resultando na produção de ácidos e consequente descida do pH. O crescimento em Levine evidencia colónias esverdeadas/escuras, com brilho metálico e forma arredondada com um ponto preto no centro da colónia (Poeta, Coelho and Rodrigues, 2008).

2.1.2. Resistência aos antibióticos em *Escherichia coli*

A maioria das estirpes de *E. coli* é suscetível aos antibióticos utilizados na terapêutica, no entanto, tem-se observado um aumento do aparecimento de bactérias multirresistentes (Sahm *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2007). O estudo destas bactérias é importante para determinar o seu grau

de patogenicidade, tendo ainda um papel fulcral no entendimento da evolução e disseminação das multirresistências (Bradford, 2001).

E. coli é considerada pela Organização Mundial de Saúde como um dos microrganismos essenciais para a monitorização do nível de resistência aos antibióticos existentes no domínio animal e para os estudos dos mecanismos de emergência e persistência das resistências geradas pelo uso de antibióticos em espécies pecuárias (WHO, 2001; Hayes *et al.*, 2004). O estudo da resistência antimicrobiana em *E. coli* permite obter, ao longo do tempo, uma informação antecipada sobre a sua emergência em bactérias potencialmente patogénicas e avaliar a pressão seletiva exercida pela administração de antibióticos a uma determinada população (Harwood, Whitlock and Withington, 2000; Teuber, 2001; Kijima-Tanaka *et al.*, 2003), possibilitando uma comparação direta da resistência entre populações animais e humanas.

Os membros da família Enterobacteriaceae são, também, conhecidos pela sua capacidade de transferência de DNA entre espécies bacterianas homólogas e não homólogas (Blake *et al.*, 2003), leveduras (Heinemann and Sprague, 1989), plantas (Bravo-Angel *et al.*, 1999) e células animais (Waters, 2001) representando a conjugação bacteriana um mecanismo que conduz à dispersão de genes de resistência entre diferentes estirpes bacterianas (Reynolds, 2009). *E. coli* é, igualmente, reconhecida pela notável capacidade que demonstra para aceitar e transmitir genes de resistência, inclusive a bactérias filogeneticamente afastadas e/ou bactérias patogénicas (Tauxe, Cavanagh and Cohen, 1989; Witte, 1998; Shoemaker *et al.*, 2001; Martel *et al.*, 2003).

2.2. *Enterococcus* spp.

2.2.1. Classificação e características gerais

Os enterococos são um grupo complexo e diversificado de bactérias, descrito há mais de um século (Facklam, Carvalho and Teixeira, 2002). O termo "enterococo" foi utilizado pela primeira vez, por Thiercelin, de modo a destacar a origem entérica de um diplococo Gram-positivo de origem gastrintestinal humana (Thiercelin and Jouhaud, 1899, 1903). Todavia, só em 1970 o grupo enterococci fosse considerado um género independente e passasse a ser designado por *Enterococcus* (Kalina, 1970).

Os enterococos são bactérias comensais Gram-positivas produtoras de exotoxinas, catalase negativas e anaeróbias facultativas, presentes no trato gastrintestinal de humanos, bem como numa grande variedade de animais (Murray, Rosenthal and Pfaller, 2014). Contudo, estas bactérias

podem existir, esporadicamente, noutros locais anatómicos, como são o caso da cavidade oral e do trato vaginal (Devriese *et al.*, 1992; Pabich *et al.*, 2003), assim como noutros ambientes, como no solo, na água e em produtos alimentares, provavelmente, devido à disseminação a partir de fontes fecais (Facklam, Carvalho and Teixeira, 2002). Estes microrganismos apresentam uma elevada taxa de sobrevivência e adaptação a condições ambientais adversas (temperatura, pH e salinidade), podendo desenvolver mecanismos de resistência que dificultam o tratamento da infeção (Marinho, 2013; Marinho *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2015).

A relação microrganismo - hospedeiro pode contribuir para a relevância clínica de um patógeno, sendo que os enterococos parecem resistir a agentes antimicrobianos (por exemplo, clindamicina, cefalosporinas e aminoglicosídeos), possuem a habilidade em adquirir e disseminar determinantes de resistência a antibióticos (por exemplo, *clusters* de genes de resistência à vancomicina), e maleabilidade dos seus genomas, que pode contribuir para a sua adaptação a ambientes mais rigorosos e aumentar a capacidade de certas estirpes poderem colonizar o trato gastrintestinal e/ou disseminar para fora do intestino (Arias and Murray, 2012). A relação entre o aumento da incidência de infeções causadas por enterococos e o aumento do uso de antibióticos como as quinolonas e cefalosporinas, é devida ao facto de estas bactérias apresentarem uma resistência intrínseca ou suscetibilidade baixa a estes antibióticos, usados habitualmente no tratamento de infeções. Adicionalmente, os enterococos têm a capacidade de adquirir resistências através de mutações ou da transferência de genes presentes em plasmídeos ou transposões podendo, a pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos provocar a seleção de estirpes resistentes e ser um fator predominante para o aumento do número de infeções hospitalares (Rice, 2001). O uso de antibióticos pode favorecer a seleção de estirpes com mecanismos de resistência, constituindo, os enterococos, reservatórios de genes capazes de os adquirir e transferir a outras bactérias.

Contudo, apesar do seu potencial patogénico, os enterococos, normalmente, exibem baixos níveis de virulência, como é evidenciado pela sua presença como colonizadores naturais do trato gastrintestinal em humanos e outros animais, e pelo facto de serem usados durante décadas como probióticos (Arias and Murray, 2012).

2.2.2. Resistência aos antibióticos em *Enterococcus* spp.

Apesar de serem bactérias comensais da flora intestinal humana e animal, estes microrganismos também são passíveis de ser encontrados nos mais variados ecossistemas, dado

que, a ecorresistência desta espécie potencializa a sua persistência num determinado ecossistema bem como a colonização de ecossistemas inacessíveis para outros microrganismos (Noskin *et al.*, 1995; Hammerum, 2012).

Apesar de serem intrinsecamente resistentes a uma gama ampla de agentes antimicrobianos, nomeadamente, aos β-lactâmicos e aos aminoglicosídeos, os enterococos podem, ainda, adquirir vários mecanismos genéticos que lhes conferem resistência à maioria dos antibióticos usados em terapêutica. A transferência de genes de resistência entre enterococos ocorre preferencialmente no intestino de animais, incluindo humanos, onde estão sujeitos à pressão seletiva do uso de antibióticos. Através da colonização dos intestinos de humanos saudáveis, os enterococos resistentes de origem animal podem atuar como dadores de genes de resistência a antibióticos, para as bactérias comensais (Hammerum, 2012).

Estes fatores favorecem a capacidade de sobrevivência dos enterococos, mesmo em locais onde a utilização de antibióticos é elevada, como é o caso de unidades de cuidados de saúde, tornando-os numa das principais origens de infeção nosocomial. Desta forma, os enterococos são patógenos importantes em medicina, responsáveis por infeções críticas em pacientes (Bonten, Willems and Weinstein, 2001; Hammerum, 2012).

3. Antibióticos

Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos que interferem com processos específicos essenciais para o crescimento e/ou divisão de células bacterianas. Estes podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (Walsh, 2003a).

Em 1937, deu-se a introdução do primeiro antibiótico eficaz, as sulfonamidas, sendo que as primeiras resistências a este antibiótico se identificaram por volta de 1940 e têm vindo a complicar a terapêutica (Davies and Davies, 2010). A penicilina foi descoberta por Alexander Fleming em 1928, verificando-se a sua introdução como antibiótico por volta de 1943. As primeiras resistências a este antibiótico foram identificadas por volta de 1946 quando se identificou a primeira penicilase bacteriana (Neu *et al.*, 1996; Davies and Davies, 2010).

Em 1944, Waksman isolou a estreptomicina e consequentemente descobriram-se agentes como cloranfenicol, tetraciclinas e eritromicina. Em 1960, fizeram-se melhorias nas técnicas de fermentação e avanços na química medicinal permitiram a síntese de novos agentes

quimioterapêuticos por modificações moleculares de compostos já existentes, nomeadamente cefalosporinas e penicilinas semissintéticas (Neu *et al.*, 1996; Coates, Halls and Hu, 2011). No entanto, quando se pensava que, finalmente, tinham encontrado algo que combatesse as bactérias, estas responderam manifestando várias formas de resistência. À medida que o uso de antibióticos aumentou, o nível de complexidade dos mecanismos de resistência das bactérias também aumentou (Tenover, 2006). Este aumento está a ocorrer num período em que a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos está a diminuir drasticamente. Os organismos resistentes a antibióticos são uma grande preocupação para a saúde pública, pois são capazes se causar sérios problemas devido às poucas opções de tratamento (Mulvey and Simor, 2009). Esta resistência deve-se a uma vasta gama de mecanismos bioquímicos e fisiológicos desenvolvidos pelas bactérias e a complexidade dos mesmos ajuda à disseminação e à emergência de resistências (Davies and Davies, 2010). Hoje em dia, bactérias multirresistentes disseminam-se por todo o mundo e metade das mortes por infeção clínica na Europa estão associadas a estas bactérias (Coates, Halls and Hu, 2011).

3.1. Mecanismos de ação dos antibióticos

Os principais alvos da ação dos antibióticos são processos celulares vitais, como é o caso da síntese da parede celular, da biossíntese proteica, da replicação e reparação do DNA, a síntese da membrana celular e da biossíntese do ácido fólico. A ação de cada antibiótico impede um ou mais passos importantes nestas vias celulares essenciais à sobrevivência dos microrganismos alvo (Figura 1).

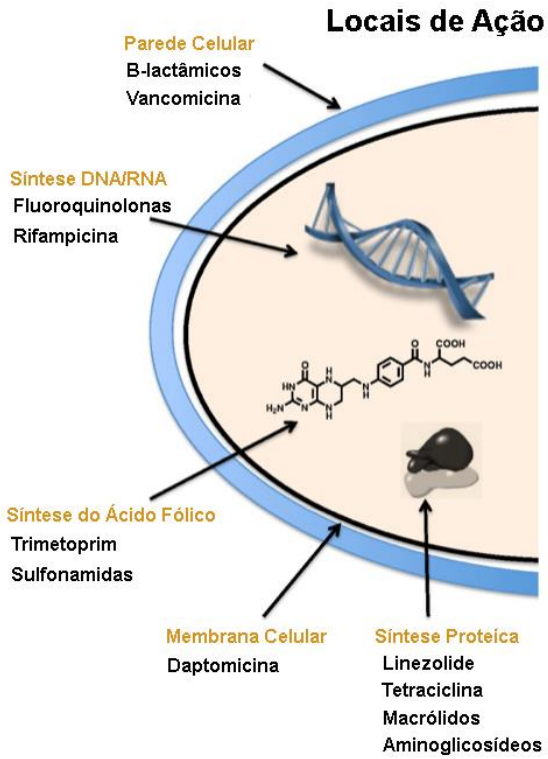


Figura 1: Alvos da ação e respetivos antibióticos.

3.1.1. Inibição da síntese da parede celular

A parede celular bacteriana é constituída essencialmente por peptidoglicano que lhe confere rigidez e funciona como uma barreira estrutural contra pressões osmóticas que podem matar a bactéria. O peptidoglicano é um heteropolímero constituído por cadeias lineares de dois açúcares aminados, a N-acetilglucosamina e o ácido N-acetilmurâmico dispostos alternadamente e unidos por ligações glicosídicas (Ferreira and Sousa, 1998; Walsh, 2003a). A formação desta barreira biológica pode realizar-se por um processo de transglicosilação (elongação dos monómeros de peptidoglicano) ou por um processo de transpeptidação (ligações cruzadas dos monómeros de peptidoglicano) (Walsh, 2003a). A síntese de peptidoglicano ocorre em três etapas complexas e a interferência dos antibióticos ao nível destas etapas afetam a sua síntese (Neu *et al.*, 1996).

A parede celular das bactérias Gram-positivas e das bactérias Gram-negativas é diferente, como se pode visualizar na Figura 2, levando a diferenças de permeabilidade aos antibióticos. Por exemplo, os glicopéptidos (ex.: vancomicina) são uma classe de antibióticos inibidores da biossíntese da parede celular pois inibem os processos de transpeptidação e transglicosilação (Munita and Arias, 2016) (Figura 3) sendo eficaz contra bactérias Gram-positivas, no entanto, é pouco eficaz contra bactérias Gram-negativas devido à existência da membrana externa que bloqueia a passagem do antibiótico (Walsh, 2003a).

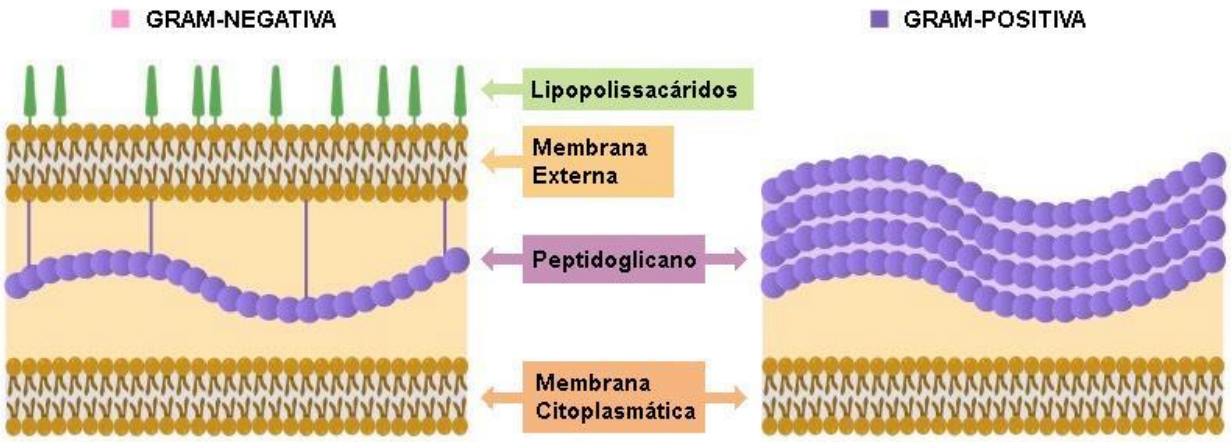


Figura 2: Diferenças das estruturas membranares das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Adaptado de: https://cen.acs.org/articles/93/web/2015/04/New-Spin-Old-Gram-Stain.html.

Os antibióticos β-lactâmicos e os glicopéptidos atuam na parede celular inibindo a síntese do peptidoglicano. Estes interferem na síntese de peptidoglicano atuando como um análogo da porção D-alanina-D-alanina do ácido N-acetilmurâmico. Como a estrutura da penicilina é muito semelhante à estrutura D-alanina-D-alanina, as enzimas envolvidas na transpeptidação reagem com os núcleos β-lactâmicos da penicilina, inativando a ação da transpeptidase resultando na formação de novas cadeias de peptidoglicano que não são *cross-linked* (Yocum, Rasmussen and Strominger, 1980). Assim a síntese de peptidoglicano é comprometida e a perda ou o dano desta camada altera a rigidez da parede celular bacteriana, assim como a sua permeabilidade resultando na morte da bactéria (Neu *et al.*, 1996).

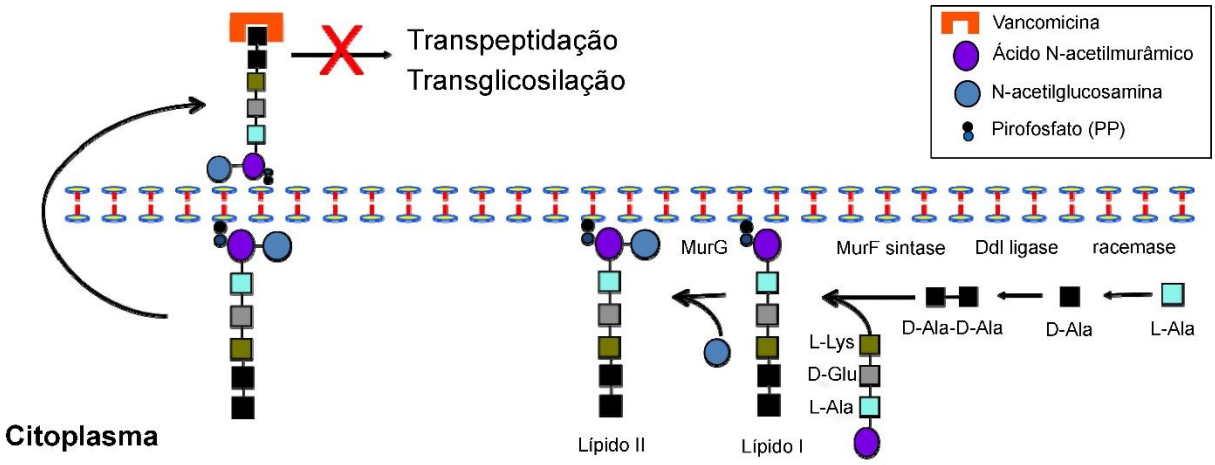


Figura 3: Representação esquemática da biossíntese de peptidoglicano e mecanismo de ação da vancomicina. A ligação do antibiótico ao terminal D-Ala-D-Ala dos precursores do peptidoglicano previne a transpeptidação e a transglicosilação, interrompendo a síntese da parede celular resultando na morte da bactéria. Adaptado de Munita and Arias, 2016.

3.1.2. Inibição da síntese da membrana celular

A membrana celular é constituída essencialmente por fosfolípidos, lípidos (glicolípidos e colesterol), lipoproteínas e proteínas (integrais ou periféricas), atuando como uma barreira de difusão de água, iões e nutrientes. Os agentes antibacterianos podem provocar uma desorganização desta membrana, podendo inibir ao mesmo tempo outras funções celulares (Neu *et al.*, 1996; Sefton, 2002; Young, O'Dowd and Woodford, 2006). As polimixinas são antibióticos que atacam os grupos fosfato que se encontram expostos na membrana fosfolipídica resultando numa disrupção da membrana e consequentemente há libertação para o exterior de organelos citoplasmáticos e morte da célula. De entre os mecanismos de ação dos antibióticos, este é o mecanismo que se encontra menos caracterizado (Greenwood and Whitley, 2002; Sefton, 2002; Tenover, 2006).

3.1.3. Interferência na síntese de ácidos nucleicos

A inibição da replicação do DNA e das enzimas de reparação é um importante alvo para a ação de antibióticos (Walsh, 2003a). Os antibióticos que afetam a síntese dos ácidos nucleicos incluem, principalmente, a classe das fluoroquinolonas (ácido nalidíxico e ciprofloxacina) (Sefton, 2002).

O mecanismo de ação destes antibióticos centra-se nas enzimas DNA girase e topoisomerase IV bacteriana. Nas bactérias Gram-negativas, a DNA girase é o principal alvo desta classe de antibióticos, no entanto, nas bactérias Gram-positivas, o principal alvo é a topoisomerase IV (Greenwood and Whitley, 2002). A DNA girase é um tetrâmero composto por dois pares de

subunidades α e β, e é responsável por aliviar a tensão de torção durante a replicação do DNA circular de cadeia dupla. Esta enzima é o primeiro alvo da ação das fluoroquinolonas, como é o caso do ácido nalidíxico, que se liga à subunidade α da DNA girase. Quando esta subunidade α juntamente com o ácido nalidíxico se encontra covalentemente ligada ao DNA há a formação de complexos ternários que se quebram (Greenwood and Whitley, 2002; Walsh, 2003b; Richter *et al.*, 2007). Esta interação das fluoroquinolonas tem um efeito negativo no processo de replicação do DNA resultando na morte da bactéria (Figura 4) (Neu *et al.*, 1996). A topoisomerase IV é um tetrâmero composto por duas subunidades e está envolvida no relaxamento e na segregação cromossomal. Esta topoisomerase é um alvo crucial para as fluoroquinolonas, cujo modo de atuação é semelhante ao que acontece à DNA girase (Richter *et al.*, 2007).

Também o antibiótico rifampicina (Figura 4) é responsável pela inibição da síntese de RNA, ou seja, impede a transcrição devido à ligação não covalente que estabelece com uma subunidade da RNA polimerase (Neu *et al.*, 1996; Sefton, 2002).

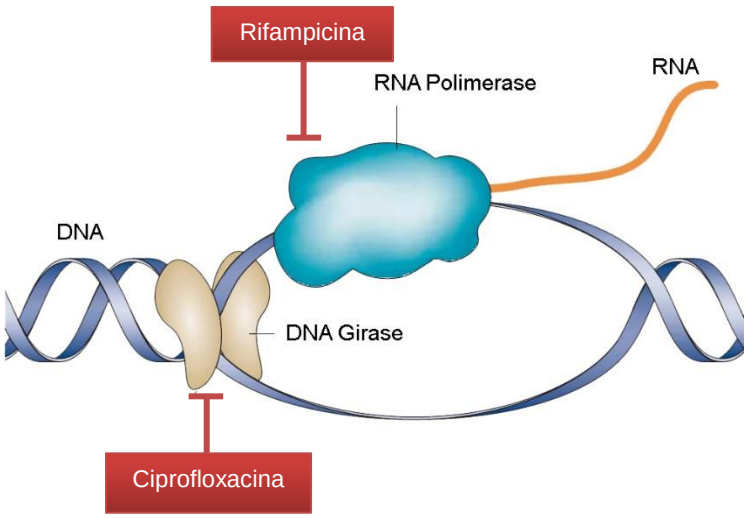


Figura 4: Locais de ação de grupos de antibióticos inibitórios da síntese dos ácidos nucleicos. Na replicação do DNA e na transcrição do RNA: a rifampicina liga-se à RNA polimerase e evita a ligação da DNA polimerase, inibindo, assim, a transcrição; a ciprofloxacina e as novobiocinas ligam-se à DNA girase, impedindo o enrolamento do DNA. Adaptado de Walsh, 2003b.

3.1.4. Inibição da síntese de proteínas

Nas bactérias, os ribossomas são compostos por duas subunidades, a 30S e a 50S, sendo responsáveis pela biossíntese de proteínas. A subunidade ribossomal 30S é constituída por cerca

de 20 proteínas e um rRNA 16S. Já a subunidade ribossomal 50S tem na sua constituição dois tipos de rRNA, o 23S e o 5S, e cerca de 30 proteínas necessárias para todo o processo de biossíntese (Neu *et al.*, 1996; Walsh, 2003a).

Os antibióticos que inibem a síntese de proteínas incluem aminoglicosídeos, como a estreptomicina (são os únicos agentes bactericidas), tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos como a eritromicina, e as lincosamidas (são agentes bacteriostáticos) (Figura 5) (Sefton, 2002; Tortora, Funke and Case, 2019).

Os aminoglicosídeos, classe da qual se destaca a estreptomicina, são açúcares hidrofílicos com múltiplos grupos de aminoácidos que funcionam como policatiões e têm como alvo as regiões polianiónicas do rRNA 16S presente na subunidade ribossomal 30S (Walsh, 2003a). Os aminoglicosídeos provocam a morte da bactéria pela indução da formação de complexos aberrantes e não funcionais impossibilitando uma leitura correta do mRNA e consequentemente impedem a síntese de uma nova proteína (Neu *et al.*, 1996). Estes antibióticos são bastante eficazes contra bactérias Gram-negativas devido à sua combinação com os antibióticos β-lactâmicos, ao contrário do que se sucede com as bactérias Gram-positivas (Walsh, 2003a).

As tetraciclinas penetram a célula bacteriana por meio de processos de difusão através de poros hidrofílicos que se encontram na membrana externa e ultrapassam a membrana interna por um processo de transporte ativo. Esta classe de antibióticos impede o crescimento da bactéria pela ligação aos ribossomas, nomeadamente à subunidade 30S impossibilitando a ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A presente no ribossoma (Roberts, 1996), terminando a tradução sem a formação do péptido (Walsh, 2003a).

Um antibiótico importante que inibe a subunidade ribossomal 50S é o cloranfenicol responsável pela inibição tanto de bactérias Gram-positivas como de Gram-negativas. Este antibiótico liga-se à enzima peptidil transferase presente na subunidade 50S e impede a formação das ligações peptídicas (Neu *et al.*, 1996).

Duas outras classes de antibióticos cujo seu mecanismo de ação é dirigido para a subunidade 50S são os macrólidos e as lincosamidas que exibem atividades antimicrobianas muito similares. Os macrólidos podem atuar de duas formas: pela interferência com a atividade da peptidil transferase presente na subunidade ribossomal 50S ou pela interrupção da montagem da subunidade 50S. Estas classes de antibióticos bloqueiam a fase de alongamento e a saída do péptido

da subunidade ribossomal 50S (Edelstein, 2004). As lincosamidas parecem interferir diretamente na reação da peptidil transferase através do bloqueio do sítio P (Greenwood and Whitley, 2002).

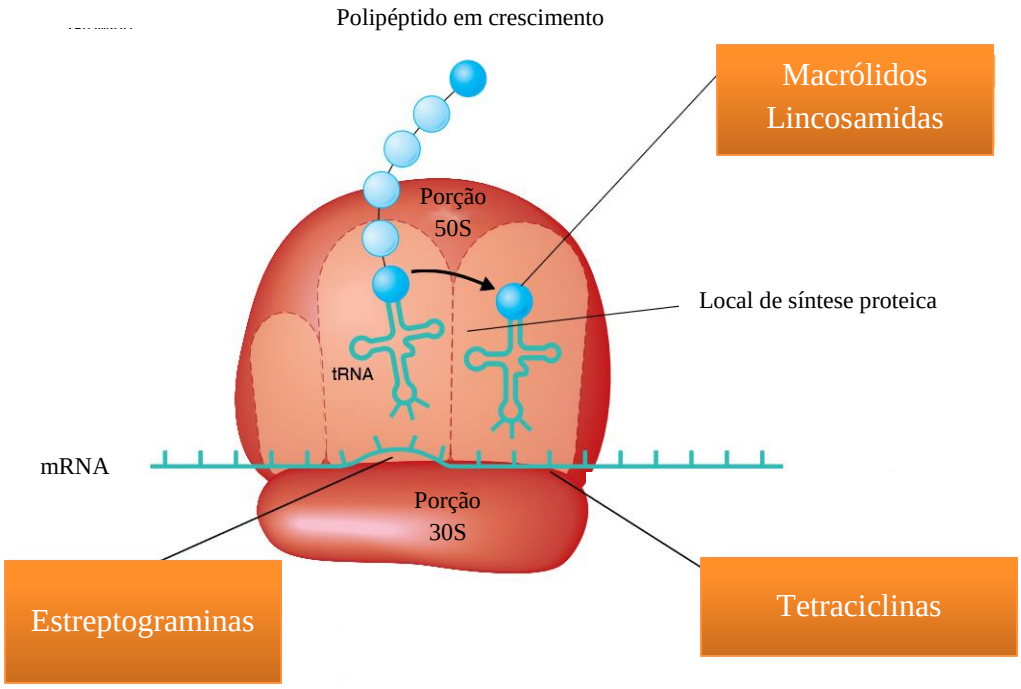


Figura 5: Inibição proteica provocada por antibióticos e respetivos locais de atuação no ribossoma procariota. Adaptado de Tortora, Funke and Case, 2019.

3.1.5. Inibição dos metabolismos celulares

O ácido fólico, também denominado de vitamina B9, consiste numa molécula de ácido p-aminobenzóico (PABA) à qual se ligam, numa extremidade, um anel de pteridina, e na outra extremidade uma molécula de ácido glutâmico (Figura 6).

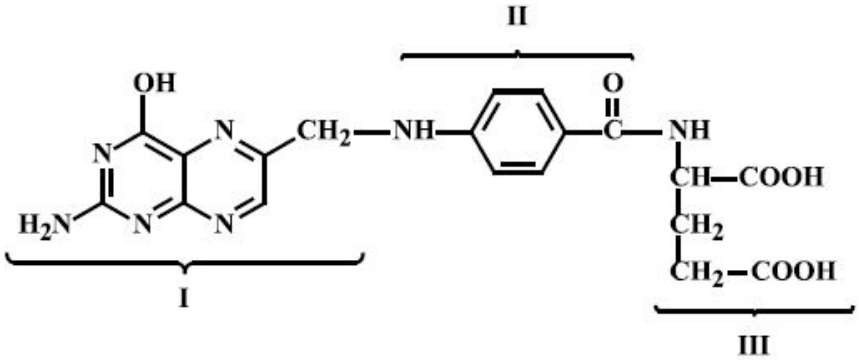


Figura 6: Molécula de ácido fólico. I- Anel de pteridina; II- p-aminobenzóico (PABA); III- Ácido glutâmico.

O ácido fólico funciona como uma coenzima envolvida em numerosos mecanismos celulares como a síntese, transcrição e reparação de DNA, que depende desta coenzima para a biossíntese de pirimidinas e purinas assim como para mecanismos de interconversão de aminoácidos (Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, 1998). As bactérias necessitam de ácido fólico, mas como não possuem um sistema do obter do ambiente que as rodeia têm, necessariamente, de o sintetizar (Sáenz *et al.*, 2004).

A síntese do ácido fólico pode ser inibida pelas sulfonamidas, nomeadamente o sulfametoxazole, que é usado em combinação com o trimetroprim. O sulfametoxazole bloqueia a enzima dihidropteroato sintase na via biossintética do ácido fólico, enquanto o trimetoprim bloqueia a dihidrofolato redutase inibindo a síntese do tetrahidrofolato e consequentemente inibindo a síntese de DNA (Figura 7) (Walsh, 2003a).

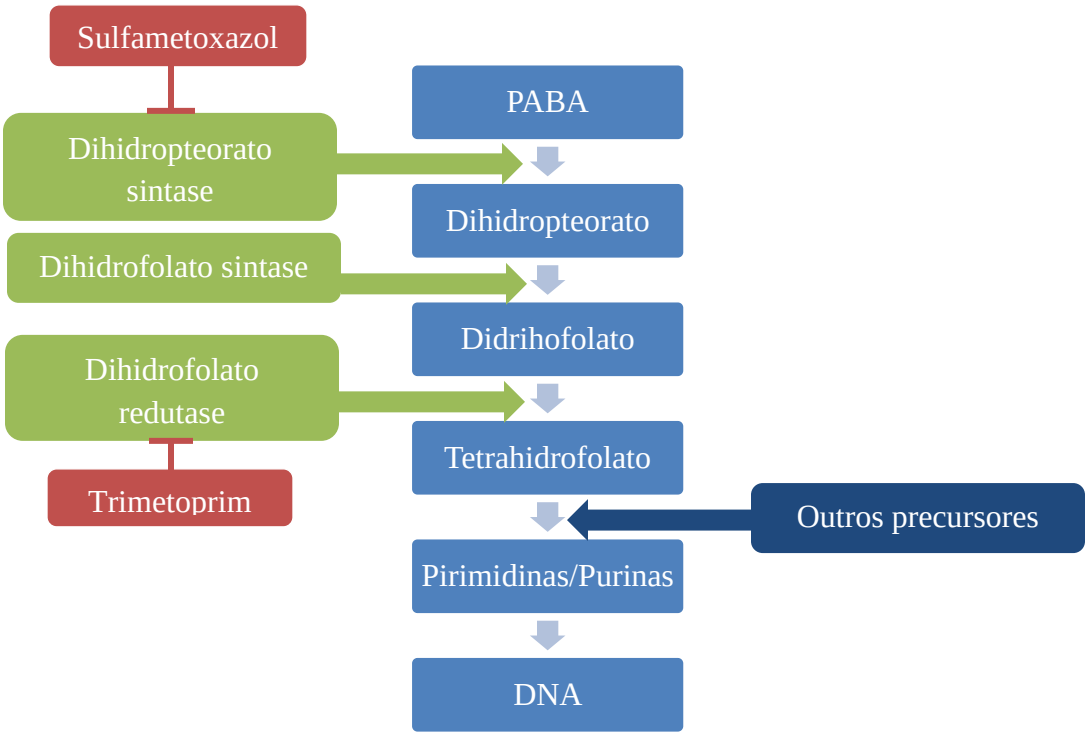


Figura 7: Metabolismo do ácido fólico e local de inibição dos antibióticos trimetoprim e sulfametoxazol. O folato, ou ácido fólico, é necessário para a síntese quer de purinas quer de pirimidinas, componentes essenciais do DNA. Os antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim bloqueiam etapas do metabolismo do folato e, portanto, bloqueiam a síntese de purinas e pirimidinas. Adaptado de Walsh, 2003b.

3.2. Mecanismos de resistência aos antibióticos

As bactérias podem manifestar resistência face aos antibióticos através de uma grande variedade de mecanismos, os quais são facilmente transmitidos a uma grande variedade de espécies bacterianas (Tenover, 2006).

Os mecanismos de resistência aos antibióticos podem ser classificados como intrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca é um fenómeno natural que ocorre na ausência de pressão seletiva dos antibióticos, ou seja, ocorre sem uma exposição prévia ao antibiótico tornando as bactérias naturalmente resistentes a uma ou mais classes de antibióticos. A resistência adquirida a antibióticos pode ocorrer num microrganismo devido a uma alteração (mutação) no seu genoma ou por aquisição de uma nova informação genética por processos de transformação, conjugação e transdução, conferindo-lhe um mecanismo de resistência a várias classes de antibióticos que o microrganismo não possuía previamente (Sefton, 2002; Mulvey and Simor, 2009). Existem vários mecanismos de resistência aos antibióticos que são: a permeabilização seletiva, a destruição enzimática ou modificação do antibiótico, a alteração do alvo molecular do antibiótico, e as bombas de efluxo (Figura 8) (Walsh, 2003a).

Por conseguinte, eventos mutacionais e de seleção acompanhados de mecanismos de modificação genética permitem que muitas espécies de bactérias se adaptem rapidamente à introdução de agentes antibacterianos no seu ambiente (Tenover, 2006).

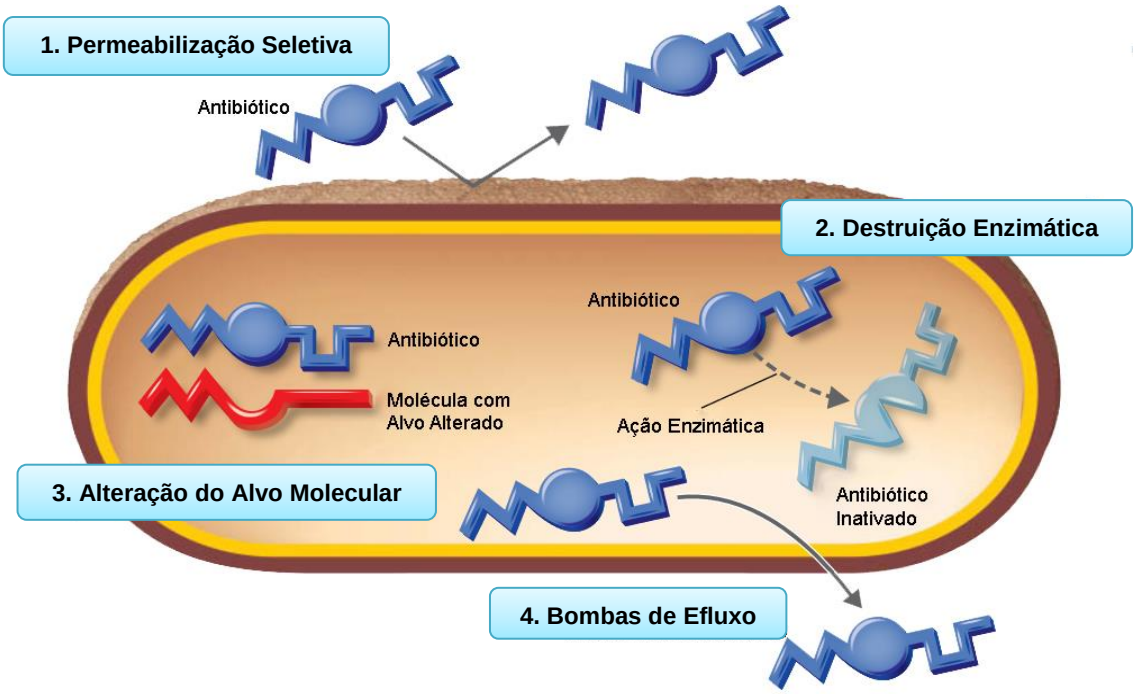


Figura 8: Representação dos diversos tipos de mecanismos de resistência bacteriana. Adaptado de Tortora, Funke and Case, 2019.

3.2.1. Destruição enzimática ou modificação do antibiótico

Existem três enzimas principais capazes de inativar antibióticos: as β-lactamases que modificam antibióticos β-lactâmicos, as acetiltransferases que modificam o cloranfenicol e ainda enzimas que modificam os aminoglicosídeos pela adição de grupos químicos, impedindo assim a ação dos antibióticos sobre a célula bacteriana (Giedraitienė *et al.*, 2011; Blair *et al.*, 2015).

A inativação do antibiótico pode ocorrer pela transferência de grupos químicos para locais vulneráveis da molécula do antibiótico pelas enzimas bacterianas causando resistências face aos antibióticos. Diferentes grupos químicos podem ser transferidos, incluindo grupos acetil, fosfato ou adenil (Giedraitienė *et al.*, 2011; Blair *et al.*, 2015).

Os antibióticos da classe dos aminoglicosídeos são particularmente suscetíveis a modificações, uma vez que são caracterizados por serem grandes moléculas e possuírem grupos hidroxilo e amina expostos. Existem três principais classes de enzimas capazes de modificar este antibiótico: acetiltransferases, fosfatases e nucleotidiltransferases (Blair *et al.*, 2015). As acetiltransferases são capazes de modificar a tobramicina, gentamicina, netilmicina e amicacina; as nucleotidiltransferases alteram a atividade da tobramicina; as fosfatases afetam a suscetibilidade

da amicacina (Alekshun and Levy, 2007). Estas enzimas reduzem a afinidade da molécula modificada, impedindo que esta se ligue ao rRNA 16S da subunidade ribossomal 30S, providenciando um amplo-espectro de resistência aos aminoglicosídeos e também às fluoroquinolonas (Giedraitienė *et al.*, 2011). Muitas das enzimas referidas anteriormente são encontradas em integrões e outros elementos genéticos móveis (Alekshun and Levy, 2007).

O mecanismo mais comum de resistência ao cloranfenicol é a cloranfenicol transacetilase que acetila o grupo hidroxilo do cloranfenicol. Esta modificação impede que este antibiótico se ligue à subunidade ribossomal 50S não inibindo o processo de tradução bacteriano (Giedraitienė *et al.*, 2011).

Outro mecanismo de resistência por hidrólise dos antibióticos é a família das β-lactamases, que atuam hidrolisando o anel β-lactâmico das penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos (aztreonamo) e carbapenems. Existem centenas de β-lactamases, algumas delas codificadas por genes do cromossoma bacteriano e outras localizadas em plasmídeos e transposões (Mulvey and Simor, 2009). As primeiras β-lactamases que surgiram eram ativas contra a primeira geração de β-lactâmicos, seguindo-se as β-lactamases de largo espectro (ESBLs) com uma atividade contra as cefalosporinas para além das penicilinas (Blair *et al.*, 2015).

As β-lactamases classificam-se molecularmente em classe A, C e D composta por serina-β-lactamases e em classe B composta por metalo-β-lactamases. Ainda podem classificar-se em quatro classes major, A-D, e quatro classes minor de acordo com a sua funcionalidade, distintos substratos e perfis inibidores (Paterson, 2006; Bush, 2013a).

O impacto clínico destas enzimas é particularmente crítico devido à dependência de cefalosporinas e carbapenems para o tratamento de graves infeções, especialmente em ambientes clínicos (Bush, 2013b).

3.2.1.1. Diversidade de ESBLs

As β-lactamases de largo espectro (ESBLs) podem dividir-se em cinco tipos distintos:

TEM - foi a primeira β-lactamase mediada por um plasmídeo descoberta em bactérias Gram-negativas, em 1965. Como esta β-lactamase era codificada por um plasmídeo, rapidamente se disseminou para outros membros da família Enterobacteriaceae (Turner, 2005). Cerca de 237 variantes de TEM já foram identificadas (pesquisa efetuada no NCBI *Protein* a 26 de novembro de 2018), muitos delas exibindo um fenótipo ESBL, derivadas da TEM-1 e TEM-2 (Poirel, Bonnin

and Nordmann, 2012). As β-lactamase TEM-1 e TEM-2 conferem resistências à ampicilina, amoxicilina e outras penicilinas assim como a algumas cefolosporinas, através da hidrólise das mesmas. Mutações ao nível dos genes que codificam estas β-lactamases com consequentes mudanças de aminoácidos conferiram resistência, destas enzimas, às cefalosporinas de terceira geração, passando a expressar um fenótipo ESBLs (Tenover, 2006; Poirel, Bonnin and Nordmann, 2012).

SHV - a primeira β-lactamase desta variante, SHV-1, foi descoberta no mesmo período que as primeiras β-lactamases TEM. Mais tarde surgiram muitas outras variantes devido a mutações pontuais, já tendo sido identificadas 228 variantes (pesquisa efetuada no NCBI *Protein* a 26 de novembro de 2018) (Poirel, Bonnin and Nordmann, 2012). Estas ESBLs, assim como as TEM são mediadas por um plasmídeo e a sua evolução deveu-se a uma pressão seletiva gerada pelas oximino-cefalosporinas largamente utilizadas para o tratamento de infeções hospitalares (Turner, 2005). Muitas variantes de SHV ESBLs encontram-se amplamente distribuídas por todo o mundo, sendo as mais frequentes as SHV-12, SHV-2 e SHV-5 (Poirel, Bonnin and Nordmann, 2012).

CTX-M - estas enzimas começaram a ser descobertas em Enterobacteriaceae por volta de 1990, e a sua rápida propagação ocorreu durante a última década. Estas enzimas foram divididas em 6 grupos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 e KLUC) e já foram encontrados 224 variantes de CTX-M (pesquisa efetuada no NCBI *Protein* a 26 de novembro de 2018), responsáveis por conferir resistência às penicilinas e a um amplo espectro de cefalosporinas, com uma potente atividade hidrolítica contra os antibióticos cefotaxima e ceftadizima (Chong, Ito and Kamimura, 2011; Poirel, Bonnin and Nordmann, 2012). As variantes CTX-M-14 (pertencente ao grupo CTX-M-9) e CTX-M-15 (pertencente ao grupo CTX-M-1) são as mais comumente encontradas em casos clínicos (Levy, 2002; Bonnet, 2004).

OXA - estas β-lactamases são caracterizadas por possuírem a capacidade de hidrolisar e conferir resistência à oxacilina, daí a sua denominação de oxacilinases e o prefixo OXA. Estas enzimas apesar de hidrolisarem penicilinas apresentam uma menor atividade contra estas que as β-lactamases TEM mas, por outro lado, apresentam uma grande atividade contra a oxicilina e a meticilina. Estas são, também, menos eficazes no combate a cefalosporinas de primeira geração e são pouco inibidas pelo ácido clavulânico, um inibidor de β-lactamases. Devido à mudança de dois aminoácidos em relação à OXA-10, alterando uma arginina por uma serina e uma glicina por um aspartato, foi descoberta a primeira enzima OXA considerada uma ESBL, a OXA-11. Outras

variantes de ESBLs surgiram a partir de OXA-10, denominadas de OXA-13, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-19 e OXA-28. Todas estas ESBLs foram encontradas em *Pseudomonas aeruginosa*, sendo raramente encontradas em *E. coli* (Evans and Amyes, 2014).

Cefalosporinases (AmpC) - estas β-lactamases caracterizam-se por ser ativas contra penicilinas, cefalosporinas (podendo hidrolisar cefamicinas), oximino-cefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona) e monobactâmicos (aztreonamo) com a exceção das cefalosporinas de quarta geração e os carbapenems. Estas enzimas são resistentes à combinação de β-lactâmicos com inibidores de β-lactamases. Em *E. coli*, *AmpC* expressa-se de forma constitutiva, isto porque ocorre uma desregulação deste gene localizado no cromossoma bacteriano provocando a síntese desta enzima. Outra via, muito frequente, de adquirir o gene *AmpC* é através dos plasmídeos transferidos horizontalmente por conjugação com outras bactérias (Seral, Gude and Castillo, 2012; Olsen *et al.*, 2014).

3.2.2. Alteração do alvo molecular do antibiótico

Para que um antibiótico seja eficaz terá que se ligar a um alvo específico na bactéria, alvo esse que depende da classe do antibiótico. Uma mudança na estrutura do alvo molecular pode resultar na inativação do antibiótico (Mulvey and Simor, 2009). Estas alterações poderão ser a consequência de mutação num ou mais sítios no gene alvo ou por uma alteração enzimática que diminua a sua afinidade ao antibiótico (Walsh, 2003a).

Um exemplo de resistência causada por alteração do alvo molecular é a resistência às fluoroquinolonas que atuam inibindo a DNA girase e a topoisomerase, essenciais para a replicação bacteriana. Esta resistência é conseguida através de mutações ao nível dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* (Sefton, 2002; Mulvey and Simor, 2009). A resistência às sulfonamidas e ao trimetoprim também se encontram associadas a este mecanismo através de modificações na dihidropteroato sintetase e na dihidrofolato redutase, respetivamente (Sefton, 2002). Finalmente, a metilação de uma adenina no rRNA 23S presente na subunidade ribossomal 50S também poderá ser um mecanismo de defesa da bactéria conferindo resistência às lincosamidas, macrólidos e estreptograminas (Walsh, 2003a).

3.2.3. Permeabilização seletiva

A parede celular de bactérias Gram-negativas consiste numa membrana externa e interna que atuam como uma barreira permeável. Para possibilitar o movimento de moléculas através da membrana externa, as células bacterianas produzem proteínas denominadas de porinas (Mulvey and Simor, 2009).

Em *E. coli*, as porinas presentes na membrana externa que se encontram envolvidas no transporte de antibióticos são as OmpF e as OmpC (Pagès, James and Winterhalter, 2008). Através destas proteínas membranares, apenas moléculas hidrofílicas conseguem atravessá-las por difusão sendo os antibióticos β-lactâmicos, as tetraciclinas, o cloranfenicol e as quinolonas componentes hidrofílicos (Giedraitienė *et al.*, 2011; Blair *et al.*, 2015).

A ocorrência de mutações pode causar modificações nas estruturas das porinas, uma troca no tipo de porina expressa, uma redução do nível de expressão da porina ou uma modificação que implique a perda das propriedades funcionais destas proteínas podem resultar numa barreira capaz de impedir o acesso de antibióticos ao seu alvo molecular e ser a causa de multirresistências bacterianas, nomeadamente às classes de antibióticos referidos anteriormente (Sefton, 2002; Pagès, James and Winterhalter, 2008; Mulvey and Simor, 2009).

3.2.4. Bombas de Efluxo

As bombas de efluxo estão presentes em quase todas as espécies bacterianas e os genes que codificam esta classe de proteínas transmembranares podem localizar-se no cromossoma bacteriano ou no plasmídeo (Mulvey and Simor, 2009; Sun, Deng and Yan, 2014).

A bombas de efluxo são dependentes de energia e podem ser classificadas em cinco famílias: RND (*resistance-nodulation-division*), MFS (*major facilitator superfamily*), ABC (*ATP-binding cassete*), SMR (*small multidrug resistance*) e MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) (Mulvey and Simor, 2009). Estas famílias diferem em termos de conformação estrutural, fonte de energia, variedade de substratos que são capazes de expulsar e o tipo de organismos bacterianos nos quais são distribuídos (Piddock, 2006a). Para bactérias Gram-negativas, as bombas de efluxo associadas à resistência clinicamente significativa são as da família RND, enquanto para as bactérias Gram-positivas, as bombas de efluxo clinicamente significativas são membros da família MFS (Piddock, 2006b).

Dependendo na classe em que se integram podem ser transportadores simples ou um transportador contendo múltiplos componentes: um transportador na membrana interna, um canal na membrana externa e ainda uma proteína no espaço periplasmático. Uma das bombas de efluxo mais bem estudadas, que apresenta esta estrutura tripartida, é a AcrAB-TolC e possibilita a extrusão direta de vários antibióticos do citosol ou do espaço periplasmático para o espaço extracelular (Sun, Deng and Yan, 2014), antes que estes cheguem ao seu alvo molecular (Mulvey and Simor, 2009).

As bombas de efluxo atuam como um mecanismo de resistência a vários antibióticos destacando-se os macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas e β-lactâmicos, através de um processo de superexpressão dos genes que as codificam (Giedraitienė *et al.*, 2011).

Os exemplos mais conhecidos de transportadores em *E. coli* são as bombas de efluxo de tetraciclinas que são codificadas por plasmídeos. As proteínas TET classificadas como transportadores MFS são consideradas o principal mecanismo de resistência para esta classe de antibióticos em bactérias Gram-negativas (Li and Nikaido, 2004), ou seja, quando há a entrada de tetraciclina na célula bacteriana, estas proteínas expulsam o antibiótico usando a troca de protões como fonte de energia (Poole, 2005).

3.3. Genética aplicada à resistência aos antibióticos

A caracterização, a nível genómico, de genes associados à resistência a antibióticos, desempenha um papel fundamental na compreensão e no controlo da propagação de bactérias multirresistentes (Kumar *et al.*, 2011). A aplicação de abordagens, tais como PCR e metagenómica, para o estudo da resistência aos antibióticos no ambiente, permitiu descobrir a grande diversidade de genes de resistência a antibióticos presentes em bactérias (Allen *et al.*, 2010).

Apesar da abundância de fenótipos de resistência observados em bactérias observadas, há um número limitado de mecanismos pelos quais essas características de resistência são adquiridas (Harbottle *et al.*, 2006). A resistência intrínseca ou natural indica uma resistência primitiva das bactérias aos antibióticos. Este tipo de resistência pode resultar da presença de uma barreira de permeabilidade, por modificação dos locais alvo dos antibióticos ou pela indução de genes reprimidos na presença de antibiótico (Spratt and Cromie, 1988). Contudo, na maioria dos casos, a resistência bacteriana aos antibióticos é adquirida, por mutação ou por recombinação genética. As mutações cromossómicas são alterações na sequência de DNA dos cromossomas bacterianos das quais podem resultar a síntese de proteínas alteradas, novas proteínas, ou ainda, alterações na

quantidade de proteína produzida. Também podem ocorrer mutações espontâneas no DNA plasmídico. A resistência adquirida reflete uma modificação na composição genética de uma bactéria, resultando numa falta de eficiência por parte do antibiótico (Sousa, 2006; Pierce, 2012)

A aquisição de genes de resistência envolve elementos genéticos que podem ser divididos em dois grupos: elementos que se conseguem mover entre células bacterianas (plasmídeos e transposões), e elementos que se movem de uma localização genética para outra, dentro da mesma célula (integrões). Alguns elementos genéticos podem conter vários genes de resistência a diferentes classes de antibióticos, de modo a conferir um fenótipo de multirresistência às bactérias que os possuem (Sáenz, 2004; Bennett, 2008).

As alterações genéticas podem ocorrer por meio de mutações - podem causar resistência a um antibiótico ou a um grupo destes; rearranjos intramoleculares - deleções, inversões, duplicações, inserções e transposições na sequência do DNA; ou por inserções de DNA exógeno - por transformação, transdução, conjugação de plasmídeos ou via bacteriófagos (Sousa, 2006; Bennett, 2008). A resistência conferida por estes mecanismos é transmissível às gerações seguintes assim como a outras bactérias, mesmo entre as filogeneticamente distantes, por transferência horizontal de genes (Pierce, 2012).

3.3.1. Plasmídeos

Os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossómico, de cadeia dupla circular, com capacidade autorreplicativa. Estes elementos genéticos podem estar presentes em duas ou mais cópias na célula e o seu tamanho pode variar entre 5 e 400 Kb. Os plasmídeos possuem genes que não são essenciais ao funcionamento bacteriano, mas poderão ter um papel importante no ciclo de vida e crescimento bacteriano conferindo às bactérias uma vantagem adaptativa, ou seja, apesar destes não serem fundamentais para a sobrevivência da bactéria podem conferir novas funções à mesma (Neu *et al.*, 1996; Willey, Sherwood and Woolverton, 2007; Pierce, 2012). Estes elementos genéticos encontram-se distribuídos numa grande diversidade de bactérias devido à sua capacidade de transmissão entre microrganismos por processos de conjugação e de transformação. Os plasmídeos possuem, no seu interior, para além de genes de resistência (Figura 9), genes de replicação, de metabolismos, de fertilidade, de resistência a bacteriocinas e/ou genes de bacteriófagos (Pierce, 2012). A resistência a antibióticos por plasmídeos engloba a maior parte das classes de antibióticos atualmente usadas em uso clínico e inclui resistência a muitos que se

encontram na vanguarda da terapia de antibióticos estando, portanto, amplamente associados na dispersão da resistência a antibióticos entre as bactérias (Bennett, 2008).

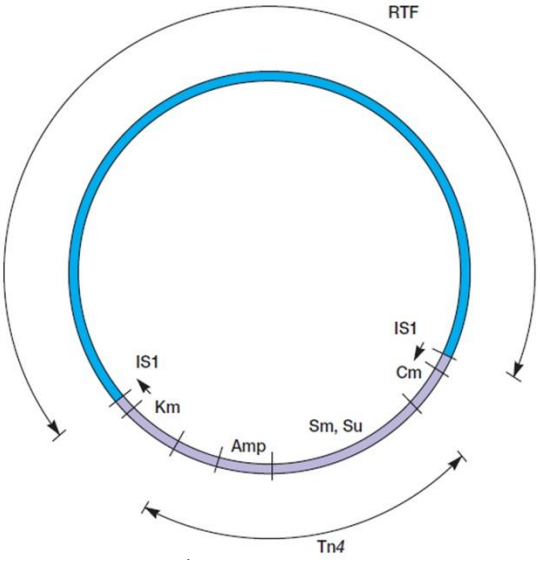


Figura 9: Composição do plasmídeo R. O plasmídeo R transporta genes para resistência a canamicina (Km) e cloranfenicol (Cm). A região RTF no plasmídeo R contém genes que codificam as proteínas necessárias para a replicação e transferência do plasmídeo. O Tn4 está inserido no plasmídeo R e transporta genes que conferem resistência à estreptomicina (Sm) e à sulfonamida (Su). As setas nos genes indicam o sentido da transcrição. Adaptado de Willey, Sherwood and Woolverton, 2007.

3.3.2. Sequências de Inserção e Transposões

As sequências de inserção (IS) e os transposões são sequências de DNA linear, presentes nos cromossomas ou plasmídeos, que possuem a capacidade de se translocar de uma molécula de DNA para outra ou, dentro da mesma molécula de DNA através de um processo chamado transposição (recombinação específica) não possuindo a capacidade de se autorreplicar (Holmes and Jobling, 1996; Sáenz, 2004).

As sequências de inserção (Figura 10) têm, normalmente, um tamanho compreendido entre 700 e 2500 bp e são flanqueadas por sequências nucleotídicas repetitivas invertidas (IR) (10-40 bp) e por sequências curtas de repetição direta (DRs) (2-14 bp) (Siguier, Gourbeyre and Chandler, 2014). A transposase, enzima responsável pela transposição, é codificada por um gene que se localiza na IS reconhece as IRs e repetições idênticas noutros locais do cromossoma. Esta excisa os fragmentos de DNA da localização original e insere-os num novo local, promovendo a

transferência de genes de resistência aos antibióticos. Os elementos de inserção podem ser introduzidos em genes, interrompendo a sua sequência codificante e inativando a expressão desse gene (Sáenz, 2004; Sousa, 2006).

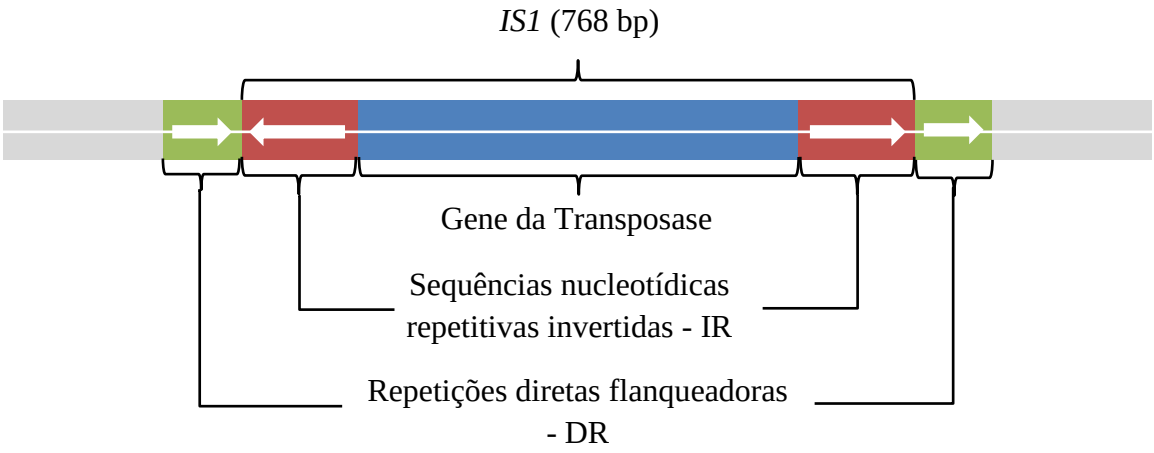


Figura 10: A IS1 tem 768 pares de bases (bp) de comprimento, contém o gene da transposase com sequências nucleotídicas repetitivas invertidas (IR) de 23 bp em cada extremidade do gene, e é flanqueada por repetições diretas (DR) de 9 bp. Adaptado de Pierce, 2012.

Os transposões (Figura 11-A) possuem entre 2,5 a 60 kb e na sua constituição está presente um gene que codifica uma transposase funcional, genes acessórios capazes de conferir uma vantagem fenotípica ao seu hospedeiro bacteriano (resistências a antibióticos, metais pesados entre outras) e, nas extremidades, sequências repetitivas invertidas (Darmon and Leach, 2014). Os transposões compostos (Figura 11-B) contêm vários genes, nomeadamente de resistência aos antibióticos, flanqueados por dois elementos IS. 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 (Sáenz, 2004; Sousa, 2006; Madigan *et al.*, 2009).

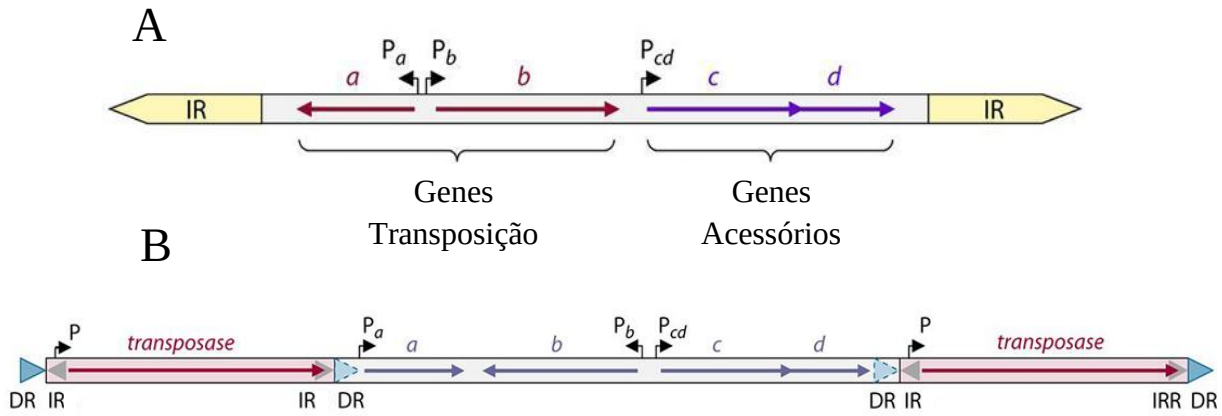


Figura 11: Constituição de diferentes transposões. (A) Organização típica de um transposão. Sequências repetitivas invertidas (IR) flanqueiam os genes funcionais. (B) Organização típica de um transposão composto. A sequência é transposta juntamente com dois elementos IS que o flanqueiam (aqui os ISs estão numa orientação direta, mas podem ser invertidos). Pelo menos uma das transposases precisa de estar ativa. Os DRs internos dos elementos IS podem estar ausentes. Adaptado de Darmon and Leach, 2014.

3.3.3. Integrões

Os integrões são elementos genéticos que permitem a integração e expressão de cassetes génicas codificando genes de resistências a antibióticos (Hansson *et al.*, 2002). Estes não são considerados elementos móveis e como tal apenas são transferidos de bactéria para bactéria através de transposões ou plasmídeos (Kargar *et al.*, 2014). Um integrão (Figura 12) é constituído por uma parte estável e por uma parte variável. A parte estável está integrada no genoma do hospedeiro ou num plasmídeo e é composta por um gene que codifica uma integrase (*intI*) e o seu promotor (P_{intI}), assim como, um local de recombinação primário, *attI*, que se encontra *upstream* do gene *intI*, e o seu promotor (P*c*), localizado no gene *intI* ou no local de recombinação *attI*. A parte variável é formada por cassetes génicas sendo cada uma composta por um gene, sendo na sua maioria de resistência a antibióticos, e um local de recombinação *attC* (Darmon and Leach, 2014). A enzima IntI reconhece a sequência *attC* e, através do local recetor *attI*, permite a integração das cassetes de resistência. Este é, então, classificado como um sistema de captura de genes (Sáenz *et al.*, 2004; Sousa, 2006).

Os integrões podem dividir-se em diferentes classes de acordo com a sequência nucleotídica do gene *intI* sendo que apenas as classes 1, 2, 3 e 9 possuem cassetes génicas com genes codificadores de resistência aos antibióticos, das quais as mais comuns em bactérias resistentes são as classes 1 e 2 (Sáenz *et al.*, 2004; Barlow and Gobius, 2006).

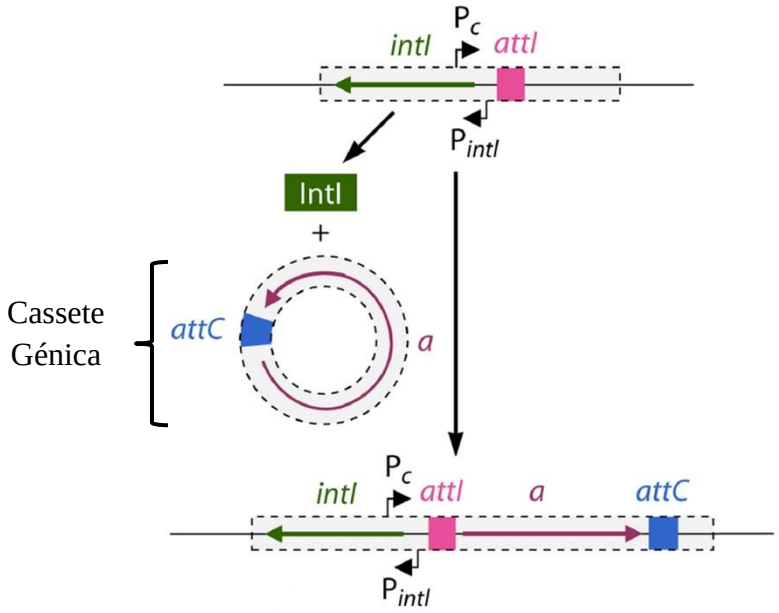


Figura 12: Integração de uma cassete génica na parte estável de um integrão. O *intI* medeia a recombinação entre o local *attC* da cassete génica e o local *attI* do integrão, para que a cassete possa ser integrada atras do promotor P*c*, permitindo a expressão génica. Adaptado de Darmon and Leach, 2014.

4. Metagenómica

A metagenómica é a técnica, ou o conjunto de técnicas, cujo objetivo é determinar a população microbiana que pode ser encontrada num determinado ambiente, estudada no contexto da sua comunidade. Para tal, são usadas técnicas de sequenciação massiva, ou técnicas de *Next Generation Sequencing* (NGS), devido às dificuldades presenciadas pelas técnicas tradicionais quando usadas para transferir todos os microrganismos presentes num ambiente para o laboratório (Garrido-Cardenas and Manzano-Agugliaro, 2017).

Durante muito tempo, as únicas técnicas disponíveis para estudar os microrganismos eram de natureza morfológica ou relacionadas com o crescimento. Estas limitavam a visão do mundo microbiano, no entanto foram utilizadas até ao aparecimento de técnicas moleculares e da sequenciação de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Outras técnicas como a clonagem e a hibridação *in situ* fluorescente (FISH), assim como o uso de marcadores moleculares também ajudaram a entender melhor o mundo dos microrganismos (Garrido-Cardenas and Manzano-Agugliaro, 2017). Assim, torna-se necessário o surgimento de uma técnica, ou conjunto de técnicas, que permitam o estudo da diversidade microbiana de um determinado ambiente a partir da extração do material genético dos mesmos sem a necessidade de recorrer à cultura dos microrganismos no laboratório. E assim surgiu a metagenómica, uma disciplina muito recente, que tenta responder a esta

necessidade através de técnicas não tradicionais (Garrido-Cardenas and Manzano-Agugliaro, 2017). Hoje em dia, a metagenómica, cujo objetivo fundamental é o estudo dos organismos no contexto da sua comunidade, pode ser compreendida de dois pontos de vista diferentes: o primeiro é do ponto de vista filogenético, para o qual é estudado o DNA do rRNA 5S e 16S com a finalidade de identificar os membros de um ambiente e o segundo é do ponto de vista funcional, para o qual diferentes enzimas e produtos metabólicos são estudados com a finalidade de identificar os genes funcionais (Morgan, Segata and Huttenhower, 2013; Garrido-Cardenas and Manzano-Agugliaro, 2017).

Desde o primeiro trabalho com dados metagenómicos apresentados (Rondon *et al.*, 2000), até aos dias de hoje, múltiplos trabalhos foram publicados. Isto deve-se ao aparecimento de tecnologias de sequenciação de DNA de alta produtividade e também ao desenvolvimento de ferramentas bioinformáticas, que facilitam o *assembly* dos dados obtidos na sequenciação e a atribuição de fragmentos de material genético obtidos de um dado organismo através de um processo chamado *binning* (Sharon *et al.*, 2013). Tanto a sequenciação massiva como a bioinformática provaram ser ferramentas poderosas que conseguem gerar, a um preço relativamente baixo, uma grande quantidade de informação (Hiraoka, Yang and Iwasaki, 2016).

5. Tecnologias de Sequenciação

5.1. Sequenciação de Sanger

Na década de 1970, Sanger e seus colegas (Sanger, Nicklen and Coulson, 1977) assim como e Gilbert (Maxam and Gilbert, 1977) desenvolveram métodos para sequenciar o DNA por técnicas de terminação e fragmentação da cadeia de DNA, respetivamente. Esta descoberta revolucionou a biologia pois providenciou as ferramentas necessárias para decifrar genes completos e, mais tarde, até mesmo genomas inteiros. Esta técnica desenvolvida por Sanger e seus colegas, comumente chamada de Sequenciação de Sanger, requer um menor manuseamento de produtos químicos tóxicos e radioisótopos que o método de Maxam e Gilbert e produz sequências de DNA de alta qualidade relativamente longas (500-1000 bp) (van Dijk *et al.*, 2014; Besser *et al.*, 2018). O primeiro genoma a ser sequenciado com a técnica de sequenciação de Sanger foi do bacteriófago Phi-X174 (Sanger *et al.*, 1977) que contém apenas 5386 nucleótidos distribuídos em 11 genes, no entanto esta sequenciação tornou-se num importante marco na história da ciência (Garrido-Cardenas *et al.*, 2017). Desde então, os genomas de um grande número de espécies foram

sequenciados até que o primeiro esboço do genoma humano foi apresentado em 2001 (Lander *et al.*, 2001).

Primeiro, milhões de cópias da sequência a ser determinada são purificadas ou amplificadas, dependendo da fonte da sequência. De seguida é realizada a síntese da cadeia reversa nestas cópias usando um *primer* de sequência conhecida *upstream* da sequência a ser determinada juntamente com uma mistura de desoxinucleótidos (dNTPs) e didesoxinucleótidos (ddNTP, nucleótido modificados sem um grupo hidroxil no terceiro átomo de carbono da molécula de açúcar). A mistura dNTP/ddNTP causa a terminação aleatória e não reversível da reação de extensão, criando fragmentos de DNA com diferentes tamanhos. Após a desnaturação e a lavagem dos nucleotídeos não adicionados, dos *primers* e das enzimas, é realizada a separação dos fragmentos de DNA resultantes pelo seu peso molecular (correspondente ao ponto de terminação). O fluoróforo ligado aos ddNTPs de terminação [quatro diferentes fluoróforos, um por nucleótido (A, C, G e T)] é lido sequencialmente na ordem criada pela etapa de separação dos fragmentos de DNA (Figura 13) (Kircher and Kelso, 2010).

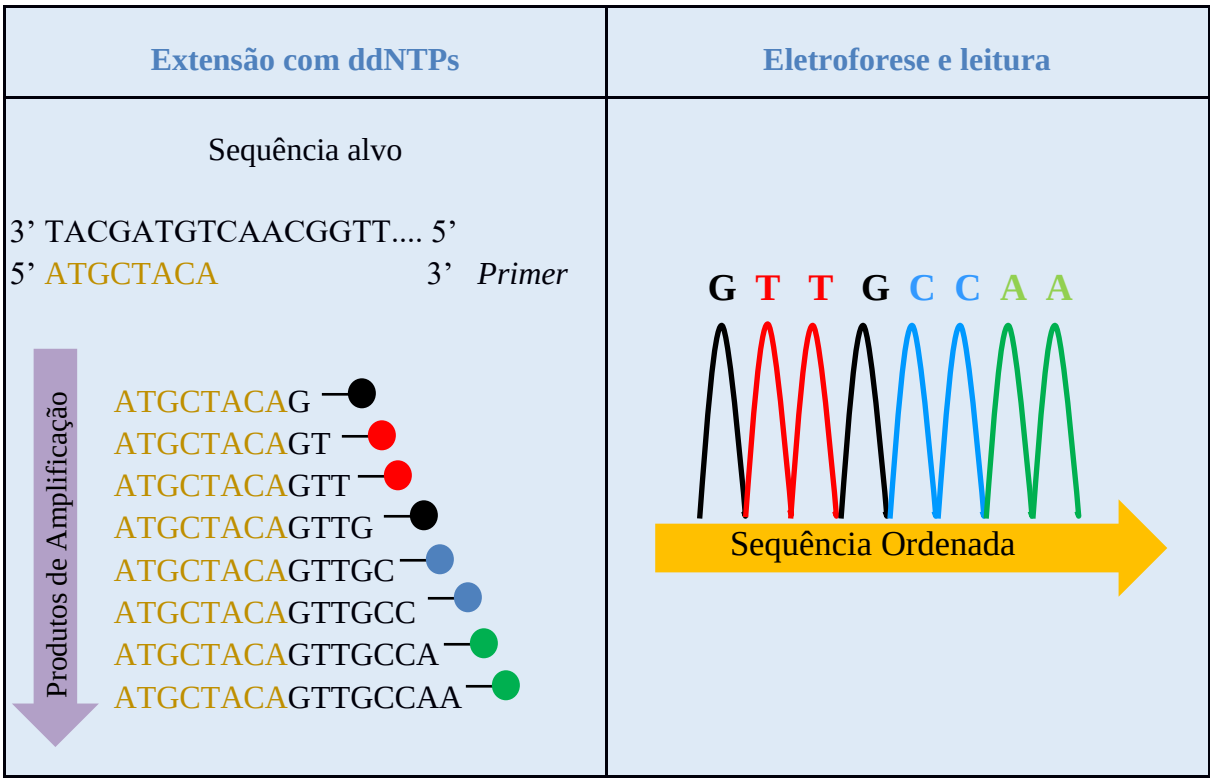


Figura 13: Representação esquemática do processo se sequenciação de Sanger. Adaptado de Garrido-Cardenas *et al.*, 2017.

A separação por peso molecular foi, originalmente, realizada por eletroforese em gel, mas atualmente é realizada por eletroforese capilar (Swerdlow and Gesteland, 1990; George *et al.*, 1997). A deteção do sinal emitido pelo fluoróforo, quando este é excitado por um laser no fim do capilar, é realizada por um sensor e, posteriormente, um software traduz este sinal na base nucleotídica. No final é obtido um ficheiro que mostra a sequência de DNA num colorido eletroferograma (Kircher and Kelso, 2010; Garrido-Cardenas *et al.*, 2017).

No entanto, foi necessário desenvolver novas tecnologias, devido às abordagens ambiciosas dos projetos de sequenciação massiva, como o projeto do genoma humano, que iriam reduzir os custos e o tempo necessário para obter uma sequência (Metzker, 2010; Mardis, 2013). Assim, surgiu uma tecnologia de alta performance, a *Next Generation Sequencing*. Esta baseia-se no processo de paralelização de sequenciação, resultando na leitura de milhares ou mesmo milhões de sequências ao mesmo tempo (Hall, 2007). Até aos dias de hoje, existem várias plataformas de sequenciação massivas (Tabela 1), cujas diferenças se encontram nos métodos de preparação dos *templates* para a sequenciação, na reação de sequenciação em si, e nos sistemas utilizados para a detenção (Reuter, Spacek and Snyder, 2015). Estas plataformas têm custos diferentes para cada reação de sequenciação devido aos diferentes equipamentos utilizados, aos diferentes níveis de performance e aos diferentes números de leituras que realizam (Goodwin, McPherson and McCombie, 2016).

Tabela 1: Plataformas de sequenciação massiva disponíveis hoje em dia

<table>
<tr><th colspan="3">Métodos de Sequenciação de DNA</th><th>Plataforma</th></tr>
<tr><td rowspan="6">Sequenciação de reads pequenos</td><td colspan="2" rowspan="2">Sequenciação por ligação</td><td>AB SOLiD</td></tr>
<tr><td>Complete Genomics</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Sequenciação por síntese</td><td rowspan="2">Terminação reversível cíclica (CRT)</td><td>Illumina</td></tr>
<tr><td>GeneReader</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Adição de um único nucleótido (SNA)</td><td>454 Roche</td></tr>
<tr><td>Ion Torrent</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Sequenciação de reads longos</td><td colspan="2" rowspan="2">Sequenciação em tempo real de molécula única (SMRT)</td><td>Pacific Bioscence</td></tr>
<tr><td>Oxford Nanopore</td></tr>
</table>

Desta forma, não há dúvida que o desenvolvimento de todas estas tecnologias se encontra lado a lado dos novos sistemas de deteção de sinais e sensores cuja sensibilidade continuou a crescer (van Dijk *et al.*, 2014).

5.2. Plataforma *454 Roche*

A pirosequenciação da *Roche 454* foi o primeiro equipamento NGS a ser comercializado e nesta tecnologia o DNA é sequenciado por síntese usando a abordagem SNA (Hyman, 1988; Balzer *et al.*, 2010). Um segmento de DNA é amplificado, por PCR de emulsão, e a cadeia que servirá como *template* para a pirosequenciação é biotinilada. Depois da desnaturação, a cadeia simples amplificada que se encontra biotinilada é isolada permitindo a hibridação dos *primers* de sequenciação. De seguida, o *primer* hibridado e a cadeia simples *template* são incubados com as enzimas DNA polimerase, ATP sulfurilase, luciferase e apirase, bem como os substratos adenosina 5' fosfossulfato (APS) e luciferina. Posteriormente, a DNA polimerase adiciona apenas um tipo de dNTPs e se forem complementares com o *template*, estes são incorporados. Cada incorporação de um dNTP é acompanhada pela libertação de uma molécula de pirofosfato (PPi) numa quantidade equimolar à quantidade de nucleótidos incorporados. A ATP sulfurilase converte o PPi em ATP na presença do APS. Este ATP acompanha a conversão da luciferina em oxiluciferina, mediada pela luciferase, que gera luz visível em quantidades proporcionais à quantidade de ATP (Figura 14-A). A luz produzida por esta reação é detetada por um sensor, chamado c*harge coupled device* (CCD), vista como um pico (pirograma) e pode ser atribuída à incorporação de uma ou mais bases nucleotídica (Goodwin, McPherson and McCombie, 2016). A apirase, uma enzima que degrada nucleótidos, continuamente degrada os nucleótidos que não foram incorporados assim como o ATP. Quando a degradação estiver completa outro dNTP é incorporado. A adição de dNTPs é realizada sequencialmente e à medida que a reação continua, a cadeia complementar é sintetizada e a sequência de nucleótidos é determinada pelos picos luminosos presentes no pirograma (Figura 14-B) (QIAGEN, 2013).

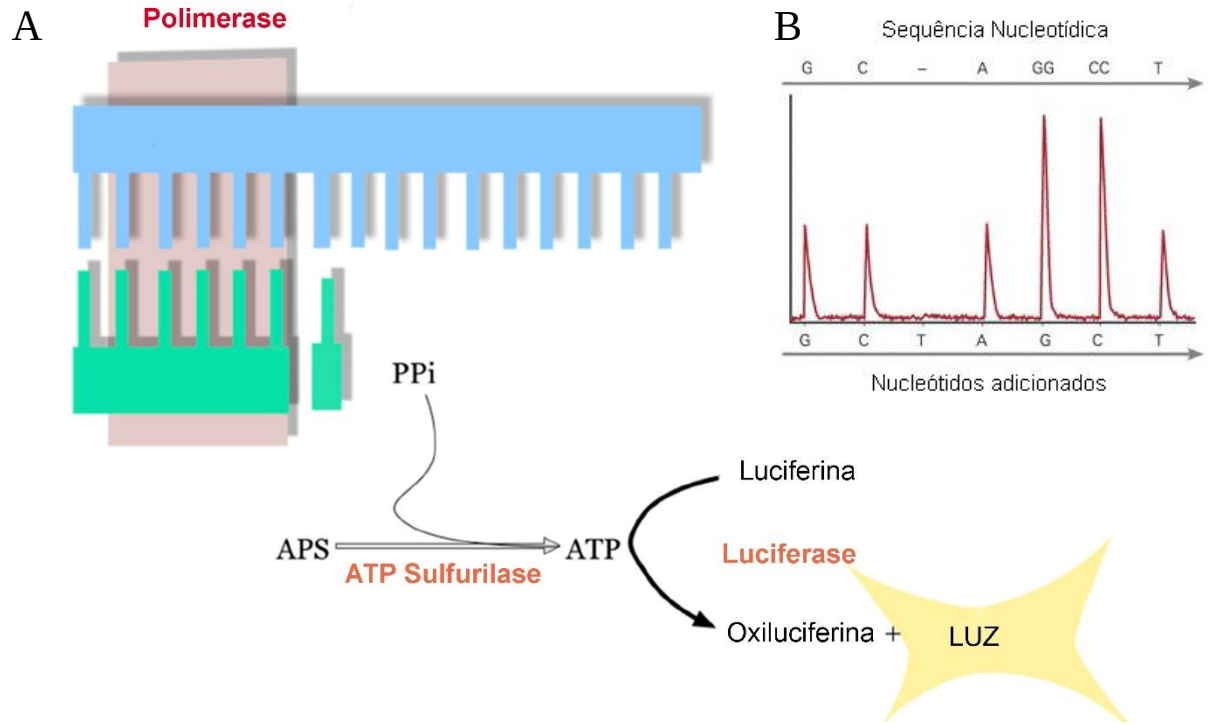


Figura 14: Reação de transformação da luciferina em oxiluciferina, com libertação de luz. (A) O ATP é gerado pela ATP sulfurilase a partir do APS, na presença de pirofosfato, que é utilizado como cofactor. Cadeia *template* a azul; *Primer* a verde; DNA polimerase a rosa. (B) Pirograma. A altura de cada pico corresponde ao número de nucleótidos incorporados. Adaptado de Garrido-Cadernas *et al.*, 2017.

5.3. Plataforma *Ion Torrent*

A plataforma *Ion Torrent* foi a primeira plataforma NGS sem sensores óticos (Rothberg *et al.*, 2011). Em vez de usar uma cascata enzimática para gerar um sinal, esta plataforma deteta os iões H^+ que são libertados à medida que cada dNTP é incorporado (Figura 15). Assim, pela primeira vez, a tecnologia utilizada para sequenciar o DNA elimina tanto o *scan* ótico como o uso de dNTPs com fluoróforos incorporados (Singh, 2015).

Após a ligação do DNA a *beads* e a sua amplificação por PCR de emulsão, as *beads* são cuidadosamente colocadas numa placa de microtitulação onde uma *bead* ocupa um único poço. De seguida, é adicionado, nos poços, um tipo de nucleótidos e a reação de extensão ocorre normalmente. À medida que cada base é incorporada é libertado um ião H^+ (Merriman, Torrent and Rothberg, 2012). Esta libertação resulta na alteração de 0,02 unidades de pH, detetada por um aparelho composto por dois elementos, um *complementary metal-oxide semiconductor* (CMOS) (Li *et al.*, 2017) e um *ion-sensitive field-effect transistor* (ISFET) (Toumazou and Georgiou, 2011).

Após a introdução de um tipo específico de nucleótidos, os que não foram incorporados são lavados e outro tipo específico de nucleótidos é adicionado (Goodwin, McPherson and McCombie, 2016).

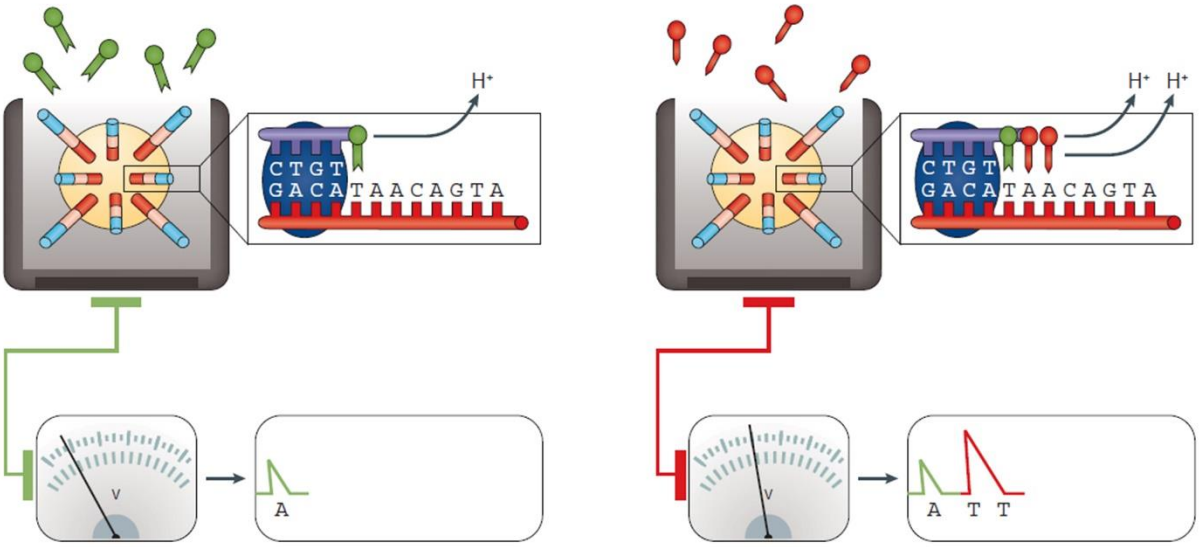


Figura 15: Plataforma *Ion Torrent*. Quando uma base é incorporada, um único ião H + é libertado sendo detetado por um sensor CMOS-ISFET. Apenas um tipo de dNTPs está presente durante cada ciclo; vários dNTPs idênticos podem ser incorporados durante um ciclo, aumentando os iões libertados. Adaptado de Goodwin, McPherson and McCombie, 2016.

Os sequenciadores da plataforma *Ion Torrent* apresentam alguma versatilidade, uma vez que existem vários tipos de *chips* que se adaptam às dimensões de cada projeto. Assim, podem ser encontrados *chips* que produzam dados desde os 50Mb até aos 15Gb. Os que produzem uma maior quantidade de dados, a sequenciação pode demorar cerca de 7 horas, enquanto os *chips* que produzam uma quantidade menor de dados, a sequenciação pode demorar apenas 2 horas, sendo esta uma das vantagens desta plataforma (Garrido-Cardenas *et al.*, 2017).

5.4. Plataforma *AB SOLiD*

A plataforma *SOLiD* (sequenciação por ligação e deteção de oligonucleótidos), assim como a sequenciação de Sanger, é baseada na deteção de sinais de fluorescência sendo que uma das diferenças entre ambas é que na sequenciação de Sanger um fluoróforo é utilizado por cada nucleótido e na sequenciação *SOLiD* um fluoróforo é utilizado para uma determinada combinação de dois nucleótidos. Isto é, cada sinal de fluorescência representa a ligação de dois nucleótidos. Assim, os dados obtidos não podem ser traduzidos numa sequência de nucleótidos conhecida,

porque cada um dos quatro sinais refere-se a um subconjunto de quatro combinações possíveis de nucleotídeos (Garrido-Cardenas *et al.*, 2017).

O processo de sequenciação começa com a ligação dos fragmentos de DNA a adaptadores sendo de seguida ligados a *beads* e amplificados por PCR de emulsão. As *beads* com o DNA *template* amplificado são imobilizadas numa *flow cell* e a sequenciação inicia-se com a ligação de um *primer* complementar ao adaptador presente no *template* (Figura 16). Esta metodologia baseia-se na ligação sequencial de sondas fluorescentes (Valouev *et al.*, 2008). Cada sonda é um octâmero, que consiste em (na direção 3' para 5') 2 bases específicas da sonda, seguidas por 6 bases degeneradas (nnnzzz) com um dos 4 fluoróforos existentes ligados à extremidade 5'. As 2 bases específicas da sonda consistem numa das 16 combinações possíveis de 2 bases (Figura 16-A), sendo possível, no fim, determinar qual nucleótido ocupa cada posição graças à técnica conhecida por *color-space coding* (Li and Homer, 2010). Assim, primeiramente ocorre a ligação de uma sonda adjacente ao *primer* que se encontra na posição *n*. Após esta ligação o fluoróforo emite sinal para, de seguida, ser clivado juntamente com as 3 base adjacentes a ele. A extremidade 5' da sonda clivada é fosforilada antes da ligação da próxima sonda. Ao fim de 7 etapas de ligação de sondas, ou seja, ao fim de um ciclo, a cadeia sintetizada é desnaturada e um novo *primer* é ligado à cadeia *template*, no entanto, na posição *n-1* (Figura 16-B). No total, 5 ciclos são realizados e em cada um o *primer* é ligado numa posição atrás (*n-2*; *n-3*; *n-4*) (Salmela, 2010). No final, a sequência é inferida pela interpretação dos resultados da ligação das 16 possíveis sondas. Com o uso de primers em posições diferentes em cada ciclo, várias bases do adaptador são sequenciadas. Essas informações fornecem um ponto de partida de referência da sequência que é usado em conjunto com a técnica *color-space coding* para descodificar, algoritmicamente, a sequência *downstream* do adaptador (Voelkerding, Dames and Durtschi, 2009).

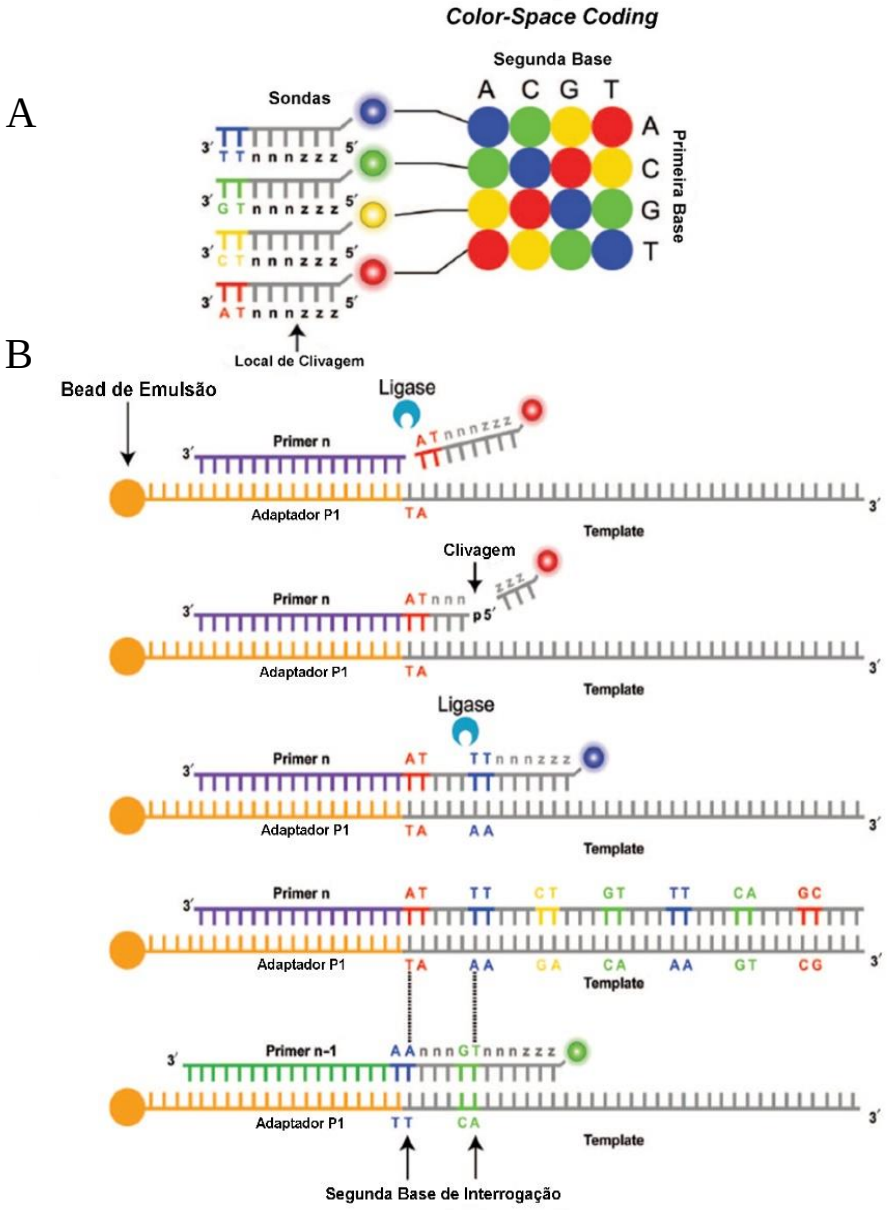


Figura 16: Uso da técnica *color-space coding* na determinação da ordem dos nucleótidos por ligação sequencial de sondas fluorescentes. (A) Cada sonda é um octâmero, que consiste em (na direção 3' para 5') 2 bases específicas da sonda, seguidas por 6 bases degenera degeneradas (nnnzzz) com um dos 4 fluoróforos existentes ligados à extremidade 5'. As 2 bases específicas da sonda consistem numa das 16 combinações possíveis de 2 bases. (B) Ao adaptador P1 e ao *template* com o *primer* (n) são ligadas sondas representando as 16 combinações possíveis de 2 bases. Neste exemplo, as duas bases específicas complementares ao *template* são AT. Após o *annealing* e a ligação da sonda, a fluorescência é registada antes da clivagem das últimas 3 bases da sonda degenerada. A extremidade 5' da sonda clivada é fosforilada (não mostrada) antes da ligação da próxima sonda. *Annealing* e ligação da próxima sonda. Extensão completa do *primer* (n) até ao primeiro ciclo consistido por 7 ciclos de ligação. A nova cadeia, a partir do *primer* (n), é desnaturada a partir do adaptador/*template* e o segundo ciclo de sequenciação é realizado com o *primer* (n-1). Adaptado de Voelkerding, Dames and Durtschi, 2009.

A plataforma *Complete Genomics* (CG), criada em 2006, utiliza uma variação desta última técnica. As duas novidades que esta plataforma apresentou em relação às outras plataformas na altura existentes foram o uso de nanoesferas de DNA (DNBs) e a técnica de ligação que ocorre por *combinatorial probes anchor ligation*, cPAL (Garrido-Cardenas *et al.*, 2017).

Na formação das DNBs, o DNA é fragmentado e ligado ao primeiro de quatro adaptadores. O *template* é amplificado, circularizado e clivado por uma endonuclease tipo II. O segundo adaptador é adicionado, seguido pela amplificação, circularização e clivagem. Este processo é repetido para os dois restantes adaptadores. O produto final é um *template* circular com quatro adaptadores, cada um separado por uma sequência *template*. As bibliotecas moleculares passam por uma etapa de amplificação por *rolling circle* formando as nanoesferas de DNA, que são depois depositadas na *flow cell* (Goodwin, McPherson and McCombie, 2016).

Depois da deposição das DNBs, uma âncora, complementar a um dos adaptadores, e uma sonda marcada com um fluoróforo são ligadas a cada DNB. As bases que formam a sonda são degeneradas exceto a que se encontra na primeira posição. A âncora e a sonda são então ligadas na posição é capturada a imagem para identificar a primeira base na extremidade 3' ou na 5' da âncora. De seguida, o complexo sonda-âncora é removido e o processo recomeça com a mesma âncora, mas uma sonda diferente em que a base conhecida se encontra na posição *n+1*. Isto repete-se até que cinco bases da extremidade 3' da âncora e cinco bases da extremidade 5' da âncora sejam identificadas. Outro ciclo de hibridação ocorre, desta vez, usando âncoras com um deslocamento de 5 bases de distância do primeiro ciclo, identificando cindo bases adicionais de cada lado da âncora. Finalmente, todo este processo é repetido para cada um dos restantes adaptadores na DNB, formando *pair-end reads* de 100bp (Goodwin, McPherson and McCombie, 2016; Garrido-Cardenas *et al.*, 2017).

5.5. Plataforma *Illumina*

Na plataforma *Illumina*, o DNA é sequenciado por síntese usando a abordagem conhecida como terminação reversível cíclica (CRT) (Morozova, Hirst and Marra, 2009; Metzker, 2010). O processo de sequenciação começa com a preparação da amostra de DNA e a amplificação do mesmo, sendo este processo conhecido como *bridge amplification*.

Na *bridge amplification*, o DNA fragmentado é ligado a adaptadores e emparelhado a um *primer* imobilizado um suporte sólido, tal como uma *flow cell*. A extremidade livre pode interagir

com outros *primers* próximos, formando a estrutura em formato de ponte. Com o PCR, a nova cadeia é formada a partir dos primers imobilizados e o DNA não emparelhado é removido. Após vários ciclos de amplificação entre 100 e 200 milhões de *clusters* de DNA são formados (Figura 17-A) (Mardis, 2008; Goodwin, McPherson and McCombie, 2016).

Depois desta etapa, uma mistura de *primers*, DNA polimerase e nucleótidos modificados são adicionados à *flow cell*. Cada nucleótido é bloqueado por um grupo 3'-O-azidometil e é-lhe adicionado um fluoróforo removível, específico da base. Durante cada ciclo, apenas um nucleótido é incorporado no *cluster* pois o grupo 3' bloqueado impede a incorporação de nucleótidos adicionais. Posteriormente à incorporação das bases, as que não foram incorporadas são lavadas e é capturada a imagem pelo sistema de deteção, chamado *Total Internal Reflection Fluorescence* (TIRF) (Axelrod, 2001); a cor capturada identifica a base que foi incorporada em cada *cluster*. O fluoróforo é então clivado e o grupo 3'-OH é regenerado com o agente redutor tris-(2-carboxietil)-fosfina (TCEP) (Bentley *et al.*, 2008). O ciclo de adição, extensão e clivagem de nucleótidos pode, assim, recomeçar (Figura 17-B) (Goodwin, McPherson and McCombie, 2016).

Este mesmo sistema de deteção é usado pela plataforma *Qiagen GeneReader*, que foi lançada em 2015. A grande contribuição e vantagem desta plataforma é que ela destina-se a ser uma plataforma NGS tudo-em-um (Srinivasan and Batra, 2014), desde a preparação das amostras até à análise dos resultados (Peyro-Saint-Paul and Hermitte, 2013).

Esta plataforma usa, basicamente a mesma metodologia que a plataforma *Illumina*. Após PCR de emulsão uma mistura de *primers*, DNA polimerase e nucleótidos modificados são adicionados à *flow cell*. Cada nucleótido é bloqueado por um grupo 3'-O-alilo e apenas algumas bases são marcadas com um fluoróforo removível, específico da base. Posteriormente à incorporação das bases, as que não foram incorporadas são lavadas e é capturada a imagem pelo sistema de deteção, TIRF. O fluoróforo é então clivado e o grupo 3'-OH é regenerado com uma mistura entre o agente redutor paládio e $P(PhSO_3Na)_3$ (Goodwin, McPherson and McCombie, 2016).

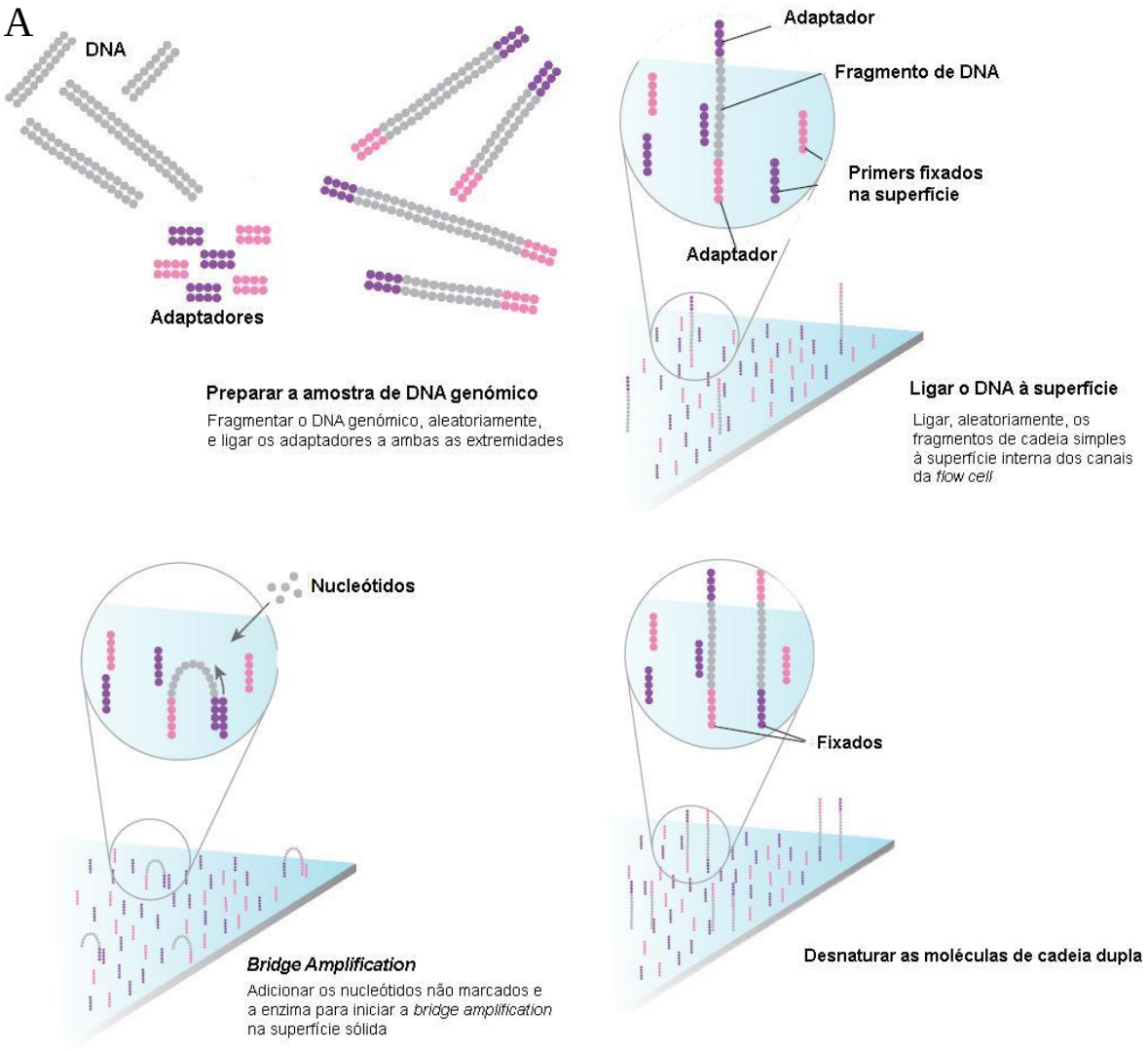


Figura 17: Sequenciação por síntese *Illumina*. Nos *clusters* criados pela *bridge amplification* são colocados os *primers*, todos os quatro nucleótidos marcados com fluorescência e os nucleótidos bloqueados em 3'-OH são adicionados à *flow cell* com a DNA polimerase. Após o passo de incorporação, os nucleótidos não utilizados são lavados e o sistema de deteção captura a imagem. Uma vez concluída a aquisição de imagens, o fluoróforo é então clivado e o grupo 3'-OH é regenerado. Um novo ciclo de incorporação de nucleótidos fluorescentes começa. Os dados são alinhados e comparados a uma referência, e as diferenças de sequenciação são identificadas. Adaptado de Mardis, 2008.

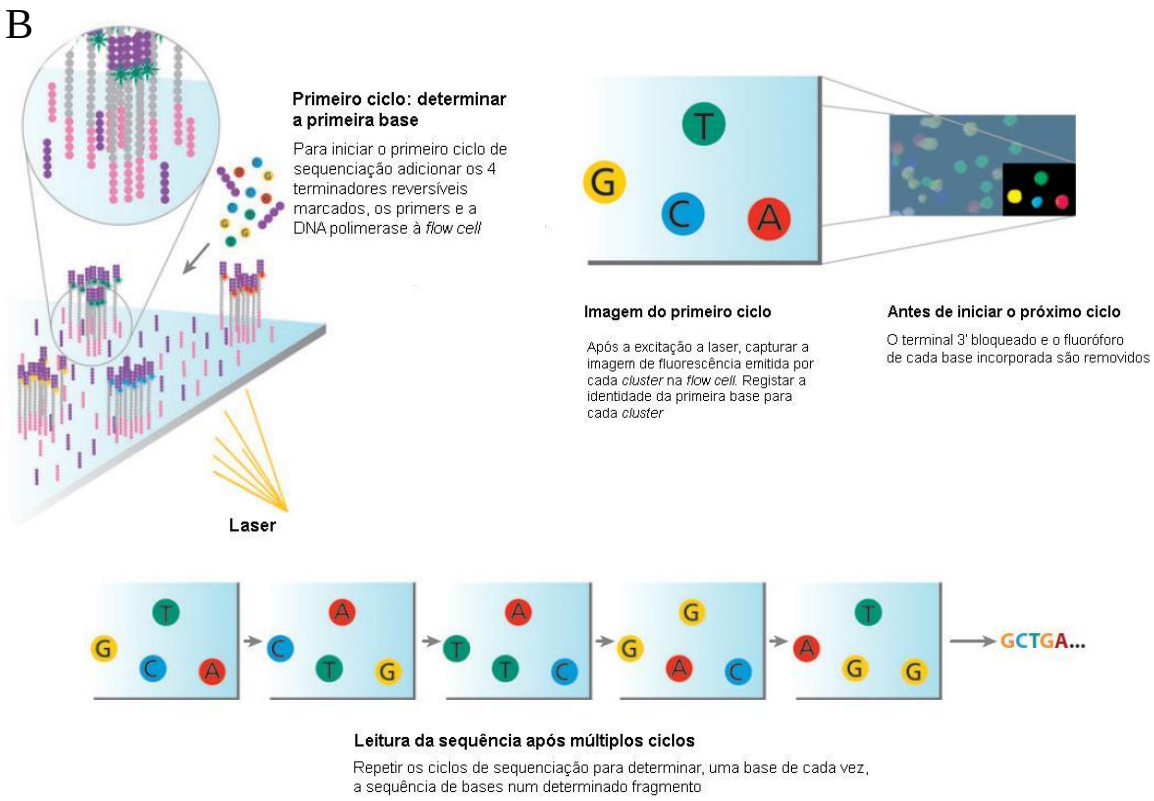


Figura 17: Continuação

5.6. Plataforma *Pacific Bioscience*

Atualmente, a plataforma de sequenciação de reads longos mais utilizada é a abordagem de sequenciação em tempo real (SMRT) usada pela plataforma *Pacific Bioscience* (PacBio) (Eid *et al.*, 2009) (Figura 18). Esta tecnologia utiliza uma *flow cell* com milhares de poços cujo fundo está coberto por sensores chamados *zero-mode waveguide* (ZMW) (Levene *et al.*, 2003). Enquanto que as tecnologias que usam sequenciação por síntese fixam a molécula de DNA *template* numa superfície sólida, permitindo o movimento da polimerase, na plataforma PacBio a polimerase está fixa no fundo do poço permitindo o movimento da cadeia de DNA através do ZMW (Goodwin, McPherson and McCombie, 2016).

Assim, a sequenciação inicia com a ligação dos fragmentos do DNA *template* a adaptadores em forma de *hairpin* em cada extremidade do fragmento, resultando numa molécula de DNA circular com regiões de DNA de cadeia simples constantes nas extremidades e o DNA *template* de cadeia dupla no meio, também chamado de *SMRTbell* (Figura 18-A). Este *SMRTbell* resultante é submetido a um protocolo de seleção de tamanho, no qual, fragmentos muito grandes ou muito

pequenos são removidos para garantir uma sequenciação eficiente. Os *primers* e a DNA polimerase são ligados às regiões de cadeia simples do *SMRTbell*. Os nucleótidos marcados com fluoróforos são então adicionados ao ZMW e a polimerase incorpora-os na cadeia de DNA (Figura 18-B). Durante a incorporação, o nucleótido para, momentaneamente, no ZMW permitindo que o sistema de câmaras e lasers registe a cor e a duração da luz emitida (Figura 18-C) (Lundquist *et al.*, 2008). A polimerase cliva o fluoróforo ligado ao dNTP durante a incorporação, permitindo que este se difunda da área do sensor antes que o próximo dNTP seja incorporado (Goodwin, McPherson and McCombie, 2016).

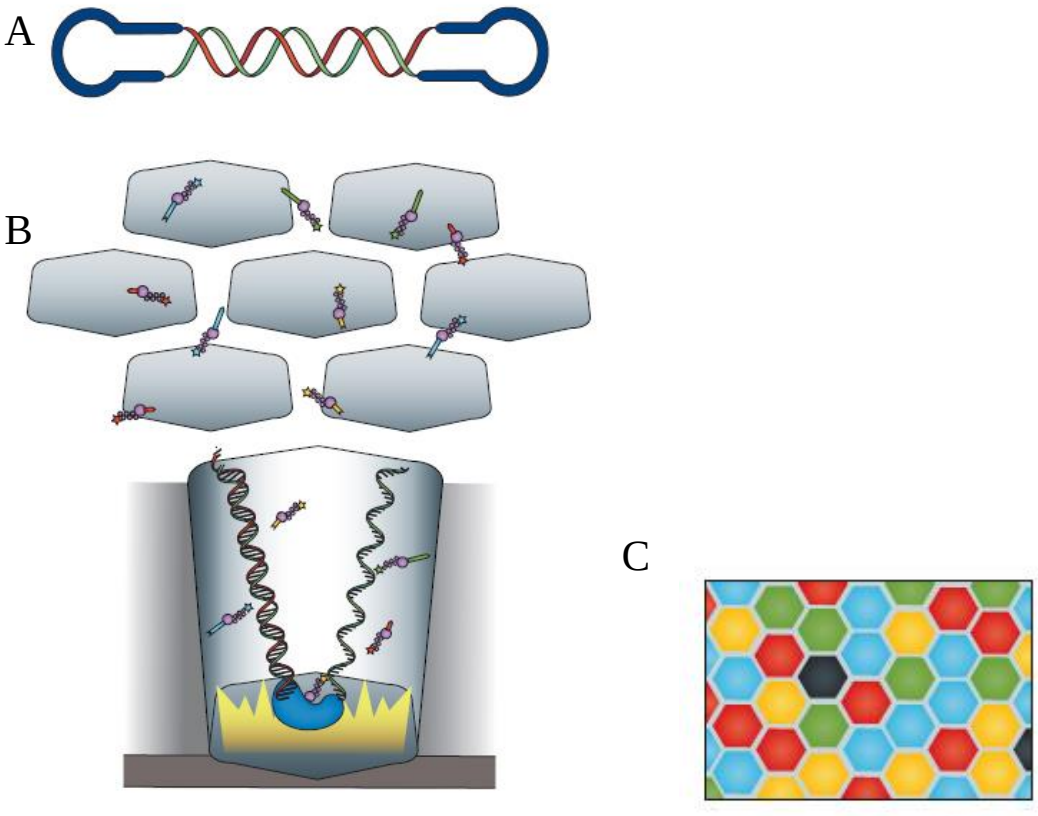


Figura 18: Plataforma *Pacific Bioscience*. (A) *SMRTbell*. Dois adapatadores em forma de *hairpin* permitem a sequenciação circular contínua. (B) ZMW são os locais onde ocorre a sequenciação e à mediada que um nucleótido é incorporado, a câmara regista a luz emitida. (C) PacBio output. Uma câmara regista as alterações de cor de todos os ZMW. Cada mudança de cor corresponde a uma base. Adaptado de Goodwin, McPherson and McCombie, 2016.

5.7. Plataforma *Oxford Nanopore*

Outra plataforma que também usa a sequenciação do DNA em tempo real a partir de uma única molécula é a plataforma *Oxford Nanopore* (Eisenstein, 2017) Ao contrário de outras plataformas, que monitoram a incorporação ou hibridação de nucleotídeos numa cadeia de DNA *template* e que usam sinais secundário como a luz, a cor ou o pH, a sequenciação por nanoporo deteta diretamente a composição do DNA de uma molécula de cadeia simples nativa (Mikheyev and Tin, 2014). Para realizar a sequenciação do DNA, este passa por uma proteína, o nanoporo, à medida uma corrente elétrica passa pelo mesmo (Figura 19) (Clarke *et al.*, 2009).

Portanto, O DNA é inicialmente fragmentado em 8-10kb. Dois diferentes adaptadores, um *leader* e um *hairpin*, são ligados a cada extremidade do DNA de cadeia dupla fragmentado (Figura 19-A). Atualmente, não existe nenhum método para direcionar os adaptadores para uma extremidade específica do fragmento de DNA, portanto, existem três possíveis conformações: *leader-leader*, *leader-hairpin* e *hairpin-hairpin*. O adaptador *leader* é um adaptador, de cadeia dupla, que contém uma sequência necessária para direcionar o DNA para uma proteína secundária, a proteína motor, que vai permitir a passagem do fragmento de DNA no nanoporo. Sem este adaptador *leader* a interação entre o DNA e o nanoporo é mínima, o que evita a sequenciação de fragmentos com a conformação *hairpin-hairpin* e sendo a conformação *leader-hairpin* a ideal. Assim, com esta conformação, o adaptador *leader* direciona o fragmento de DNA para o nanoporo onde uma corrente elétrica também passa. À medida que o DNA atravessa o nanoporo, uma alteração característica ocorre na voltagem da corrente (Figura 19-B) (Eisenstein, 2012). Vários parâmetros, incluindo a magnitude e a duração desta alteração, são registados e podem ser interpretados como uma sequência k-mer específica. Assim que a próxima base atravessa o nanoporo, um novo k-mer altera a voltagem e a base é identificada (Deamer, Akeson and Branton, 2016). Na região do *hairpin*, o DNA continua a atravessar o nanoporo, permitindo que tanto a cadeia *forward* e *reverse* sejam usadas para criar uma sequência consenso chamada “2D” *read* (Goodwin, McPherson and McCombie, 2016).

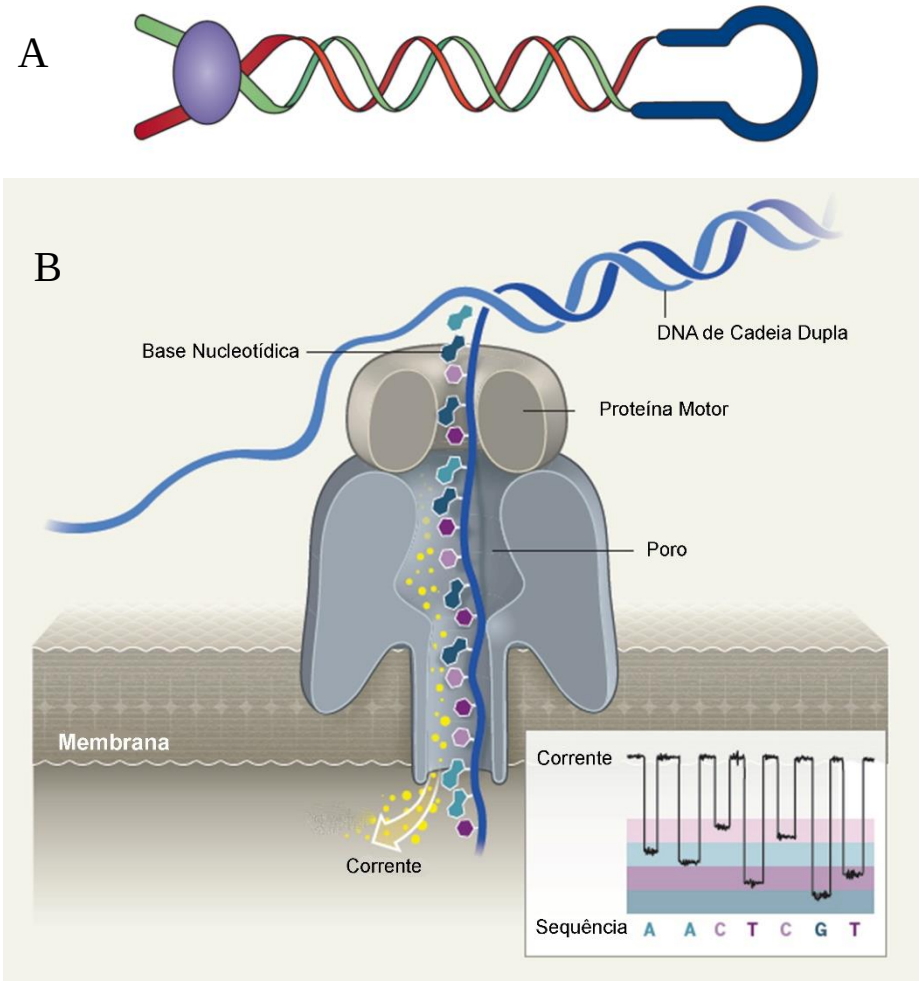


Figura 19: Plataforma *Oxford Nanopore*. (A) *Leader-hairpin template*. O adaptador *leader* interage com a proteína motor e o poro para direcionar o fragmento de DNA. (B) Uma corrente elétrica atravessa o poro e à medida que o DNA também atravessa, uma alteração na voltagem da corrente é detetada. Cada alteração da voltagem da corrente é específica de cada base. Adaptado de Eisenstein, 2017.

6. Objetivos

Com a realização deste trabalho pretende-se:

a) Preparar e selecionar bactérias multirresistentes e posterior sequenciação.

b) Estudar os genes de resistência aos antibióticos assim como o ambiente e suporte genético dos mesmos.

c) Avaliar o fundo genético das fontes multirresistentes e tratar estatisticamente os dados.

Capítulo 2 – Materiais e métodos

1. Sub-cultura das estirpes bacterianas

1.1. *Enterococcus* spp.

Um total de 21 estirpes de *Enterococcus* spp. foram selecionadas de nossa coleção de isolados bacterianos de carne picada, almôndegas e hambúrgueres. As amostras encontravam-se semeadas em tubos de crioconservação com meio BHI (Brain Heart Infusion) inclinado. Com uma ansa retiraram-se as bactérias dos tubos sendo colocadas em soro fisiológico previamente preparado e agitado. De seguida, a mesma ansa é mergulhada no soro fisiológico com as bactérias e estas são plaqueadas em meio *Columbia Blood Agar Base*. Seguidamente as placas são colocadas na estufa a 37º C durante 24h, simulando as condições ótimas de crescimento.

1.2. *Escherichia coli*

Um total de 45 estirpes de Enterobacteriaceae foram selecionadas de nossa coleção de isolados bacterianos de diferentes animais selvagens, de animais para consumo e de carne previamente estudados, tais como aves de rapina, águia de asa redonda, javalis, morcegos, linces, lobos, gaivotas, suínos e carne de galinha (Poeta *et al.*, 2008; Poeta *et al*., 2009; Pinto *et al*., 2010; Radhouani *et al*., 2010; Gonçalves *et al*., 2012a; Gonçalves *et al*., 2012b; Silva *et al*., 2012; Ramos *et al*., 2013; Garcês *et al*., 2019). As amostras encontravam-se semeadas em tubos de crioconservação com meio BHI inclinado. Com uma ansa retiraram-se as bactérias dos tubos sendo colocadas em soro fisiológico previamente preparado e agitados. De seguida, a mesma ansa é mergulhada no soro fisiológico com as bactérias e estas são plaqueadas em meio TSA (Trypticase soy agar). Este é um meio não-seletivo que providencia os nutrientes suficientes para o crescimento dos microrganismos. Seguidamente as placas são colocadas na estufa a 37º C durante 24h, simulando as condições ótimas de crescimento.

2. Identificação dos isolados por espetrometria de massa

A identificação das estirpes bacterianas foi efetuada por espetrometria de massa com o sistema VITEK® MS. Após o crescimento das bactérias durante 24h é retirada apenas uma colónia da placa, de preferência bem isolada, e é colocada diretamente na lâmina, de seguida é adicionada a matriz HCCA pronta a uso e por fim a lâmina é inserida no sistema VITEK® MS. Quando a

amostra é colocada na lâmina de metal e irradiada com um laser, a matriz é vaporizada e a amostra ganha uma carga elétrica, cuja taxa de relação massa/carga é medida.

Para identificar as estirpes bacterianas, o VITEK® MS:

• Ioniza a amostra, devido à reação do laser com a matriz;

• Utiliza um campo elétrico para acelerar os iões através do mesmo potencial;

• Mede o tempo que leva a chegar ao detetor (tempo de voo);

• O espetro é enviado e comparado com uma base de dados.

A base de dados do sistema contém um grande número de microrganismos, o que permite obter uma identificação mais precisa. Passado apenas alguns minutos podemos obter os nossos resultados de forma fiável (BioMérieux, 2018).

3. Identificação fenotípica da resistência aos antibióticos pelo método de Kirby e Bauer

Este método de difusão em agar permite avaliar *in vitro* a suscetibilidade bacteriana em relação aos antibióticos. É um método que não permite calcular a concentração mínima inibitória, só podendo classificar as bactérias em estudo como sensíveis, intermédias ou resistentes a determinado antibiótico. A partir de placas de Muller-Hinton agar (MH), previamente preparadas, semearam-se os isolados por esgotamento, previamente diluídos em soro fisiológico (NaCl a 0,85%) até que se obtivesse uma turvação de 0,5 na escala de McFarland. Em seguida aplicaram-se os discos impregnados com os antibióticos a testar. Assim que os discos de antibióticos entram em contacto com o agar humedecido, absorvem água e dá-se a difusão do antibiótico para o meio permitindo ou não o crescimento da bactéria em estudo. As placas MH foram incubadas a 37ºC durante 24h. Após as 24h de incubação, observa-se a formação de halos de inibição à volta dos discos de antibióticos. A resistência da estirpe bacteriana aos antibióticos testados será inversamente proporcional ao diâmetro do halo de inibição, ou seja, se estivermos perante estirpes sensíveis maior será o halo; se estivermos perante estirpes resistentes, menor ou ausente será halo de inibição. O diâmetro dos halos é medido em milímetros (mm).

Os antibióticos utilizados no decorrer da experiência foram comprados sob a forma de discos com as cargas recomendadas pelo CA-SFM/EUCAST (Jehl *et al.*, 2016).

Neste teste verificou-se a sensibilidade dos isolados de *Enterococcus* spp. a 12 antibióticos: ampicilina (2µg), gentamicina alta (30µg), eritromicina (15µg), pristinamicina (15µg),

vancomicina (5µg), teicoplanina (30µg), cloranfenicol (30µg), linezolida (10µg), norfloxacina (10µg), levofloxacina (5µg), trimetoprim-sulfametoxazole (1,25-23,75µg) e rifampicina (5µg).

Para verificar a sensibilidade dos isolados de *E. coli* foram testados 30 antibióticos: ampicilina (10µg), ticarcilina (75µg), piperacilina (30µg), cefalexina (30µg), ertapenem (10µg) amoxicilina + ácido clavulânico (30µg), cefotaxima (5µg), ceftazidima (10µg), mecilinamo (10µg), cefepima (30µg), aztreonam (30µg), imipenem (10µg), cefuroxima (30µg), cefixima (5µg), cefoxitina (30µg), piperacilina + tazobactam (36µg), tobramicina (10µg), amicacina (30µg), gentamicina (10µg), netilmicina (10µg), acido nalidíxico (30µg), norfloxacina (10µg), ofloxacina (5µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), trimetoprim (5µg), trimetoprim-sulfametoxazol (25µg), temocilina (30µg), fosfomicina (200µg) e colistina (50 µg).

Finalmente, foi efetuada a análise do teste de sinergia de duplo disco, onde os isolados de *E. coli* foram classificados como ESBL ou não ESBL, e a análise dos antibiogramas através da medição, em milímetros, do diâmetro dos halos de inibição. Foram também classificados como sensíveis, intermédios ou resistentes para cada antibiótico utilizado, tendo como referência os valores estandardizados da Tabela 2.

Tabela 2: Diâmetros dos halos de inibição dos antibióticos usados em *E. coli* e *Enterococcus* spp. Adaptado de CA-SFM/EUCAST, 2016

Bactéria	Antibiótico	Diâmetro (cm)		
		Resistente	Intermédio	Sensível
***Enterococcus* spp.**	Ampicilina 2µg	≤7	8-9	≥10
	Cloranfenicol 30µg	≤12	13-17	≥18
	Eritromicina 15µg	≤13	14-22	≥23
	Gentamicina 30µg	<8	-	≥8
	Levofloxacina 5µg	<15	-	≥15
	Linezolida 10µg	<19	-	≥19
	Norfloxacina 10µg	<12	-	≥12
	Pristinamicina[1] 15µg	EP	EP	EP
	Rifampina 5µg	≤16	17-19	≥20
	Teicoplanina 30µg	<16	-	≥16
	Trimetoprim/Sulfametoxazol 1,25-23,75µg	≤20	21-49	≥50
	Vancomicina 5µg	<12	-	≥12
E. coli	Ácido nalidíxico 30µg	≤13	14-18	≥19
	Amicacina 30µg	≤14	15-17	≥18
	Amoxicilina+ácido clavulânico 30µg	<19	-	≥19
	Ampicilina 10µg	<14	-	≥14
	Aztreonam 30µg	≤20	21-23	≥24
	Cefalexina 30µg	<14	-	≥14
	Cefepima 30µg	≤20	21-23	≥24
	Cefixima 5µg	<17	-	≥17
	Cefotaxima 5µg	≤16	17-19	≥20
	Cefoxitina 30µg	<19	-	≥19
	Ceftazidima 10µg	≤18	19-21	≥22
	Cefuroxima 30µg	<18	-	≥18
	Ciprofloxacina 5µg	≤18	19-21	≥22
	Cloranfenicol 30µg	<17	-	≥17
	Colistina 50µg	a	a	a
	Ertapenem 10µg	≤21	22-24	≥25
	Fosfomicina 200µg	<19	-	≥19
	Gentamicina 10µg	≤13	14-16	≥17
	Imipenem 10µg	≤15	16-21	≥22
	Mecilinamo 10µg	<15	-	≥15
	Netilmicina 10µg	≤11	12-14	≥15
	Norfloxacina 10µg	≤18	19-21	≥22
	Ofloxacina 5µg	≤18	19-21	≥22
	Piperacilina 30µg	≤16	17-19	≥20
	Piperacilina+tazobactam 36µg	≤16	17-19	≥20
	Temocilina 30µg	<20	-	≥20
	Ticarcilina 75µg	<23	-	≥23
	Tobramicina 10µg	≤13	14-16	≥17
	Trimetoprim 5µg	≤14	15-17	≥18
	Trimetoprim/sulfametoxazol 25µg	≤12	13-15	≥16

Legenda: a - é recomendado o uso do método da Concentração Mínima Inibitória; EP - em preparação; [1]As espécies *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. avium* são naturalmente resistentes às lincosamidas e à combinação quinupristina-dalfopristina, enquanto as espécies *E. faecium*, *E. durans* e *E. hirae* são naturalmente sensíveis

4. Extração de DNA

O processo de extração de DNA foi efetuado recorrendo ao Kit DNeasy® UltraClean® Microbial da Qiagen. Com este kit obtemos o DNA de boa qualidade e purificado necessário para a realização da sequenciação. Num tubo *PowerBead* providenciado pelo kit colocaram-se 300µL da solução *PowerBead* juntamente com a quantidade de uma ansa de bactéria. Adicionaram-se 50µL da solução SL no tubo *PowerBead* e de seguida os tubos foram colocados horizontalmente no vortex, adaptado para o efeito, e agitados à máxima velocidade durante 10 minutos, para remover a parede celular das bactérias. Após os 10 minutos os tubos foram colocados na centrífuga durante 30 segundos no máximo de 10000 x g a temperatura ambiente. De seguida transferiu-se o sobrenadante para um tubo de 2mL providenciado pelo *kit* e adicionaram-se 100µL da solução IRS no sobrenadante, agitou-se por 5 segundos e incubou-se a 4°C *overnight*. No dia seguinte, centrifugou-se os tubos a 10000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente e evitando o *pellet*, transferiu-se o volume total de sobrenadante para um tubo de 2mL limpo providenciado pelo *kit*. Adicionaram-se, de seguida, 900µL de solução SB ao sobrenadante e agitou-se por 5 segundos. Transferiu-se 700µL numa coluna *MB Spin* e centrifugou-se a 10000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente. Descartou-se o *flow-through*, transferiu-se o restante sobrenadante na coluna e centrifugou-se novamente a 10000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente. Descartou-se novamente o *flow*-through, adicionou-se 300µL da solução CB e centrifugou-se a 10000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente. Descartou-se o *flow-through* e centrifugou-se a 10000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente. De seguida, colocou-se a coluna num tubo de 2mL providenciado e juntaram-se 50µL da solução EB no centro do filtro branco da membrana, para ocorrer a precipitação do DNA. Centrifugou-se a 10000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente e eliminou-se a coluna. O DNA deve ser armazenado a -20°C até ser utilizado.

5. Sequenciação do DNA por *Illumina*

5.1. Diluição e quantificação do DNA

Numa placa de 96 poços colocaram-se 20µL de tampão de eluição em todos os poços e, no primeiro poço de cada linha, colocaram-se 10µL da amostra de DNA. De seguida, com uma pipeta multicanal fez-se a diluição em cascata 1:2 do poço 1 ao 12.

Posteriormente, realizou-se a quantificação do DNA utilizando o aparelho *Invitrogen Qubit 4 Fluorometer*. O intervalo desejável para a quantidade de DNA foi 0,6 – 0,7 ng/µL.

5.2. Preparação das bibliotecas de DNA

Esta etapa foi dividida em duas: *tagmentation* do DNA, onde este foi fragmentado e marcado simultaneamente, e a sua amplificação, onde o DNA foi amplificado através de um programa de PCR sendo adicionados o Index 1 e o Index 2 necessários para a formação de *clusters*.

Primeiramente, para a *tagmentation* foram necessários os reagentes ATM (*Amplicon Tagment Mix*), TD (*Tagment DNA Buffer*), NT (*Neutralize Tagment Buffer*) e o DNA (todos os reagentes devem ser agitados previamente). Assim, a cada tubo *strip*, foram adicionados 10µL de TD *Buffer* e 5µL de DNA, homogeneizando bem. Posteriormente, foram adicionados 5µL de ATM, fecharam-se os tubos *strips* e centrifugou-se por um minuto a 280×g a 20ºC. De seguida, colocaram-se no termociclador a incubar a 55ºC por 15 minutos. Colocaram-se 5µL de NT *Buffer*, homogeneizou-se bem e centrifugou-se por um minuto a 280×g a 20ºC.

Posteriormente, para a amplificação foram necessários o reagente NPM (*Nextera PCR Master Mix*) os *primers* Index 1 e os *primers* Index 2 (todos os reagentes foram agitados previamente). Assim, a cada tubo *strip*, foram adicionados 15µL de NPM, seguidos de 5µL de *primers* Index 1 e 5µL de *primers* Index 2 (as tampas de cada index foram trocadas a cada utilização para evitar contaminações) e homogeneizou-se muito bem. Centrifugou-se por um minuto a 280×g a 20ºC e iniciou-se o PCR com o seguinte programa:

72°C por 3 minutos;
95°C por 30 segundos;
12 ciclos de:
    95°C por 10 segundos,
    55°C por 30 segundos,
    72°C por 30 segundos;
72°C por 5 minutos;
∞10ºC

5.3. Purificação das bibliotecas de DNA

A purificação das bibliotecas foi efetuada recorrendo ao aparelho automático *Biomex 4000*. Para tal, foi apenas necessário preparar o etanol a 70% (necessário para o aparelho automático), transferir os produtos de PCR para uma placa de 96 poços e adicionar as *beads* AMPure XP necessárias para a purificação.

5.4. Validação e quantificação das bibliotecas de DNA

A quantificação é efetuada no aparelho *Invitrogen Qubit 4 Fluorometer* e a validação no aparelho *Agilent 2200 TapeStation*. Este aparelho realiza, automaticamente, uma corrida eletroforética para cada amostra permitindo uma análise do tamanho, da concentração e da integridade das bibliotecas de DNA.

5.5. *Pooling* e desnaturação das bibliotecas de DNA

Inicialmente, prepararam-se 500µL de 0,2 N NaOH misturando 100µL de 1,0 N NaOH e 400µL de água esterelizada. Posteriormente, realizou-se o *pool* de bibliotecas, ou seja, juntou-se num único tubo *eppendorf* 5µL de cada biblioteca. Num novo tubo *eppendorf*, para realizar a desnaturação das bibliotecas, adicionaram-se 5µL de NaOH e 5µL do *pool* de bibliotecas, seguidamente centrifugou-se a 2000 rpm por um minuto e incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Por último, adicionaram-se, num novo tubo, 10µL de bibliotecas desnaturadas e 990µL de HT1 (*Hybridization Buffer*) (utilizado para diluir as bibliotecas desnaturadas antes de as carregar no cartucho de reagentes para sequenciação).

5.6. Lançamento da sequenciação

Para o lançamento da sequenciação foi utilizado o *MiSeq Reagent Kit v3*. Cada *kit* de reagentes *MiSeq* inclui um cartucho que contém todos os reagentes (Figura 20-A), um HT1 (utilizado previamente para diluir as bibliotecas desnaturadas), uma garrafa PR2 (*Incorporation Buffer*) e uma *flow cell* (Figura 20-B). A *flow cell* encontra-se dentro de um recipiente contendo *storage buffer*. Esta tem que ser lavada com água destilada, cuidadosamente, para remover o excesso de sais, caso estes não sejam totalmente removidos irão afetar a captura de imagens.

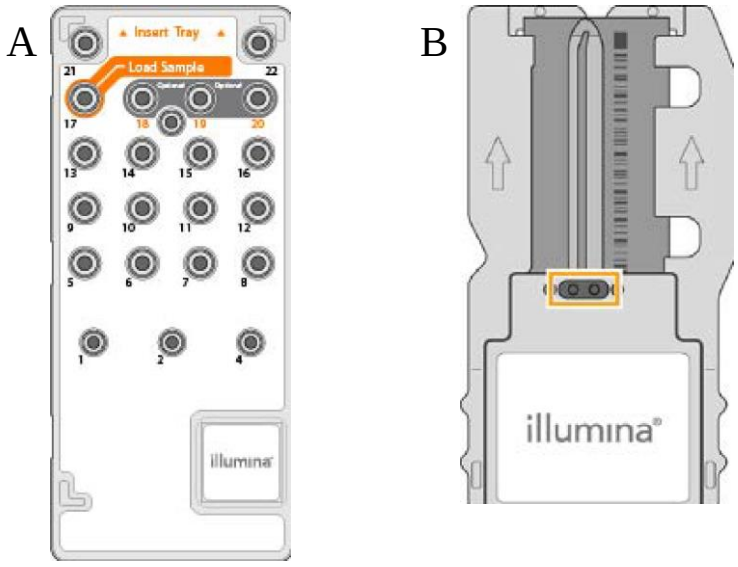


Figura 20: (A) Cartucho que contém todos os reagentes necessários; (B) *Flow cell*.

Assim, inicialmente, inverteu-se o cartucho dez vezes para misturar os reagentes, de seguida carregou-se a *pool* de bibliotecas no local indicado (Figura 20-A) e na interface do *software*, selecionou-se "*Sequence*" para iniciar as etapas de configuração de execução. Colocou-se no aparelho a *flow cell*, já lavada e seca, para depois colocar a garrafa PR2, o recipiente do lixo vazio e por último o cartucho. Cada corrida deve ter uma *sample sheet* e, por norma, o *software* procura por uma pasta com o nome que corresponda ao número do código de barras do cartucho de reagente carregado no sequenciador. De seguida, fez-se uma revisão dos parâmetros de execução e dos resultados da verificação *pre-run* e por fim iniciou-se a sequenciação. No fim desta, o sequenciador efetuou uma lavagem pós-corrida.

6. Deteção de genes a partir dos dados de *Illumina*

Após o fim da sequenciação, as sequências foram importadas no *software A5 assembly pipeline*, de seguida foi feito o *trim* das sequências, que serve para eliminar as extremidades dos *reads* que corresponde aos adaptadores, para se poder fazer o *assembly de novo* das sequências e, assim, se poder detetar os genes de resistência.

Os genes de resistência foram detetados recorrendo ao ARIBA *package* através do *mapping* entre os *reads* obtidos da sequenciação *Illumina* e uma base de dados, atualizada manualmente, de genes associados à resistência derivado de CARD e Resfinder (Zankari *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2017).

7. Extração de DNA plasmídico pelo método de Kado e Liu

Antes do início da extração do DNA plasmídico devem ser preparadas as soluções referidas na Tabela 3.

Tabela 3: Soluções a preparar previamente ao protocolo

Soluções a preparar previamente
TAE 1X
TAE 0,5X
Solução de Lise
Solução fenol/clorofórmio

Primeiramente, num *eppendorf* de 2mL, colocou-se 1mL de TAE 1X juntamente com a amostra bacteriana até a turvação ser opaca e agitou-se. De seguida centrifugou-se o tubo durante 1 minuto a 13000 rpm, eliminando, subsequentemente, o sobrenadante. Adicionaram-se 200µL de TAE 1x e misturou-se lentamente com o *pellet*. Posteriormente, acrescentaram-se 400µL de solução de lise e misturou-se invertendo o tubo com a mão muito lentamente. De seguida, colocou-se o tubo a 55°C durante 1 hora. Durante este tempo, preparou-se o gel de agarose a 0,7%. Para tal, pesaram-se 0,9g de agarose que foram adicionadas a 130mL de TAE 0,5X e aquecendo-se a mistura até que a agarose se dissolva completamente. Depois desta arrefecer colocou-se num suporte com pentes para formar os poços. Após a incubação, adicionaram-se 700µL da solução fenol/clorofórmio ao tubo *eppendorf*. Misturar muito lentamente com a mão desenhando um oito (8) no ar 20-30 vezes. Centrifugou-se 15 minutos a 6000 rpm. De seguida, para depositar a amostra no gel, misturaram-se 30µL do sobrenadante com 6µL de solução de deposição num tubo *strip*. Posteriormente, depositaram-se 15µL desta mistura nos poços do gel e a eletroforese horizontal em gel de agarose foi realizada a 130 Volts durante cerca de 4 horas. Depois da migração acabar, colocou-se o gel num recipiente com 350mL de água destilada e 25µL de GelStar e deixou-se *overnight* com agitação suave. No dia seguinte, eliminou-se o líquido do recipiente com cuidado e colocou-se água destilada até cobrir o gel durante 10 minutos. De seguida, visualizou-se o gel num transiluminador de UV e obteve-se a respetiva foto (Kado and Liu, 1981).

8. Sequenciação de plasmídeos por Nanoporo

8.1. Preparação do DNA

Antes de iniciar a preparação do DNA foi necessário medir a qualidade, quantidade e tamanho do DNA. Após esta etapa, o DNA foi preparado em água livre de nucleases, ou seja, transferiu-se 1µg de DNA genómico para um tubo *eppendorf* onde foi adicionado 48µL de água livre de nucleases. De seguida, homogeneizou-se invertendo o tubo cuidadosamente. Por último, fez-se um *spin down* numa centrífuga.

8.2. Reparação do DNA e *end-prep*

Com todos os reagentes colocados em gelo, começou-se por adicionar, num tubo *strip*, 48µL de DNA; 3,5µL de *NEBNext FFPE DNA Repair Buffer*; 2µL *NEBNext FFPE DNA Repair Mix*; 3,5µL *Ultra II End-prep reaction buffer* e 3µL *Ultra II End-prep enzyme mix*. Misturou-se suavemente e fez-se um *spin down*. De seguida, colocou-se o tubo *strip* num termociclador para incubar a 20° C por 5 minutos e 65° C por 5 minutos.

Posteriormente, lavaram-se e prepararam-se as AMPure XP *beads* e agitou-se. Transferiu-se a amostra de DNA para um tubo *eppendorf* de 1,5mL onde foram adicionados 60µL de AMPure XP *beads* e incubadas por 5 minutos num *Hula mixer* (misturador rotativo). Entretanto, prepararam-se 500µL de etanol a 70% e, posteriormente, colocou-se o tubo *eppendorf* numa placa magnética, esperou-se que as *beads* ficassem aderidas à parede do tubo *eppendorf* para depois retirar o sobrenadante. Permanecendo com o tubo *eppendorf* na placa magnética, lavaram-se as *beads* com 200µL de etanol a 70%, preparado anteriormente, sem perturbar o *pellet*. Removeu-se o mesmo e repetiu-se este passo. Fez-se um *spin down,* colocou-se de novo na placa magnética, removeu-se qualquer resíduo de etanol e deixou-se secar por 30 segundos. Retirou-se o tubo *eppendorf* da placa magnética, ressuspendeu-se o *pellet* em 25µL de água livre de nucleases e incubou-se à temperatura ambiente por 2 minutos. Colocou-se novamente o *eppendorf* na placa magnética até as *beads* estarem aderidas à parede do tubo. Por último, quantificou-se 1µL do DNA *end-prepped* usando um fluorómetro.

8.3. Ligação dos *Native barcode*

Inicialmente, os *Native barcodes* foram colocados à temperatura ambiente, o suficiente para um *barcode* por amostra, foram homogeneizados e colocados em gelo. A partir de 12 *barcodes*

fornecidos, foi selecionado um *barcode* exclusivo para cada amostra que irão ser sequenciadas na mesma *flow cell*. Assim, apenas 12 amostras podem ser sequenciadas de cada vez.

De seguida, diluiram-se 500ng de DNA *end-prepped* em 22,5µL de água livre de nucleases e foram adicionados os reagentes na ordem indicada à frente: 22,5µL de DNA *end-prepped*; 2,5µL de *Native barcodes*; e 25µL da *Blunt/TA Ligase Master Mix*. Misturou-se tudo agitando o tubo, gentilmente, e depois um *spin down*. Incubou-se à temperatura ambiente por 10 minutos e, entretanto, agitaram-se as AMPure XP *beads* para, posteriormente, serem adicionados 50µL das mesmas ao tubo da reação, homogeneizando a mistura. Incubou-se no *Hula mixer* por 5 minutos à temperatura ambiente e prepararam-se 500µL de etanol a 70%. De seguida, foi feito um *spin down* do tubo da reação, colocado numa placa magnética onde foi removido o sobrenadante. Permanecendo com o tubo da reação na placa magnética, lavaram-se as *beads* com 200µL de etanol a 70%, preparado anteriormente, sem perturbar o *pellet*. Removeu-se o mesmo e repetiu-se este passo. Fez-se um *spin down*, colocou-se de novo na placa magnética, removeu-se qualquer resíduo de etanol e deixou-se secar por 30 segundos. Retirou-se o tubo *eppendorf* da placa magnética, ressuspendeu-se o *pellet* em 26µL de água livre de nucleases e incubou-se à temperatura ambiente por 2 minutos. Colocou-se novamente o *eppendorf* na placa magnética ate as *beads* estarem aderidas à parede do tubo. Removeu-se o conteúdo para um novo tubo *eppendorf*, descartou-se o *pellet* de *beads* e quantificou-se 1µL do DNA *barcoded* usando um fluorómetro. Por último, num tubo *eppendorf* foram colocadas quantidades equimolares de cada amostra *barcoded* formando um *pool* de DNA *barcoded*.

8.4. Ligação dos adaptadores e lavagem

Previamente, foi colocado à temperatura ambiente o tubo *Barcode Adapter Mix*, o *Elution Buffer* (EB) e o *NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer* (5x), foi feito um *spin down*, homogeneizou-se e colocou-se em gelo. Seguidamente, fez-se um *spin down* à T4 ligase que foi colocada também em gelo. Também o tubo de *L Fragment Buffer* (LFB), que favorece fragmentos de DNA com 3kb ou mais de tamanho, foi agitado, de seguida foi feito um *spin down* e colocado em gelo.

Assim, para iniciar a ligação dos adaptadores, misturaram-se 50µL da *pool* de DNA *barcoded*, 20µL de *Barcode Adapter Mix* (BAM 1D), 20µL de *NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer* (5X) e 10µL *Quick T4 DNA Ligase*. Homogeneizou-se suavemente, fez-se um *spin down* e

incubou-se, à temperatura ambiente, por 10 minutos. Foram adicionadas, de seguida, 40µL de *AMPure XP beads* ao tubo da reação e foi homogeneizado com a pipeta. Seguidamente, foi incubado no *Hula mixer*, à temperatura ambiente, por 5 minutos. No fim da incubação, foi colocado numa placa magnética para que as *beads* ficassem aderidas às paredes do tubo e fosse possível remover o sobrenadante. Posteriormente, as *beads* foram lavadas com 250µL de LFB, agitou-se o tubo *eppendorf* possibilitando a ressuspenssão das mesmas, colocou-se de novo na placa magnética para, novamente, as *beads* aderirem às paredes do *eppendorf* permitindo a remoção do sobrenadante. Após a repetição deste passo, foi feito um *spin down*, colocou-se o tubo de novo na placa magnética para eliminar qualquer resíduo de sobrenadante e deixou-se a secar por 30 segundos. Removeu-se o *eppendorf* da placa magnética, ressuspendeu-se o *pellet* em 15µL EB e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, colocou-se o tubo, novamente, na placa magnética permitindo a adesão das *beads* às paredes do *eppendorf*, removeu-se o conteúdo para um novo *eppendorf*, descartaram-se as *beads* e quantificou-se 1µL de DNA ligado aos adaptadores usando um fluorómetro.

8.5. *Priming* e *loading* das amostras na *flow cell*

Após a realização de todos os testes de verificação do funcionamento da *flow cell*, iniciou-se esta etapa por retirar os reagentes *Sequencing Buffer* (SQB), *Loading Beads* (LB), *Flush Tether* (FLT) e um tubo *Flush Buffer* (FLB) para a temperatura ambiente sendo, de seguida, colocados em gelo. Os reagentes SQB e FLB tiveram de ser agitados, seguido de um *spin down* e colocados de novo em gelo e o reagente FLT sofreu um *spin down*, foi homogeneizado com a pipeta e regressou para o gelo.

Abriu-se a tampa do dispositivo de sequenciação nanoporo e deslizou-se, no sentido horário, a tampa do compartimento de *priming* da *flow cell* para o tornar visível. Depois de aberto, verificou-se a existência de pequenas bolhas de ar no compartimento, caso existissem, removia-se um pequeno volume de *buffer* para eliminar as bolhas de ar. Era preciso ter cuidado ao retirar o buffer da *flow cell*. A matriz de poros devia estar coberta pelo *buffer* em todos os momentos. A remoção de mais de 20-30µL podia danificar os poros da matriz. De seguida, preparou-se a *priming mix* da *flow cell* e, para tal, adicionaram-se 30µL de FLT diretamente no tubo de FLB e homogeneizou-se pipetando. Posteriormente, carregaram-se 800µL da *mix* de *priming* na *flow cell* evitando a formação de bolhas de ar e esperaram-se 5 minutos. Entretanto, num novo tubo,

prepararam-se as bibliotecas a ser carregadas, para isso, adicionaram-se 37,5µL de *Sequencing Buffer* (SQB); 25,5µL de LB (misturou-se bem o conteúdo deste tubo pois este contém uma suspensão de *beads* que depositam rapidamente e é vital que estejam misturadas imediatamente antes de serem usadas) e 12µL das bibliotecas de DNA. Finalizou-se o *priming* da *flow cell* introduzindo 200µL de *priming mix* no compartimento de *priming* da *flow cell* evitando a formação de bolhas de ar. De seguida, misturou-se com a pipeta, gentilmente, as bibliotecas imediatamente antes de serem carregadas e adicionaram-se 75µL de amostra na *flow cell*, gota a gota, no compartimento correspondente. Por último, recolocam-se as tampas dos compartimentos e a do dispositivo de sequenciação e iniciou-se a corrida de sequenciação. Após término da corrida de sequenciação, é feito o *assembly de novo* com o software Flye 2.4.2. Para a reconstrução do plasmídeo foi utilizada a ferramenta *The artemis*.

Capítulo 3 – Resultados

1. *Enterococcus* spp.

1.1. Identificação dos isolados por espetrometria de massa

Das 21 amostras, 76,2% foram identificados como *Enterococcus faecium* (n=16), 14,3% como *Enterococcus gallinarum* (n=3) e 9,5% como *Enterococcus durans* (n=2) (Figura 21).

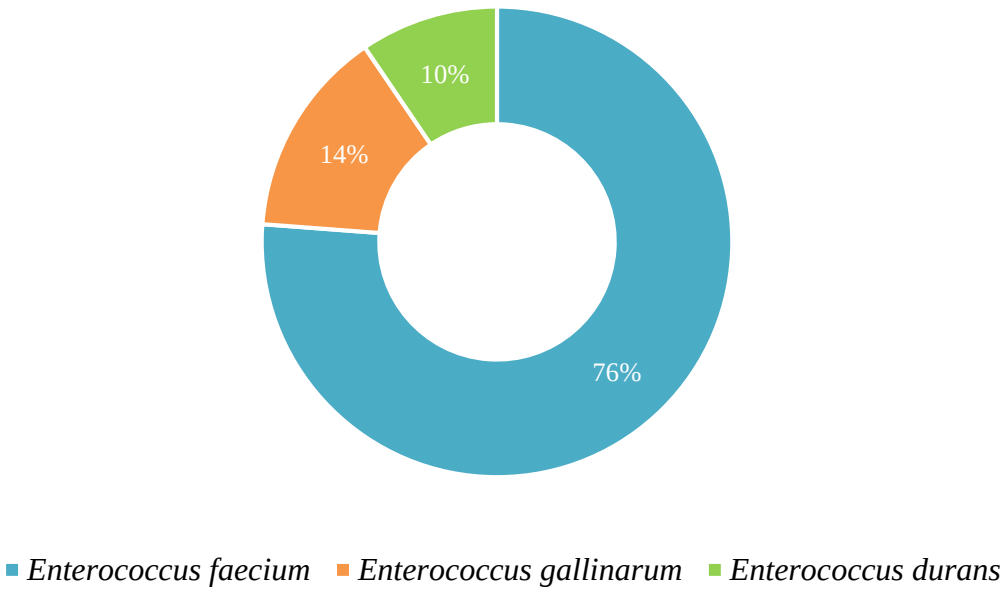


Figura 21: Percentagem de espécies de enterococos isoladas a partir de amostras de carne.

1.2. Estudo da sensibilidade aos antibióticos nos isolados de *Enterococcus* spp.

Com a realização do teste de sensibilidade aos antibióticos verificou-se que dos 16 isolados de *Enterococcus faecium*, 14 (73,7%) eram resistentes à vancomicina (VRE). Tanto os 3 isolados de *Enterococcus gallinarum* (15,8%) como os 2 isolados de *Enterococcus durans* eram também VREs (10,5%). A partir desta etapa só se contabilizaram os isolados que apresentaram fenótipo VRE (n=19).

Todos os VREs apresentaram multirresistência e os níveis mais elevados de resistência observados são aos antibióticos vancomicina (100%), teicoplanina (84,2%), eritromicina (84,2%) e ampicilina (68,4%) (Tabela 4). No entanto, nenhum dos isolados apresenta resistência aos

antibióticos cloranfenicol e linezolida. Relativamente aos aminoglicosídeos de elevada carga, foram detetadas baixas percentagens de resistência (5,3%) à gentamicina (Tabela 4).

Todos os isolados *E. faecium* apresentaram resistência à eritromicina (100%) e à teicoplanina (100%). Observou-se uma elevada percentagem de resistência à ampicilina (71,4%), à levofloxacina (50%), à norfloxacina (42,9%) e rifampina (42,9%), e uma baixa percentagem de resistência à gentamicina (7,1%) (Tabela 4).

Relativamente aos isolados *E. gallinarum*, todos manifestaram resistência à pristinamicina (100%), enquanto que dois manifestaram resistência à ampicilina (66,7%) e apenas um apresentou resistência à eritromicina (33,3%), à teicoplanina (33,3%) e à rifampina (33,3%) (Tabela 4).

Relativamente aos isolados *E. durans*, apenas 1 isolado apresentou resistência à ampicilina (50%), à eritromicina (50%) e à teicoplanina (50%) (Tabela 4). Na Figura 22 podemos observar o panorama geral das resistências antimicrobianas no total de isolados de VREs.

Tabela 4: Resistências antimicrobianas detetadas nos isolados de Enterococci Resistentes à Vancomicina (VREs)

Antibiótico	**Número e percentagem (%) de resistência dos VREs divididos pelas espécies**			
	***E. faecium* (n=14)**	***E. gallinarum* (n=3)**	***E. durans* (n=2)**	**Total (n=19)**
Vancomicina (VNC)	14 (100%)	3 (100%)	2 (100%)	19 (100%)
Teicoplanina (TEC)	14 (100%)	1 (33,3%)	1 (50%)	16 (84,2%)
Eritromicina (ERY)	14 (100%)	1 (33,3%)	1 (50%)	16 (84,2%)
Ampicilina (API)	10 (71,4%)	2 (66,7%)	1 (50%)	13 (68,4%)
Levofloxacina (LVX)	7 (50%)	0	0	7 (36,8%)
Rifampina (RIF)	6 (42,9%)	1 (33,3%)	0	7 (36,8%)
Norfloxacina (NXN)	6 (42,9%)	0	0	6 (31,6%)
Pristinamicina (PTN)	-	3 (100%)	-	3 (15,8%)
Trimetoprim/sulfametoxazol (SXT)	2 (14,3%)	0	0	2 (10,5%)
Gentamicina (GME)	1 (7,1%)	0	0	1 (5,3%)
Cloranfenicol (CHL)	0	0	0	0
Linezolida (LIN)	0	0	0	0

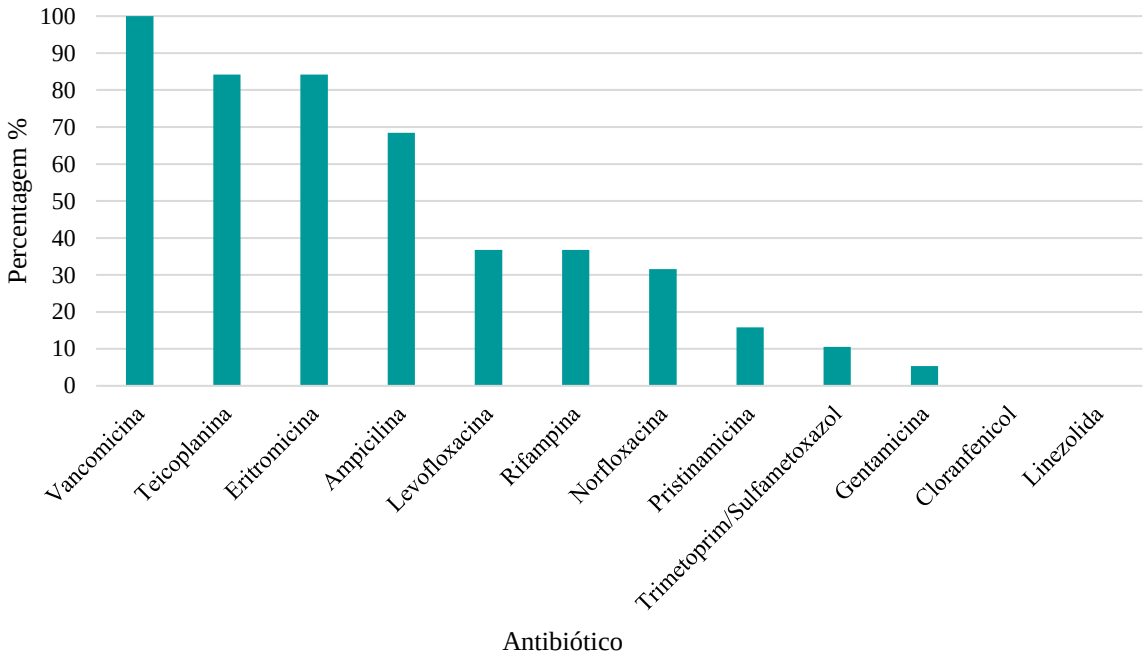


Figura 22: Resistências antimicrobianas detetadas no total de isolados de VREs

Na Tabela 5 é possível observar os fenótipos de resistência obtidos dos isolados *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. durans*. Os fenótipos de resistência mais observados nos isolados de *E. faecium* foram: API ERY VNC TEC NXN LVX RIF (n=5), API ERY VNC TEC (n=3) e ERY VNC TEC (n=3). Nos isolados de *E. gallinarum* só foram observados 3 fenótipos de resistência: API PTN VNC TEC RIF (n=1), ERY PTN VNC (n=1) e API PTN VNC (n=1). Complementarmente, nos isolados de *E. durans*, só foram observados dois fenótipos de resistência: ERY VNC TEC (n=1) e API VNC (n=1).

Tabela 5: Fenótipos de resistência nos diferentes isolados de VREs

Espécie de enterococos (n=19)	Fenótipo	Número de isolados
Enterococcus faecium **(n=14)**	API GME ERY VNC TEC NXN LVX SXT RIF	1
	API ERY VNC TEC NXN LVX RIF	5
	API ERY VNC TEC LVX SXT	1
	API ERY VNC TEC	3
	ERY VNC TEC	4
Enterococcus gallinarum **(n=3)**	API PTN VNC TEC RIF	1
	ERY PTN VNC	1
	API PTN VNC	1
Enterococcus durans **(n=2)**	ERY VNC TEC	1
	API VNC	1

Legenda: API-Ampicilina; GME-Gentamicina alta; ERY-Eritromicina; PTN-Pristinamicina; VNC-Vancomicina; TEC-Teicoplanina; NXN-norfloxacina; LVX-Levofloxacina; SXT-Trimetoprim/sulfametoxazol; RIF-Rifampina

1.3. Sequenciação e deteção de genes

Dos genes que conferem resistência à classe dos aminoglicosídeos, foi detetado em todos os isolados de *E. faecium* e num isolado de *E. gallinarum* o gene *aac*(6')-*Ii*. O gene *ant*(9)-*Ia* foi detetado em 6 isolados de *E. faecium* e num isolado de *E. gallinarum*. Os genes *aadE* e *aac*(6')-*Ie-aph*(2")-*Ia* foram apenas detetados na *E. faecium*, o primeiro em 6 isolados e o segundo num isolado. Relativamente à espécie *E. durans*, em ambos os isolados foram detetados o gene *aac*(6')-*Iih* (Tabela 6 e Figura 23).

A combinação dos genes *tet*(M) + *tet*(L), genes que conferem resistência à classe das tetraciclinas, foi encontrada em todos os isolados de *E. durans*, em 9 isolados de *E. faecium* e em apenas um isolado de *E. gallinarum* (Tabela 6 e Figura 23).

Foram detetados vários genes que conferem resistência à classe dos macrólidos. O gene *erm*(B) foi detetado em todos os isolados de *E. faecium*, em um isolado de *E. gallinarum* e nos 2 isolados de *E. durans*. Foi detetada a combinação *erm*(B) + *erm*(T) num isolado de *E. faecium*. O gene *lsa*(E) foi detetado em apenas 6 isolados de *E. faecium*, o gene *mef*(A) foi detetado em apenas um isolado de *E. gallinarum* (Tabela 6 e Figura 23).

Dos genes que conferem resistência à classe dos glicopéptidos, tanto em todos os isolados de *E. faecium* como em todos os isolados de *E. durans* foi detetado o gene *vanA*. Relativamente à espécie *E. gallinarum*, em 2 isolados foi detetado o gene *vanC* e num isolado foi detetada a combinação *vanA* + *vanC* (Tabela 6 e Figura 23).

Foi detetado o gene *lnu(B)*, que confere resistência à classe das lincosamidas, em apenas 6 isolados de *E. faecium*. Relativamente aos genes que conferem resistência às classes das estreptograminas e macrólidos, o gene *msr*(C) foi detetado em todos os isolados de *E. faecium* e o gene *msr*(D) foi detetado em apenas um isolado de *E. gallinarum* (Tabela 6 e Figura 23).

Considerando a classe dos lipopéptidos e a espécie *E. faecium*, pois só foram detetados nesta, os genes *cls* estava presente em todos os isolados, *liaS* em 9 isolados e o *liaR* em apenas um isolado (Tabela 6 e Figura 23).

Na espécie *E. faecium* foram detetados alguns genes que conferem resistência ao antibiótico trimetoprim. O gene *dfrG* foi detetado em 2 isolados e o gene *dfrK* em apenas um isolado (Tabela 6 e Figura 23).

Por último, quanto ao complexo das bombas de efluxo, dois genes, *adeC* e *efmA*, foram encontrados em todos isolados de *E. faecium* (Tabela 6 e Figura 23).

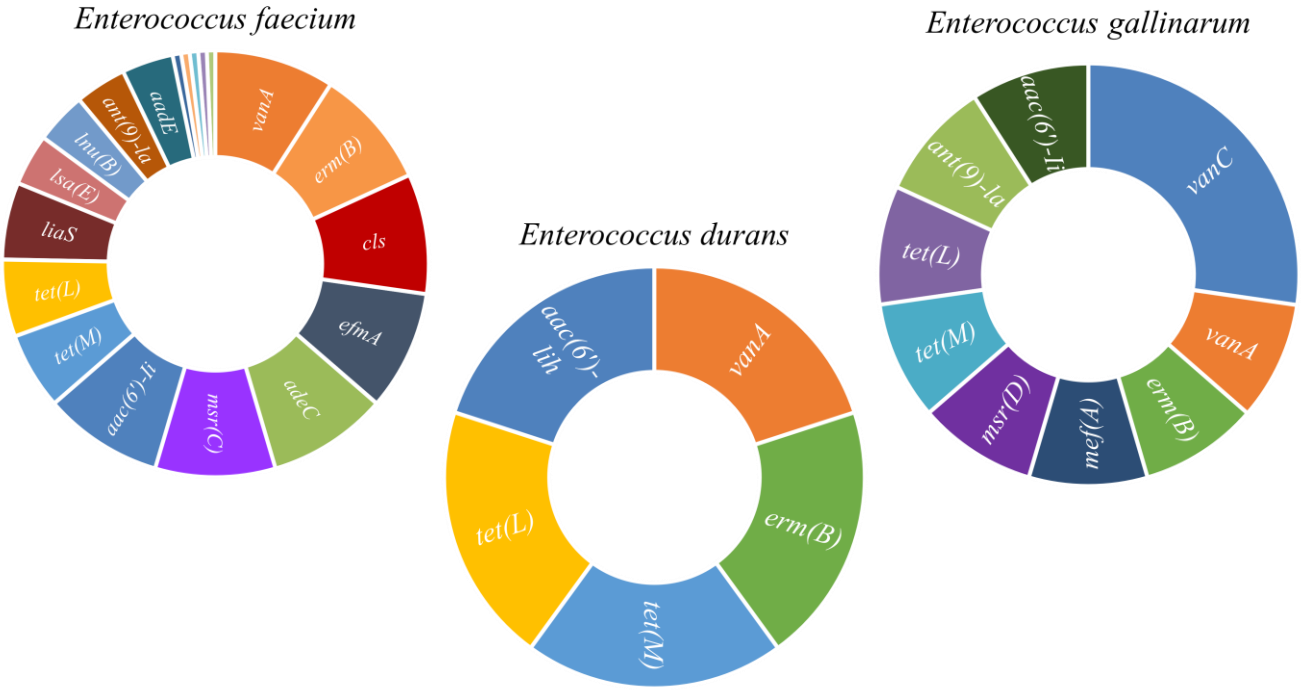


Figura 23: Genes de resistência detetados nas diferentes espécies de VREs

Tabela 6: Genes de resistência detetados nos diversos isolados de VREs

Espécie	Isolado	Genes
E. faecium	**H1**	*aac*(6')-*Ii*, *tet*(L), *tet*(M), *adeC*, *efmA*, *vanA*, *msr*(C), *cls*, *erm*(T), *erm*(B), *dfrG*
	H2	*aac*(6')-*Ii*, *aadE*, *ant*(9)-*Ia*, *tet*(L), *tet*(M), *adeC*, *efmA*, *vanA*, *lnu*(B), *msr*(C), *cls*, *liaS*, *lsa*(E), *erm*(B)
	H3	*aac*(6')-*Ii*, *aadE*, *ant*(9)-*Ia*, *tet*(L), *tet*(M), *adeC*, *efmA*, *vanA*, *lnu*(B), *msr*(C), *cls*, *liaS*, *lsa*(E), *erm*(B)
	H4	*aac*(6')-*Ii*, *aac*(6')-*Ie*-*aph*(2")-*Ia*, *adeC*, *efmA*, *vanA*, *msr*(C), *cls*, *liaS*, *erm*(B), *dfrG*, *dfrK*
	H7	*aac*(6')-*Ii*, *tet*(L), *tet*(M), *adeC*, *efmA*, *vanA*, *msr*(C), *cls*, *liaS*, *liaR*, *erm*(B)
	H8	*aac*(6')-*Ii*, *adeC*, *efmA*, *vanA*, *msr*(C), *cls*, *erm*(B)
	A10	*aac*(6')-*Ii*, *aadE*, *ant*(9)-*Ia*, *tet*(L), *tet*(M), *adeC*, *efmA*, *vanA*, *lnu*(B), *msr*(C), *cls*, *liaS*, *lsa*(E), *erm*(B)
	A13	*aac*(6')-*Ii*, *adeC*, *efmA*, *vanA*, *msr*(C), *cls*, *erm*(B)
	A14	*aac*(6')-*Ii*, *aadE*, *ant*(9)-*Ia*, *tet*(L), *tet*(M), *adeC*, *efmA*, *vanA*, *lnu*(B), *msr*(C), *cls*, *liaS*, *lsa*(E), *erm*(B)
	A16	*aac*(6')-*Ii*, *adeC*, *efmA*, *vanA*, *msr*(C), *cls*, *erm*(B)
	CP17	*aac*(6')-*Ii*, *aadE*, *ant*(9)-*Ia*, *tet*(L), *tet*(M), *adeC*, *efmA*, *vanA*, *lnu*(B), *msr*(C), *cls*, *liaS*, *lsa*(E), *erm*(B)
	CP18	*aac*(6')-*Ii*, *tet*(L), *tet*(M), *adeC*, *efmA*, *vanA*, *msr*(C), *cls*, *liaS*, *erm*(B)
	CP19	*aac*(6')-*Ii*, *adeC*, *efmA*, *vanA*, *msr*(C), *cls*, *erm*(B)
	CP21	*aac*(6')-*Ii*, *aadE*, *ant*(9)-*Ia*, *tet*(L), *tet*(M), *adeC*, *efmA*, *vanA*, *lnu*(B), *msr*(C), *cls*, *liaS*, *lsa*(E), *erm*(B)
E. gallinarum	**H6**	*aac*(6')-*Ii*, *vanA*, *vanC*, *erm*(B)
	A12	*ant*(9)-*Ia*, *vanC*, *msr*(D), *mef*(A)
	CP23	*tet*(L), *tet*(M), *vanC*
E. durans	**A11**	*aac*(6')-*Iih*, *tet*(L), *tet*(M), *vanA*, *erm*(B)
	CP22	*aac*(6')-*Iih*, *tet*(L), *tet*(M), *vanA*, *erm*(B)

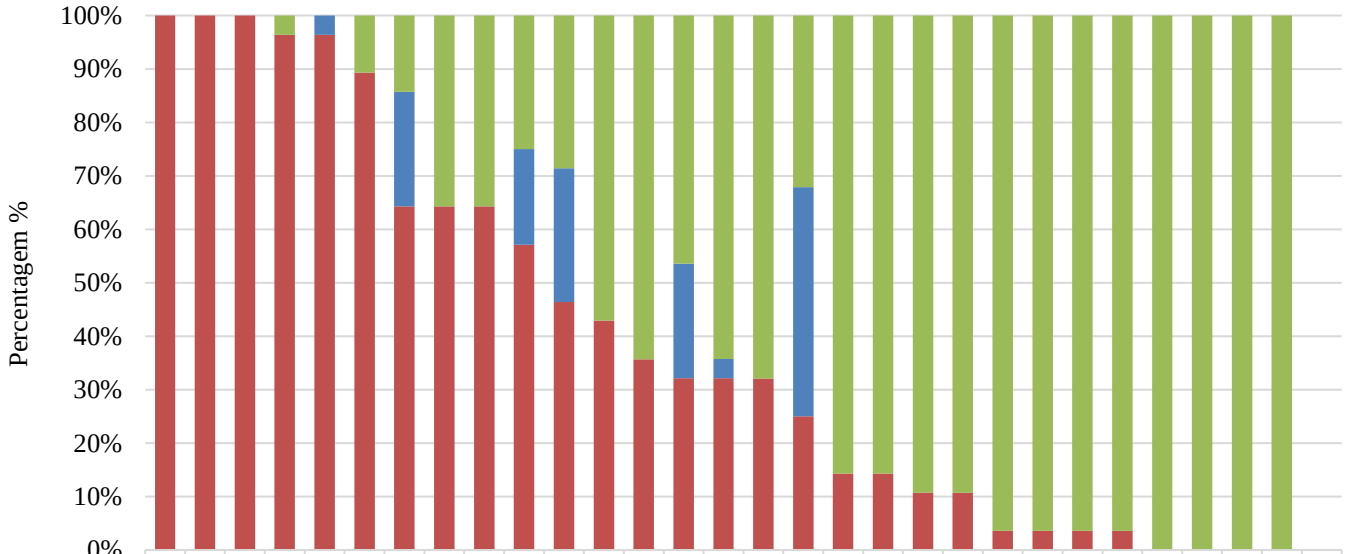
2. *Escherichia coli*

2.1. Identificação dos isolados por espetrometria de massa

Dos 45 isolados de Enterobacteriaceae todos foram identificados como *Escherichia coli* (100%).

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

Do total de 45 isolados de *E. coli*, 28 tinham o fenótipo ESBL (62,2%). Destes 28 isolados, 17 tinham origem em animais selvagens e os restantes 11 tinham origem em animais para consumo. Todos os ESBLs apresentaram multirresistência sendo a resistência aos antibióticos ampicilina (100%), ticarcilina (100%), piperacilina (100%), cefuroxima (96,4%) e cefotaxima (96,4%) mais frequentes. No entanto, todos os ESBLs são sensíveis aos antibióticos cefoxitina, imipenem, amicacina e fosfomicina (Figura 24).



	AMP	TIC	PIL	CXM	COX	CXN	FEP	TMP	SXT	NAL	OFX	FIX	TEM	CZD	CIP	NXN	ATM	AMC	CHL	GMN	TMN	PTZ	ETP	MEC	NTM	IPM	AKN	FOX	FOS	CST
Sensíveis	0	0	0	3,6	0	11	14	36	36	25	29	57	64	46	64	68	32	86	86	89	89	96	96	96	96	100	100	100	100	0
Intermédios	0	0	0	0	3,6	0	21	0	0	18	25	0	0	21	3,6	0	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistentes	100	100	100	96	96	89	64	64	64	57	46	43	36	32	32	32	25	14	14	11	11	3,6	3,6	3,6	3,6	0	0	0	0	0

Figura 24: Padrões de resistência antimicrobiana e percentagem das estirpes de *E. coli* produtoras de ESBLs. AMP-Ampicilina; TIC-Ticarcilina; PIL-Piperacilina; CXM-Cefuroxima; COX-Cefotaxima; CXN-Cefalexina; FEP-Cefepima; TMP-Trimetoprim; SXT-Trimetoprim/sulfametoxazol; NAL-Ácido nalidíxico; OFX-Ofloxacina; FIX-Cefixima; TEM-Temocilina; CZD-Ceftazidima; CIP-Ciprofloxacina; NXN-Norfloxacina; ATM-Aztreonam; AMC-Amoxicilina+ácido clavulânico; CHL-cloranfenicol; GMN-Gentamicina; TMN-Tobramicina; PTZ-Piperacilina+tazobactam; ETP-Ertapenem; MEC-Mecilinamo; NTM-Netilmicina; IPM-Imipenem; AKN-Amicacina; FOX-Cefoxitina; FOS-Fosfomicina; CST-Colistina.

Os fenótipos de resistência detetados nos 28 isolados de *E. coli* são evidenciados na Tabela 7. Os fenótipos de resistência mais frequente foram AMP TIC PIL CXN CXM COX FEP NAL NXN OFX CIP TMP SXT (n=3) e AMP TIC PIL CXN CXM COX FEP TMP SXT (n=3).

Tabela 7: Fenótipos de resistência em *Escherichia coli* produtoras de ESBLs

Fenótipo de resistência	Número de isolados
AMP AMC TIC PIL TEM CXN FIX CXM COX ATM FEP NAL NXN OFX CIP TMP SXT	1
AMP AMC TIC PIL MEC TEM CXN CXM COX FEP NAL NXN OFX CIP TMP SXT	1
AMP AMC TIC PIL TEM CXN CXM COX FEP NAL NXN OFX CIP TMP SXT	1
AMP TIC PIL CXN FIX CXM CZD COX ATM FEP TMN GMN TMP SXT NTM	1
AMP TIC PIL TEM CXN CXM COX TMN GMN NAL NXN OFX CIP CHL	1
AMP TIC PIL CXN FIX CXM COX FEP NAL NXN OFX CIP TMP SXT	1
AMP TIC PIL CXN CXM COX FEP NAL NXN OFX CIP TMP SXT	3
AMP TIC PIL TEM CXN FIX CXM COX FEP NAL OFX TMP SXT	1
AMP TIC PIL CXM CZD COX NAL NXN OFX CIP CHL TMP SXT	1
AMP TIC PIL CXN FIX CXM COX FEP NAL OFX TMP SXT	1
AMP TIC PIL TEM CXN FIX CXM CZD COX ATM FEP	2
AMP TIC PIL CXN FIX CZD ATM NAL CHL TMP SXT	1
AMP TIC PIL CXN FIX CXM CZD COX ATM FEP	2
AMP TIC PIL CXN CXM COX FEP NAL TMP SXT	1
AMP AMC TIC PIL PTZ TEM CXN CXM COX CHL	1
AMP TIC PIL CXN FIX CXM COX FEP NAL OFX	1
AMP TIC PIL CXN CXM COX FEP TMP SXT	3
AMP TIC PIL TEM CXM CZD COX NAL OFX	1
AMP TIC PIL TEM CXN CXM COX TMP SXT	1
AMP TIC PIL CXM CZD COX NAL TMP SXT	1
AMP TIC PIL CXN CXM COX TMN GMN	1
AMP TIC PIL CXN FIX CXM COX CHL	1

Legenda: AMP-Ampicilina; AMC-Amoxicilina+ácido clavulânico; TIC-Ticarcilina; PIL-Piperacilina; PTZ-Piperacilina+tazobactam; MEC-mecilinamo; TEM-Temocilina; CXN-Cefalexina; FIX-Cefixima; CXM-Cefuroxima; CZD-Ceftazidima; COX-Cefotaxima; ATM-Aztreonam; FEP-Cefepima; ETP-Ertapenem; TMN-Tobramicina; GMN-Gentamicina; NAL-ácido nalidíxico; NXN-Norfloxacina; OFX-ofloxacina; CIP-Ciprofloxacina; CHL-cloranfenicol; TMP-Trimetoprim; SXT-Trimetoprim/sulfametoxazol; NTM-Netilmicina

2.3. Sequenciação e deteção de genes

Relativamente aos genes que codificam ESBLs, foram detetados, maioritariamente, os genes *AmpC* (100%) e $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ (60,7%). Outros genes que codificam ESBLs como $bla_{TEM\text{-}1}$ (46,4%), $bla_{CTX\text{-}M\text{-}32}$ (17,9%), $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ (7,1%), $bla_{SHV\text{-}12}$ (3,6%), $bla_{TEM\text{-}52}$ (3,6%), $bla_{OXA\text{-}1}$ (3,6%) e $bla_{TEM\text{-}59}$ (3,6%) também foram detetados (Figura 25 e Tabela 8).

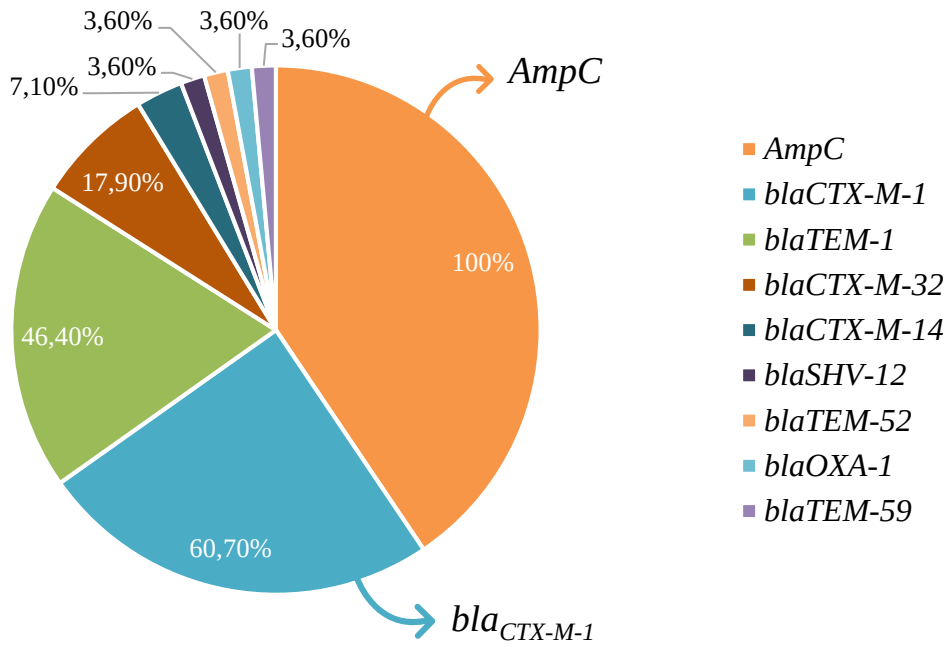


Figura 25: Percentagem de genes ESBL detetados em *E. coli*

Os isolados de *E. coli* produtoras de ESBLs pertencem a 17 tipos de MLST diferentes: ST-48 (n=5), ST-1998 (n=4), ST-1800 (n=2), ST-155 (n=2), ST-206 (n=2), ST-218 (n=2), ST-0 (n=1), ST-23 (n=1), ST-117 (n=1), ST-361 (n=1), ST-710 (n=1), ST-2847 (n=1), ST-57 (n=1), ST-66 (n=1), ST-88 (n=1), ST-215 (n=1) e ST-2345 (n=1) (Tabela 8).

Uma grande variedade de genes de resistência foram detetados [*aadA*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadA13*, *aac*(3)-*IId*, *aac*(3)-*IV*, *aac*(3)-*VIa*, *aph*(3')-*Ia*, *aph*(4)-*Ia*, *strA*, *strB*, *fusA1*, *tet*(A), *tetR*, *tet*(B), *tet*(D), *QnrS1*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *dfrA7*, *dfrA5*, *dfrA17*, *mdf*(A).*1*, *catI*, *cmlA1*, *sat-1*, *mph(B)*, *mph(A)*, *Mrx*, *mcr-1*], contudo, aqueles com maior frequência foram os genes *tet*(A) (64,3%), *tetR* (64,3%) e *sul2* (53,6%) (Figura 26 e Tabela 8). Alterações nos aminoácidos das proteínas GyrA (Ser83Leu; Ser83Leu+Asp87Asn; Ser83Leu+Ala84Pro) (57,1%) e ParC

(Ser80Ile; Ser80Arg; Ala56Thr) (42,9%) foram detetadas em 16 isolados resistentes às quinolonas (Figura 26 e Tabela 8).

O gene *mcr-1*, gene responsável pela resistência à colistina (antibiótico considerado como último recurso no tratamento de bactérias multirresistentes), foi detetado num isolado de porco para consumo (isolado SU80) (Tabela 8).

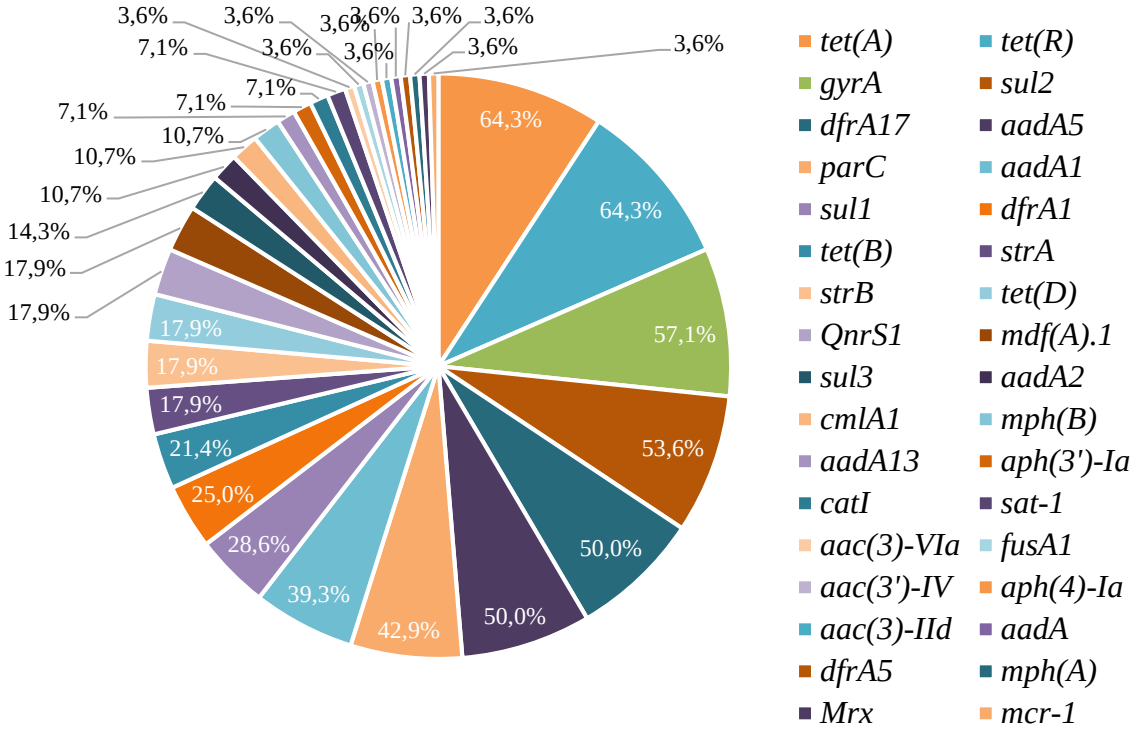


Figura 26: Percentagem de genes de resistência detetados em *E. coli*

Tabela 8: Genes de resistência detetados em isolados de *Escherichia coli* produtoras de ESBLs

Isolado	MLST	Gene β-lactamase	Outros genes de resistência
1-102	ST-1998	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, *1*, $bla_{TEM\text{-}1}$	*aadA5*, *tetR*, *tet*(A), *sul2*, *dfrA17*, *gyrA* (S83L, D87N), *parC* (S80I)
2-101	ST-1998	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{TEM\text{-}1}$	*aadA5*, *tetR*, *tet*(A), *gyrA* (S83L, D87N), *parC* (S80I), *sul2*, *dfrA17*
13-103	ST-1800	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{TEM\text{-}1}$	*aadA5*, *tetR*, *tet*(A), *gyrA* (S83L, D87N), *parC* (S80I), *sul2*, *dfrA17*
21-101	ST-1998	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{TEM\text{-}1}$	*aadA5*, *tetR*, *tet*(A), *gyrA*(S83L, D87N), *parC* (S80I), *sul2*, *dfrA17*
BU10A	ST-48	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{TEM\text{-}1}$	*aadA1*, *aadA5*, *strA*, *strB*, *tetR*, *tet*(A), *QnrS1*, *sul1*, *sul2*, *dfrA1*, *dfrA17*
BU10B	ST-48	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{TEM\text{-}1}$	*aadA1*, *aadA5*, *strA*, *strB*, *tetR*, *tet*(A), *QnrS1*, *sul1*, *sul2*, *dfrA1*, *dfrA17*
BU22A	ST-1800	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{TEM\text{-}1}$	*aadA5*, *tetR*, *tet*(A), *gyrA* (S83L, D87N), *parC* (S80I), *sul2*, *dfrA17*
BU41A	ST-48	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{TEM\text{-}1}$	*aadA1*, *aadA5*, *strA*, *strB*, *tetR*, *tet*(A), *QnrS1*, *sul1*, *sul2*, *dfrA1*, *dfrA17*
GV-23	ST-710	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{OXA\text{-}1}$	*aadA*, *tet*(B), *sul1*, *catI*, *mdf*(A).*1*
J31	ST-48	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{TEM\text{-}1}$	*aadA1*, *aadA13*, *aadA5*, *strA*, *strB*, *tetR*, *tet*(A), *QnrS1*, *sul1*, *dfrA1*, *dfrA17*
J64	ST-1998	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{TEM\text{-}1}$, $bla_{TEM\text{-}59}$	*aadA5*, *tetR*, *tet*(A), *gyrA* (S83L, D87N), *parC* (S80I), *sul2*, *dfrA17*, *mdf*(A).*1*
J69	ST-0	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$	*aadA5*, *tet*(B), *tet*(D), *gyrA* (S83L), *parC* (S80R), *sul2*, *dfrA17*, *mdf*(A).*1*
L16	ST-23	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$	*aac*(3)-*VIa*, *aadA1*, *tetR*, *tet*(A), *sul1*
L98	ST-117	*AmpC*, $bla_{SHV\text{-}12}$	*aadA1*, *aadA2*, *aph*(3')-*Ia*, *fusA1*, *gyrA* (S83L), *sul3*, *dfrA5*, *cmlA1*
TB63	ST-155	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$	*aadA5*, *gyrA* (S83L), *sul2*, *dfrA17*, *mdf*(A).*1*
W4	ST-155	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$	*tetR*, *tet*(A), *gyrA*, (S83L), *mdf*(A).*1*
W151	ST-361	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}32}$	-
SU32	ST-2345	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}32}$	*aadA13*, *tetR*, *tet*(A), *sul1*
SU50	ST-48	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{TEM\text{-}1}$	*aadA1*, *aadA2*, *tetR*, *tet*(A), *QnrS1*, *sul3*, *cmlA1*, *Mrx*, *mph*(A)
SU54	ST-206	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$	*aadA5*, *tetR*, *tet*(A), *gyrA* (S83L), *parC* (A56T), *sul2*, *dfrA17*, *mph*(B)
SU62	ST-218	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}32}$	*tet*(B), *tet*(D)
SU65	ST-218	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}32}$	*tet*(B), *tet*(D)
SU80	ST-215	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}32}$, $bla_{TEM\text{-}1}$	*aac*(3)-*IV*, *aadA1*, *aph*(3')-*Ia*, *aph*(4)-*Ia*, *strA*, *strB*, *tetR*, *tet*(A), *tet*(B), *tet*(D), *sul3*, *dfrA1*, *catI*, *sat-1*, *mcr-1*
A3A	ST-206	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$	*aadA5*, *tetR*, *tet*(A), *gyrA* (S83L), *parC* (A56T), *sul2*, *dfrA17*, *mph*(B)
A4A	ST-2847	*AmpC*	*tet*(B), *tet*(D), *gyrA* (S83L)
P6A	ST-57	*AmpC*, $bla_{TEM\text{-}1}$	*aadA1*, *gyrA* (S83L, D87N), *parC* (S80I), *sul2*, *dfrA1*, *sat-1*
M1A	ST-665	*AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$	*aac*(3)-*IId*, *aadA1*, *aadA2*, *gyrA* (S83L, A84P), *parC* (S80I), *sul3*, *cmlA1*
Pe4A	ST-88	*AmpC*, $bla_{TEM\text{-}52}$	*aadA1*, *tetR*, *tet*(A), *gyrA* (S83L), *parC* (S80R), *sul1*, *sul2*, *dfrA1*, *mph*(B)

2.4. Extração de DNA plasmídico

Para a extração do DNA plasmídico decidiu-se continuar apenas com os isolados de animais selvagens que continham o gene *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ pois, em Portugal, ainda não foi reportada nenhuma sequência completa de um plasmídeo de *E. coli* que contém este gene em animais selvagens. Este gene foi já detetado, em estudos anteriores, em isolados de seres humanos e animais domésticos (Ben Sallem *et al.*, 2014). Assim, foi extraído o DNA plasmídico das 14 amostras de origem selvagem que continham o gene *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$. Na Figura 27 e na Tabela 9 estão presentes 9 das 14 amostras que continham o gene *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$. Tendo em conta a Figura 27 e os tamanhos das bandas presentes na Tabela 9 podemos verificar a existência de 3 diferentes padrões de bandas nestas amostras. O primeiro padrão está presente nos poços 1 e 6, o segundo padrão presente nos poços 2, 8 e 9 e o terceiro padrão presente nos poços 5 e 7. Nos poços 3 e 4 podemos observar um *smear*.

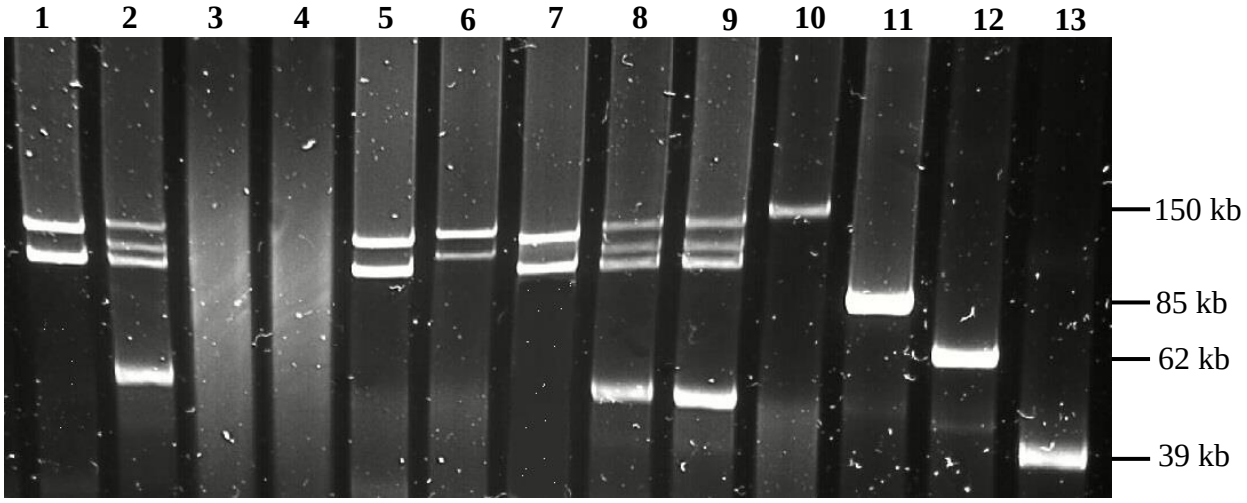


Figura 27: Gel de agarose a 0,7% com DNA plasmídico. Poços 1-9: Amostras; Poços 10-13: Marcadores moleculares. Neste gel são visíveis três padrões de bandas diferentes. Primeiro padrão nos poços 1 e 6; segundo padrão nos poços 2, 8 e 9; terceiro padrão nos poços 5 e 7. Nos poços 3 e 4 podemos observar um *smear*.

Tabela 9: Tamanho das bandas presentes na Figura 23

	1-102 (1)	**BU10A (2)**	**13-103 (3)**	**BU22A (4)**	**2-101 (5)**	**BU41A (6)**	**21-101 (7)**	**J31 (8)**	**BU10B (9)**	**Marcador Molecular**
Banda 1	138,3 kb	138,3 kb			126,1 kb	131,8 kb	127,5 kb	140,6 kb	139,7 kb	150 kb
Banda 2	114,4 kb	121,1 kb			103,4 kb	114,4 kb	105,3 kb	119,8 kb	120,5 kb	85 kb
Banda 3		110,4 kb						108,5 kb	107,8 kb	62 kb
Banda 4		58,7 kb						54,2 kb	52,7 kb	39 kb

Uma posterior pesquisa no *plasmidfinder*, juntamente com os dados fornecidos pela sequenciação, conseguimos identificar quais os plasmídeos pertencentes a cada isolado como está descrito na Tabela 10. Assim, foram detetados dois tipos diferentes de plasmídeos: IncI1 (n=13) e IncN (n=1).

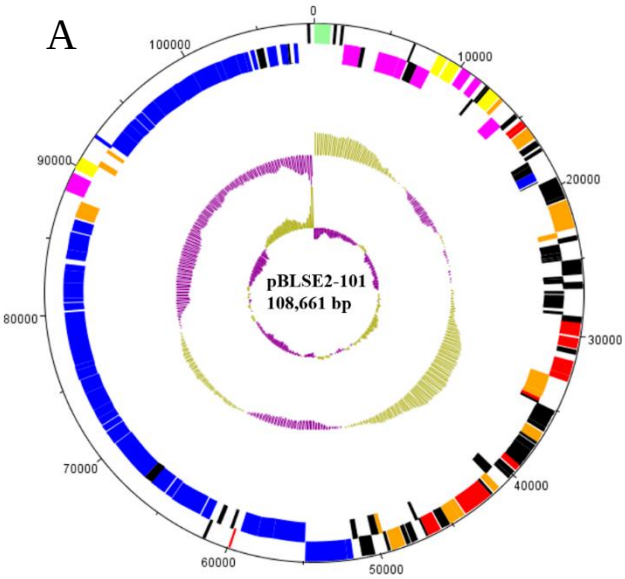
Tabela 10: Plasmídeos detetados pelo *plasmidfinder* das amostras de *E. coli* de origem selvagem que expressam $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$

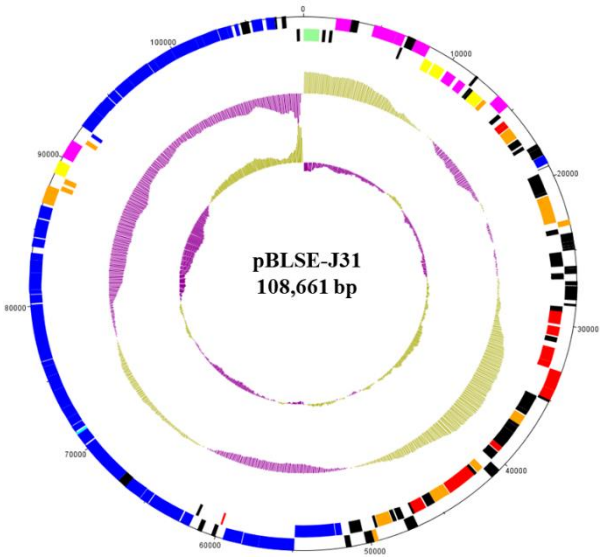
Isolado	***Plasmidfinder***	
	Sequência NCBI	**%Identidade**
13-103	IncI1	99,3%
1-102	IncI1	99,3%
21-101	IncI1	99,3%
2-101	IncI1	99,3%
BU10A	IncI1	99,3%
BU10B	IncI1	99,3%
BU41A	IncI1	99,3%
BU22A	IncI1	99,3%
J31	IncI1	99,3%
GV-23	IncN	100%
TB63	IncI1	99,3%
J69	IncI1	99,3%
J64	IncI1	99,3%
W4	IncI1	99,3%

2.5. Sequenciação por Nanoporo

Utilizando a tecnologia *Oxford Nanopore*, escolhemos dois isolados (2-101 e J-31) para serem sequenciados e para posterior reconstrução dos plasmídeos. Assim, obtivemos dois plasmídeos, pBLSE2-101 e pBLSE-J31, que formaram uma sequência circular com 108 661 bp (Figura 28-A). Foi também feita uma análise comparativa da sequência dos dois plasmídeos reconstruídos e verificámos que a única diferença entre eles era uma inversão que incluía o gene de resistência aos antibióticos (Figura 28-B).

A





Função Génica

- Genes de iniciação da replicação
- Sistema de conjugação dos plasmídeos
- Sistema de estabilidade dos plasmídeos
- Elementos móveis
- Genes de resistência a antibióticos
- Genes hipotéticos
- Outras funções

Legenda dos anéis

Anel 1: GC Skew

- GC Skew (+)
- GC Skew (-)

Anel 2: Conteúdo GC

- Conteúdo GC acima da média
- Conteúdo GC abaixo da média

B

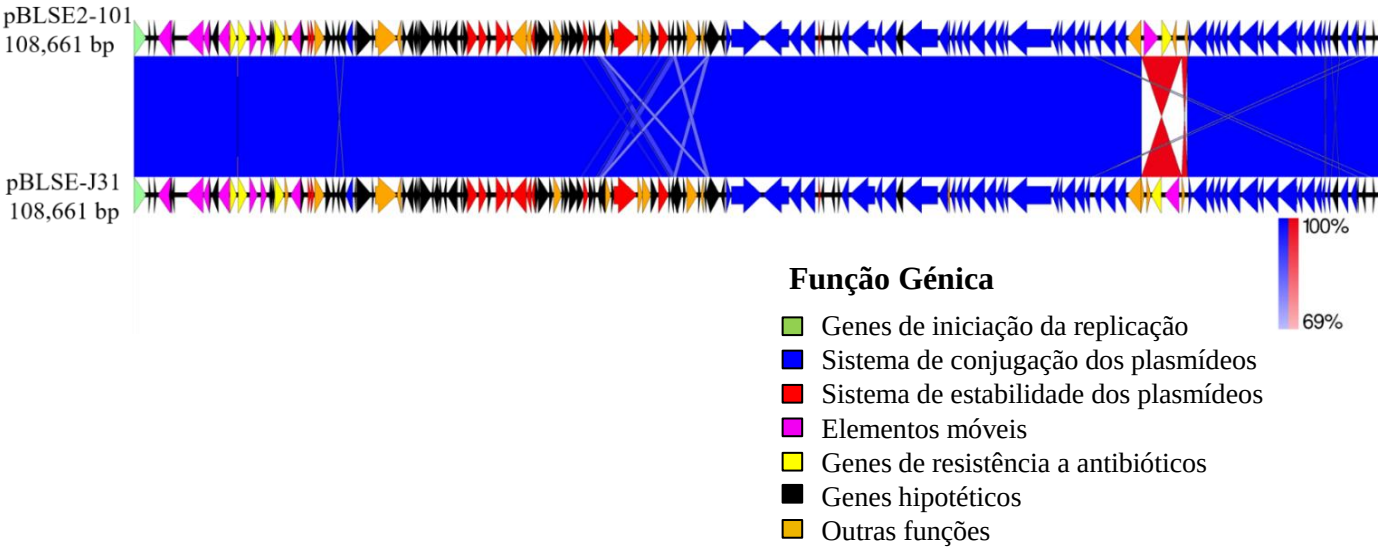


Figura 28: (A) Representação esquemática dos plasmídeos IncI1 pBLSE2-101 e pBLSE-J31. O primeiro anel indica as coordenadas do círculo completo do plasmídeo. Os dois anéis externos representam os *open reading frames forward* e *reverse*, respetivamente. (B) Análise comparativa das sequências dos plasmídeos codificadores do gene $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, pBLSE2-101 e pBLSE-J31. Blocos verticais entre as sequências indicam regiões de similaridade compartilhada. A cor azul indica a correspondência na mesma direção e a cor vermelha indica a correspondência invertida.

2.6. Análise de *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs)

Na análise de SNPs foi detetado um total de 41761 SNP e a existência de isolados de diferentes espécies com a ausência de SNPs entre eles e também a existência de isolados com origem na mesma espécie, mas com um número elevado de SNPs de diferença. Na Figura 29 podemos observar, indicado pela seta preta, três isolados (BU10A, BU10B e J31) com ausência de SNPs entre si. Os isolados BU10A e BU10B são réplicas logo, este resultado era esperado, no entanto, pensávamos que o isolado J31 teria alguns SNPs que o diferenciasse dos outros dois. O mesmo caso aconteceu com as amostras 21-101 e J64, indicadas pela seta verde na Figura 28.

Ao contrário destes casos, observámos isolados da mesma espécie, mas com um elevado número de SNPs. Estes casos são dos isolados L16 – L98 e W4 – W151, indicados pelas setas vermelhas e rosa, respetivamente.

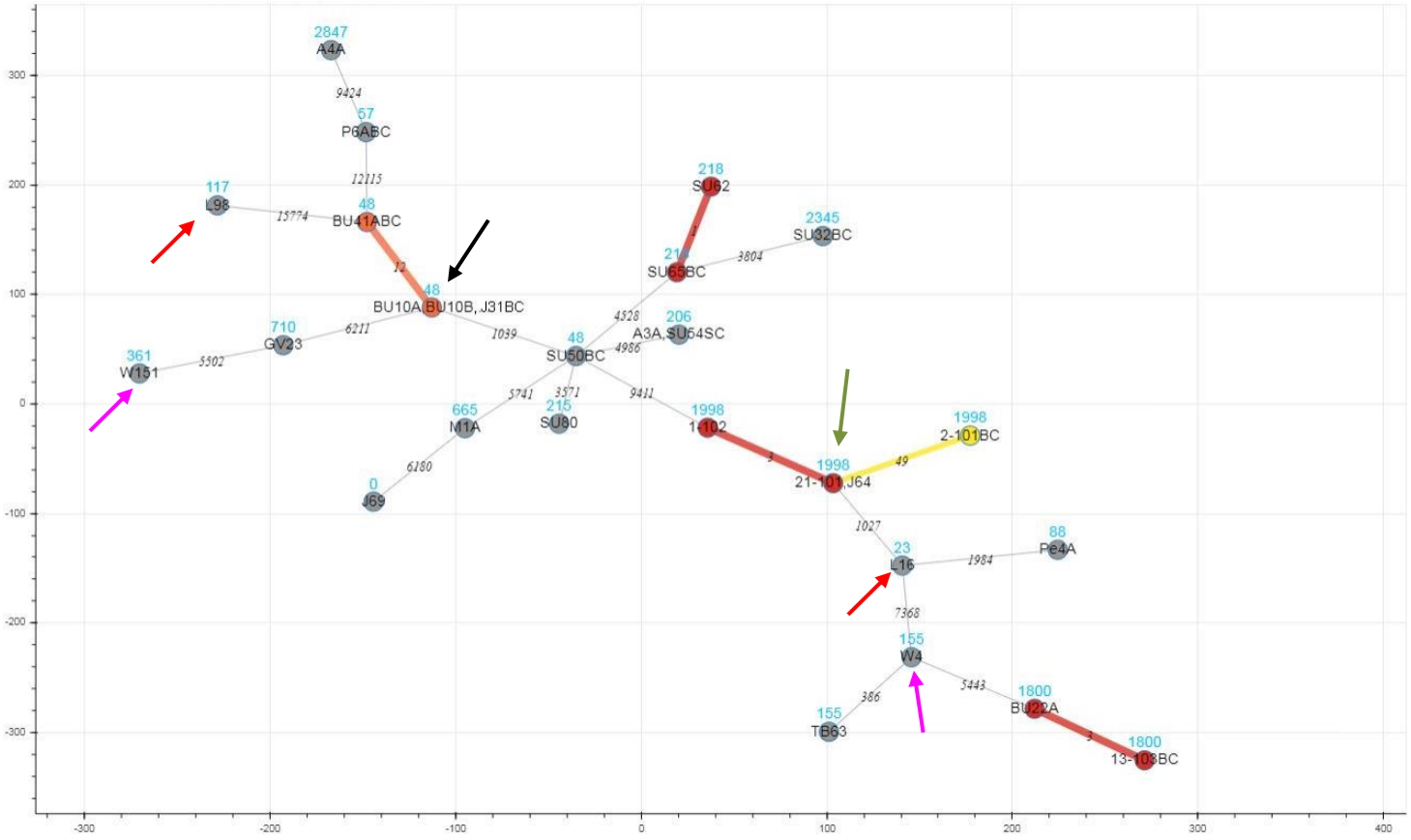


Figura 29: Rede das estirpes com base na diferença de SNPs (Total de SNPs: 41761).

Capítulo 4 – Discussão

A relação entre a disseminação de agentes antimicrobianos usados em medicina humana e veterinária e o desenvolvimento de bactérias resistentes tem sido objeto de numerosos estudos sobre bactérias patogénicas e comensais que colonizam o trato gastrintestinal de seres humanos e animais (Bronzwaer *et al.*, 2002; McEwen and Fedorka-Cray, 2002). A resistência a antibióticos confere, às bactérias, uma vantagem diferencial em ambientes onde o uso destes é frequente. O contacto direto do Homem com os animais, a sua exposição a fontes ambientais (águas, solo, vegetais) contaminadas com excreções, estrumes, águas residuais, cadáveres das explorações pecuárias e, sobretudo, os alimentos de origem animal, constituem presumíveis suportes materiais de transferência de determinantes genéticos de antibiorresistência para a microflora bacteriana comensal humana (Tollefson and Karp, 2004).

A microflora bacteriana intestinal, submetida ao *stress* do consumo de antibióticos, pode constituir um reservatório de genes de resistência e desempenhar um papel importante como dador e recetor destes genes (Sunde *et al.*, 1998; Salyers, Gupta and Wang, 2004). Deste modo, sendo *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* parte integrante da microflora intestinal de humanos e animais (Sunde *et al.*, 1998) e, dada a sua conhecida capacidade de transferir genes de resistência, estas bactérias podem ser consideradas como "indicadoras" do grau da resistência numa população (van den Bogaard and Stobberingh, 2000).

Neste estudo caracterizou-se, fenotípica e genotipicamente, a resistência aos antibióticos em isolados de *Enterococcus* spp., recolhidos de amostras de carne processada, e *Escherichia coli* recolhidos de amostras fecais de espécies de animais selvagens como, aves de rapina, águia de asa redonda, javalis, morcegos, linces, lobos e gaivotas, de animais para consumo como, suínos e de carne de galinha.

As espécies de enterococos detetadas (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus durans*) têm sido frequentemente detetadas em vários estudos realizados em carnes (Busani *et al.*, 2004; Messi *et al.*, 2006; Kasimoglu-Dogru, Gencay and Ayaz, 2010; Elal Mus *et al.*, 2017). A espécie de enterococos predominante nas amostras de carne processada foi *E. faecium*. Este facto é corroborado por dados relatados anteriormente em carne de galinha, em diferentes tipos de carne e em marisco pronto a comer (Zarfel *et al.*, 2014; Guerrero-Ramos *et al.*, 2016; Igbinosa and Beshiru, 2019). De salientar que 90,5% dos isolados (19/21) de *Enterococcus*

spp. observados no presente estudo eram VRE. Interessantemente, a espécie *Enterococcus faecalis* não foi identificada entre as estirpes VRE. Este resultado está de acordo com outros estudos realizados em alimentos de origem animal (Jung *et al.*, 2007; Çetinkaya *et al.*, 2013; Guerrero-Ramos *et al.*, 2016). Em contraste, a presença de *Enterococcus faecalis* foi relatada pela maioria dos investigadores em amostras de carne na Tunísia (Klibi *et al.*, 2013) e outros produtos alimentares de origem animal na Turquia (Elal Mus *et al.*, 2017).

As maiores percentagens de resistência a antibióticos, apresentada pelos enterococos isolados a partir das amostras de carne processada, foram à eritromicina (84,2%) e à teicoplanina (84,2%). A resistência elevada à eritromicina também foi reportada por outros autores em estudos realizados em diferentes tipos de carne na Tunísia (Klibi *et al.*, 2013) e em carne de galinha na Turquia (Yurdakul, Erginkaya and Ünal, 2013). A elevada resistência à teicoplanina foi também reportada num estudo realizado em comida de origem animal (Çetinkaya *et al.*, 2013). Os enterococos isolados das amostras de carne processada apresentaram uma alta resistência à ampicilina (68,4%) como foi observado também por Guerrero-Ramos e seu colaboradores (Guerrero-Ramos *et al.*, 2016). Antibióticos como a eritromicina e a ampicilina são considerados pela *World Organisation of Animal Health* como agentes antimicrobianos "criticamente importantes" (World Organisation for Animal Health, 2015), do mesmo modo, a *World Health Organization* (WHO) considera a teicoplanina e a vancomicina como agentes antimicrobianos "criticamente importantes" para a medicina humana (World Health Organization, 2017). Todos os isolados exibiram uma suscetibilidade aos antibióticos linezolida e cloranfenicol. A suscetibilidade a estes agentes antimicrobianos foi também detetada por Çetinkaya e colegas e por Borgen e colegas, respetivamente (Borgen *et al.*, 2001; Çetinkaya *et al.*, 2013) o que sugere a possível utilização destes antibióticos no combate a VREs.

A resistência à classe de antibióticos dos aminoglicosídeos foi confirmada pela presença dos genes *aac*(6')-*Ii* (n=15), *ant*(9)-*Ia* (n=7), *aadE* (n=6), *aac*(6')-*ih* (n=2) e *aac*(6')-*Ie*-*aph*(2")-*Ia* (n=1). Vários estudos reportam a presença de genes que conferem resistência à classe de antibióticos dos aminoglicosídeos, por exemplo, um estudo comparativo entre isolados de humanos, de porcos e de carne de porco reportou a presença dos genes *aac*(6')-*Ie*-*aph*(2")-*Ia* e *aadE* em *E. faecium* e em *E. faecalis* (Thu *et al.*, 2019). Este estudo também reportou a presença de outro gene, para além dos mencionados anteriormente, pertencente à mesma classe, o gene *aph*(3')-*IIIa*. Outro estudo, realizado na Dinamarca, também reportou a presença do gene *aadE*

num *E. faecium* isolado de uma amostra de carne de peru (Cavaco *et al.*, 2017). Num outro trabalho, realizado em enterococci isolados de carcaças de aves, publicado em 2004, foi detetada a presença do gene *aac*(6')-*Ii* na maioria dos isolados (52/162) (Jackson *et al.*, 2004), assim como se verificou neste estudo. Relativamente aos restantes genes mencionados, um estudo realizado em fezes de bovino reportou a presença do gene *aac*(6')-*Iih* em 10 isolados de *E. hirae*, enquanto que, no nosso estudo foi encontrado em *E. durans*, e do gene *ant*(9)-*Ia* em apenas um isolado de *E. faecium* como no nosso estudo (Beukers *et al.*, 2017).

Os genes *tet*(M) e *tet*(L) estão associados à resistência às tetraciclinas em enterococos (Aarestrup *et al.*, 2000). Neste trabalho, esta combinação foi detetada em 63,2% dos isolados de enterococos o que sugere a concordância com este facto. Também, um estudo em enterococos isolados de carne, na Tunísia, divulgaram a presença da combinação *tet*(M) + *tet*(L) em 33 dos 119 isolados estudados (Klibi *et al.*, 2013). Um estudo demonstrou anteriormente, que a transferência horizontal dos genes *tet*(M) e *tet*(L) em espécies de enterococci pode estar associada ao transposão conjugativo Tn916-Tn1545, sem a aquisição de plasmídeos detetáveis (Huys *et al.*, 2004). O uso comum de tetraciclinas em animais para consumo é, provavelmente, uma pressão seletiva para ambos os genes.

Vários estudos reportam os genes *erm*(A) e *erm*(B) como os mais comuns mediadores da resistência aos macrólidos tanto em animais como em humanos (Emaneini *et al.*, 2016; Thu *et al.*, 2019). No entanto, neste estudo não foi detetado o gene *erm*(A), como tal, foi apenas detetado o gene *erm*(B), como no estudo realizado em carne na Tunísia (Klibi *et al.*, 2013), assim como outros genes que também conferem resistência a esta classe de antibióticos como, *lsa*(E), *mef*(A) e *erm*(T). Estudos realizados em amostras fecais de animais para consumo, como bovinos e porcos, detetaram a presença do gene *lsa*(E) numa amostra de *E. faecium* de bovino (Beukers *et al.*, 2017) e em 37 amostras (53,6%) de porcos (Li *et al.*, 2014). Apesar destes estudos não terem sido realizados em carne, é também importante sublinhar que estes animais irão servir de alimento para o ser humano e possivelmente transmitir esta resistência. Um trabalho efetuado em *Nham* (carne de porco fermentada usada na cozinha tailandesa) detetou a presença do gene *mef*(A) em apenas uma amostra de *E. hirae* (Chotinantakul, Chansiw and Okada, 2018) enquanto que neste estudo foi detetada em *E. gallinarum*. Relativamente ao gene *erm*(T), foi primeiramente reportado em enterococci de isolados clínicos em 2008 por DiPersio e seus colaboradores (DiPersio *et al.*, 2008), contudo, estudos concretizados em produtos alimentares não reportam a presença deste gene.

Os genes *erm*(B) e *tet*(M) foram, frequentemente, descritos como associados, numa mesma estirpe, uma vez que os genes de resistência à tetraciclina são regularmente encontrados na mesma unidade móvel, o transposão Tn1545, que contém os genes de resistência aos macrólidos. Similarmente, neste estudo, no isolado de *E. faecium* resistente aos dois antibióticos referidos anteriormente, verificou-se a presença dos genes *erm*(B) e *tet*(M). Contudo, esta associação não é uma regra, uma vez que outros mecanismos de resistência podem estar presentes nos isolados em que nenhum gene de resistência a macrólidos foi encontrado (De Leener *et al.*, 2005).

A resistência à vancomicina e ampicilina são dois dos perfis de resistência mais comuns e problemáticos em enterococos, especialmente em *E. faecium*. Enquanto que os genes codificadores *vanA* e *vanB*, associados à resistência à vancomicina, são considerados clinicamente relevantes em *E. faecium* e *E. faecalis*, o gene *vanC* é uma característica intrínseca de *E. gallinarum* (Fang *et al.*, 2012). Os genes *vanA* ou *vanC* estavam presentes em todos os isolados resistentes à vancomicina analisados neste trabalho, o que permite confirmar a presença de VREs entre os isolados de carne processada. A maioria dos isolados *vanA*-positivos eram *E. faecium*, no entanto, este gene foi também detetado na espécie *E. durans* e, interessantemente, num isolado da espécie *E. gallinarum*. Similarmente, num estudo realizado em carnes cruas, em Itália, foi também reportada a presença da combinação *vanA* + *vanC* num *E. gallinarum* (Del Grosso *et al.*, 2000). Estes resultados sugerem que não apenas *E. faecium*, mas também outros enterococos *vanA*-positivos estão presentes em produtos cárneos e são potencialmente capazes de se dispersar para humanos e/ou disseminar os determinantes *vanA*.

Outros genes foram detetados neste trabalho como *lnu*(B), *msr*(C), *msr*(D), *cls*, *liaS*, *liaR*, *dfrG*, *dfrK*, *efmA* e *adeC*. Também outros investigadores detetaram a presença de alguns destes genes em enterococci, por exemplo, Cavaco e seus colaboradores, em 2017, reportaram a presença dos genes *lnu*(B) e *msr*(C) (Cavaco *et al.*, 2017), López junto com colegas reportaram, em 2012, a presença dos genes *dfrG* e *dfrK* (López *et al.*, 2012), Beukers e colaboradores, em 2017, detetaram a presença do gene *adeC* (Beukers *et al.*, 2017) e os genes *cls*, *liaS* e *liaR* foram detetados por Lellek e colegas em 2015 (Lellek *et al.*, 2015).

Estes resultados indicam que os consumidores estão expostos a VREs de vários alimentos de origem animal. Isso pode ser diretamente pelo consumo de alimentos contaminados ou indiretamente pela contaminação cruzada com outros alimentos durante o processamento.

A prevalência de *E. coli* produtoras de ESBLs foi de 62,2% (28/45). Resultados semelhantes foram obtidos num estudo realizado em galinhas para consumo, nas Filipinas, cuja percentagem de prevalência foi de 66,67% (Gundran *et al.*, 2019).

Todas as estirpes de *Escherichia coli* produtoras de ESBLs isoladas a partir de amostras fecais de animais selvagens, de animais para consumos e de carne de galinha apresentaram resistência aos antibióticos ampicilina, ticarcilina e piperacilina. A resistência à ampicilina foi também reportada por outros autores em amostras de galinhas para consumo, nas Filipinas (Gundran *et al.*, 2019), em amostras de diferentes tipos de carne e de amostras fecais de gado, nos Estados Unidos da América (Tadesse *et al.*, 2018) e também em amostras de galinhas para consumo, na Zâmbia (Chishimba *et al.*, 2016). A resistência à ticarcilina e à piperacilina está em concordância com o estudo realizado, recentemente, em amostras de morcego-vampiro selvagens e de animais para consumo, no Peru (Benavides *et al.*, 2018). Neste estudo foi também detetada uma resistência elevada à cefuroxima (96,4%) e à cefotaxima (96,4%). Relativamente à resistência à cefuroxima, Gundran e seus colegas reportaram uma percentagem similar de 95,65% (Gundran *et al.*, 2019). Considerando a cefotaxima, percentagens semelhantes forma reportadas num estudo realizado em corujas selvagens no Chile (Fuentes-Castillo *et al.*, 2019). Também neste estudo foi detetada suscetibilidade aos antibióticos cefoxitina, imipenem, amicacina e fosfomicina. O estudo concretizado por Benavides e colaboradores, em 2018 (Benavides *et al.*, 2018), e por Gundran e colaboradores, em 2019, observaram, de igual modo, a suscetibilidade destes antibiótico com a exceção da fosfomicina. No entanto, a suscetibilidade à fosfomicina já foi encontrada num estudo realizado com animais em frequente contacto com humanos (cães, gatos, macacos, cavalos, ovelhas, cabras, falcões e pombos) (Suay-García *et al.*, 2019). A fosfomicina é considerada pela *World Organisation of Animal Health* como agente antimicrobiano "altamente importantes" (World Organisation for Animal Health, 2015), assim, visto que detetamos suscetibilidade a este antibiótico, podemos afirmar que a fosfomicina não tem sido utilizada em demasia na medicina veterinária.

Relativamente às enzimas β-lactamases de largo espetro, detetamos vários genes que codificam diferentes tipos de β-lactamases como *AmpC*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{TEM\text{-}1}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}32}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$, $bla_{SHV\text{-}12}$, $bla_{TEM\text{-}52}$, $bla_{OXA\text{-}1}$ e $bla_{TEM\text{-}59}$. Tendo em conta que, em *E. coli*, *AmpC* se expressa de forma constitutiva, pois se encontra localizado no cromossoma bacteriano provocando a síntese desta enzima, já era esperada a sua presença em todas as nossas amostras.

Nos isolados de origem selvagem o gene ESBL mais frequente é o *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, seguido pelos *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ e *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}32}$. Segundo Wang e seus colaboradores, os genes *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ e *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ são comumente reportados em animais selvagens e são os genes ESBL mais prevalentes, seguidos pelos *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}14}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}32}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}9}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}3}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}2}$ e *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}22}$ (Wang *et al.*, 2017). Para além dos genes do tipo *bla*$_{CTX\text{-}M}$, também os tipos *bla*$_{TEM}$ e *bla*$_{SHV}$ têm sido encontrados em animais selvagens. Neste estudo detetamos os genes *bla*$_{TEM\text{-}1}$, *bla*$_{TEM\text{-}59}$ e *bla*$_{SHV\text{-}12}$. Por exemplo, o gene *bla*$_{SHV\text{-}12}$ tem sido encontrado em aves selvagens, na Espanha (Alcalá *et al.*, 2016) e em gaivotas, na Suécia (Atterby *et al.*, 2017), também o gene *bla*$_{TEM\text{-}1}$ foi reportado em javalis e macacos-de-Gibraltar, na Argélia (Bachiri *et al.*, 2017) e em aves selvagens, na Tunísia (Ben Yahia *et al.*, 2018). O gene *bla*$_{TEM\text{-}59}$ foi, primeiramente, reportado em 1999 num isolado clínico (Bermudes *et al.*, 1999) e, até aos dias de hoje, nunca tinha sido encontrado em isolados de animais. Também detetamos, num isolado selvagem, um gene pertencente a outro tipo de ESBL, o gene *bla*$_{OXA\text{-}1}$. Este já foi detetado em animais selvagens, em aves aquáticas selvagens, na polónia (Literak *et al.*, 2010).

De acordo com Madec e Haenni os gene *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, *bla*$_{TEM\text{-}52}$ e *bla*$_{SHV\text{-}12}$ predominam nos isolados de animais para consumo, especialmente no Norte da América (Madec and Haenni, 2018). Nos nossos isolados de animais para consumo e de carne de galinha, foram encontrados dois destes genes, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ e *bla*$_{TEM\text{-}52}$, assim como, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}32}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ e *bla*$_{TEM\text{-}1}$. Outros estudos realizados também em animais para consumo e carne reportaram a presença destes genes, no Japão, no Peru, na Nigéria e na Argélia (Matsumoto *et al.*, 2014; Benavides *et al.*, 2018; Chah *et al.*, 2018; Rebbah *et al.*, 2018).

O sucesso da disseminação dos genes CTX-M depende da natureza clonal das estirpes que expressam os genes de resistência e os elementos móveis responsáveis pela sua captura e disseminação. *E. coli* ST-131 e ST-405 são os tipos de sequência mais associados com o aumento mundial repentino dos genes CTX-M, incluindo o *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ (Peirano and Pitout, 2010) e outros genes CTX-M, como *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}3}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}10}$ e *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ (Naseer and Sundsfjord, 2011). Nenhum de nossos isolados *bla*$_{CTX\text{-}M}$ positivos pertencia a ST-131 ou ST-405, indicando que a disseminação dos genes CTX-M não está associada com as estirpes clonais estabelecidas. Também observámos, neste estudo, que diferentes STs podem possuir o mesmo gene CTX-M e, Tadesse e seus colaboradores, observaram que o mesmo ST pode possuir diferentes genes CTX-M (Tadesse *et al.*, 2018), indicando o potencial do mesmo ST para disseminar múltiplos genes CTX-M.

Em relação aos outros genes de resistência os mais frequentes foram o *tet*(A) e o *tetR* que conferem resistência às tetraciclinas e o *sul2* que confere resistência às sulfonamidas.

Apesar de se conhecerem diversos genes codificadores da resistência à tetraciclina em bactérias Gram-negativas, existem dois, *tet*(A) e *tet*(B), que estão mais associados à resistência à tetraciclina em estirpes de *E. coli*, isoladas de animais e humanos (Bryan, Shapir and Sadowsky, 2004). Contudo, neste trabalho não foi detetado o gene *tet*(B), mas foi detetado o gene *tetR*. Esta associação, *tet*(A)+*tetR*, não é frequentemente reportada, porém, um estudo realizado em *Laribacter hongkongensis* isolados em rãs e peixes de água doce detetou o gene *tet*(A) em 26,1% dos isolados e o gene *tetR* em 27,3% dos isolados (Wang *et al.*, 2019).

Neste estudo também obtivemos uma frequência alta (53,6%) do gene *sul2*. Este gene, assim como, os genes *sul1* e *sul3* são os mais reportados. Vários estudos têm detetado este, e os outros genes, tanto em isolados de animais selvagens como em animais para consumo (Schaufler *et al.*, 2016; Tadesse *et al.*, 2018).

A resistência às quinolonas em *E. coli* está relacionada, principalmente, com mutações que ocorrem nos genes *gyrA* e *parC*. As substituições Ser83Leu (GyrA) e Ser80Ile (ParC) foram as mais frequentemente detetadas nos nossos isolados de *E. coli* resistentes às quinolonas e resultados semelhantes foram reportados por outros autores (Schaufler *et al.*, 2016; Kilani *et al.*, 2019; Na *et al.*, 2019).

Também o gene *mcr-1*, que confere resistência ao antibiótico colistina, foi detetado num isolado de animal para consumo. Outros autores, também em Portugal, já detetaram a presença deste gene em isolados de animais para consumo (Kieffer *et al.*, 2017; Clemente *et al.*, 2019), mas também em gaivotas selvagens (Ahlstrom *et al.*, 2019). A colistina continua a ser uma das poucas opções de tratamento para infeções bacterianas resistentes aos carbapenems, tornando-se um importante antibiótico de última instância. Um aumento na prevalência de bactérias que expressam o gene *mcr-1* ameaça a capacidade de tratar infeções resistentes a múltiplos antibióticos (Shen *et al.*, 2016).

IncI1 tornou-se uma das famílias de plasmídeos mais comuns em Enterobacteriaceae, tanto de origem animal como humana. Os plasmídeos IncI1 são caracterizados pela presença de um *cluster* que codifica o pilus tipo IV. Estes pili peculiares são considerados um fator de virulência que, em associação com determinantes de resistência, determinam o sucesso da disseminação deste plasmídeo (Carattoli, 2013). Também se comprovou que este é um dos principais plasmídeos a

contribuir para a disseminação do gene *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ em animais, no ambiente e em humanos (Zurfluh *et al.*, 2014). Neste estudo, 13 isolados *E. coli* de origem em animais selvagens estavam associados ao plasmídeo IncI1. Na costa do mar Báltico na Polónia, bactérias produtoras de ESBLs isoladas de aves aquáticas possuíam, predominantemente, o gene *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ localizado no plasmídeo IncI1 (Literak *et al.*, 2010). Similarmente, um estudo realizado na Holanda reportaram a distribuição do plasmídeo IncI1 possuidor do gene *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ entre *E. coli* isoladas de diversas aves selvagens (Veldman *et al.*, 2013). Esta associação foi também detetada, mais recentemente, em *E. coli* produtoras de ESBLs isoladas de vários tipos de carne e em animais para consumo (Tadesse *et al.*, 2018).

Para além do plasmídeo IncI1, o gene *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ foi também detetado no plasmídeo IncN em apenas 1 isolado. Similarmente, também no estudo realizado nas aves aquáticas na Polónia, foi detetada a mesma associação (Literak *et al.*, 2010). Entre porcos para consumo e os trabalhadores das quintas, também já foi encontrado o plasmídeo IncN associado ao gene *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, num estudo realizado na Dinamarca (Moodley and Guardabassi, 2009). O facto de encontrarmos ambas associações em animais para consumo, é possível sugerir que estes animais sejam a origem da transmissão destes plasmídeos para os animais selvagens.

No que respeita a análise de SNPs, foi possível fazer o estudo genómico comparativo de todas as estirpes, permitindo, assim, a deteção de estirpes que, sendo originárias da mesma espécie em estudo, apresentavam uma grande diferença entre si, por exemplo, as estirpes L16 – L98 e W4 – W151. As estirpes L16 – L98 são de um estudo realizado em linces, cujas amostras foram isoladas de linces selvagens e de linces que se encontravam em cativeiro. Logo, a diferença de SNPs, existente entre estas duas estirpes, poderá dever-se ao facto de que uma das estirpes foi isolada de um lince em cativeiro e a outra de um lince selvagem, que por sua vez, nunca terão entrado em contacto um com o outro. As estirpes W4 – W151 foram isoladas num estudo realizado em lobos ibéricos e as amostras foram recolhidas de cinco locais diferentes. Possivelmente, estas estirpes terão sido isoladas de dois lobos que habitavam locais distantes um do outro e nunca terão estado em contacto.

Com esta análise foi, também, possível a deteção de estirpes com origens diferentes apresentarem uma ausência de SNPs. Este caso foi detetado nas estirpes BU10A – BU10B – J31 e 21-101 – J64. No primeiro caso, as estirpes BU10A e BU10B foram isoladas de aves selvagens e são réplicas uma da outra logo, era esperado que não fossem detetados SNPs entre elas. No

entanto, a estirpe J31 foi isolada de um javali e a possível explicação para esta ausência de SNPs será que a ave terá voado para o local onde os javalis se encontravam e, de certa forma, terão entrado em contacto um com o outro. No segundo caso, a estirpe 21-101 foi isolada de uma ave de rapina e a estirpe J64 foi isolada também de um javali. A possível explicação para este caso é também a possibilidade de a ave de rapina ter voado para o local onde os javalis se encontravam e terão entrado em contacto, direto ou indireto, um com o outro. No geral, as restantes estirpes mostraram uma elevada diversidade entre elas.

Capítulo 5 – Conclusões

Nas últimas décadas, a pressão seletiva associada à resistência aos antibióticos tem vindo a aumentar. As bactérias têm desenvolvido diversos mecanismos de resistência, os quais possibilitam a transferência horizontal de genes resistentes a outras bactérias, sendo encontrados em diferentes habitats, atingindo desde animais de pecuária/domésticos, mas também animais selvagens marinhos e terrestres.

Este estudo realizado em amostras de diferentes ambientes (animais selvagens, animais para consumo e diferentes produtos cárneos) possibilitou a avaliação da resistência em duas espécies bacterianas diferentes. A partir dos dados obtidos, foi possível verificar que o problema da resistência a agentes antimicrobianos está presente tanto nos isolados de *Enterococcus* spp. como em isolados de *E. coli*.

A prevalência de VREs em isolados de carne processada foi de 90,5% e a espécie de enterococos predominante foi *E. faecium*. As maiores percentagens de resistência a antibióticos, apresentada pelos isolados de enterococos foram à eritromicina e à teicoplanina com prevalência dos genes *erm*(B) e *vanA*.

O presente estudo relata a contaminação de alimentos de origem animal com VRE em Portugal. Os resultados obtidos confirmam a presença de VRE em alimentos e destacam o seu potencial na disseminação da resistência à vancomicina na natureza. Como a vancomicina é o antibiótico de último recurso usado para controlar infeções causadas por enterococos, devemos ter especial atenção à análise de VREs em alimentos de origem animal e ao uso controlado de antimicrobianos em medicina veterinária e pecuária.

A prevalência de *E. coli* produtoras de ESBLs foi de 62,2% e todos os isolados apresentaram resistência aos antibióticos ampicilina, ticarcilina e piperacilina. O gene ESBL mais frequente foi o $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ e foi associado, maioritariamente, ao plasmídeo IncI1. Reportamos também a sequência completa de dois plasmídeos IncI1 de *E. coli* de origem selvagem. Este tipo de plasmídeos está altamente relacionado com a disseminação de genes ESBL pois já foi reportado em vários estudos realizados em humanos e animais (Carattoli, 2009). A transferência deste plasmídeo, portador de vários genes de resistência, para bactérias patogénicas causará um grave problema para a saúde pública, pois o seu combate será difícil e limitado.

Independentemente da origem geográfica, CTX-M-14 e CTX-M-15 são tipos de ESBLs predominantes em isolados clínicos humanos (Woodford, Turton and Livermore, 2011), enquanto as enzimas CTX-M-1 são, em geral, mais comuns em animais de pecuária (Bevan, Jones and Hawkey, 2017). Assim, a fonte das nossas estirpes bacterianas nos animais selvagens, provavelmente, será dos animais de origem pecuária, uma vez que, a identificação de um destes dois grupos de β-lactamases em isolados selvagens pode-nos dar informação sobre a fonte ser humana ou pecuária.

Podemos também concluir que as *E. coli* produtoras de ESBLs se disseminaram em várias espécies inclusive em aves. Estas podem ser consideradas disseminadoras de resistência a antibióticos, uma vez que, podem migrar longas distâncias em curtos períodos de tempo, representando um sério risco para a disseminação global de bactérias resistentes a múltiplos fármacos.

Apesar dos animais selvagens não estarem expostos diretamente aos antibióticos, eles são afetados pelo seu uso excessivo na medicina humana e veterinária. Habitats influenciados pelo Homem criam importantes fontes de bactérias resistentes para o meio ambiente e a vida selvagem. Animais selvagens que tendem a viver perto de humanos, que procuram alimentos em cidades, em aterros sanitários ou em áreas com agricultura intensiva, têm maior probabilidade de transportarem bactérias resistentes do que animais em áreas cuja pegada humana é limitada.

No futuro poderá ser possível a realização de mais estudos com o objetivo de investigar a prevalência de bactérias resistentes a antibióticos nos seres humanos e em amostras do meio ambiente, relacionando assim os três contextos que o conceito *One Health* aborda, de forma a possibilitar a identificação das vias de transmissão de bactérias resistentes a antibióticos e dos seus genes resistentes.

Capítulo 6 – Referências

Aarestrup, F. M. *et al.* (2000) 'Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 37(2), pp. 127–137. doi: 10.1016/S0732-8893(00)00130-9.

Ahlstrom, C. A. *et al.* (2019) 'Early emergence of *mcr-1* -positive Enterobacteriaceae in gulls from Spain and Portugal', *Environmental Microbiology Reports*, 11(5), pp. 669–671. doi: 10.1111/1758-2229.12779.

Alcalá, L. *et al.* (2016) 'Wild Birds, Frequent Carriers of Extended-Spectrum β-Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 Types', *Microbial Ecology*, 72(4), pp. 861–869. doi: 10.1007/s00248-015-0718-0.

Alekshun, M. N. and Levy, S. B. (2007) 'Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance', *Cell*, 128(6), pp. 1037–1050. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.004.

Allen, H. K. *et al.* (2010) 'Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments', *Nature reviews. Microbiology*, 8(4), pp. 251–259. doi: 10.1038/nrmicro2312.

Arias, C. A. and Murray, B. E. (2012) 'The rise of the *Enterococcus*: Beyond vancomycin resistance', *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), pp. 266–278. doi: 10.1038/nrmicro2761.

Atterby, C. *et al.* (2017) 'ESBL-producing *Escherichia coli* in Swedish gulls—A case of environmental pollution from humans?', *PLoS ONE*, 12(12), p. e0190380. doi: 10.1371/journal.pone.0190380.

Axelrod, D. (2001) 'Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology', *Traffic*, 2(11), pp. 764–774. doi: 10.1034/j.1600-0854.2001.21104.x.

Bachiri, T. *et al.* (2017) 'High rates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in wild boars and Barbary macaques in Algeria', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 8, pp. 35–40. doi: 10.1016/j.jgar.2016.10.005.

Balzer, S. *et al.* (2010) 'Characteristics of 454 pyrosequencing data-enabling realistic simulation with flowsim', *Bioinformatics*, 26(18), pp. i420–i425. doi: 10.1093/bioinformatics/btq365.

Barlow, R. S. and Gobius, K. S. (2006) 'Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(6), pp. 1133–1138. doi: 10.1093/jac/dkl423.

Belluco, S. *et al.* (2016) '*Escherichia coli* and Enterobacteriaceae counts on poultry carcasses along the slaughterline: A systematic review and meta-analysis', *Food Control*, 60, pp. 269–280. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.07.033.

Benavides, J. A. *et al.* (2018) 'Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in common vampire bats *Desmodus rotundus* and livestock in Peru', *Zoonoses and Public Health*,

65(4), pp. 454–458. doi: 10.1111/zph.12456.

Bennett, P. M. (2008) 'Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria', *British Journal of Pharmacology*, 153(S1), pp. S347–S357. doi: 10.1038/sj.bjp.0707607.

Bentley, D. R. *et al.* (2008) 'Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry', *Nature*, 456(7218), pp. 53–59. doi: 10.1038/nature07517.

Bermudes, H. *et al.* (1999) 'Molecular characterization of TEM-59 (IRT-17), a novel inhibitor-resistant TEM-derived beta-lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella oxytoca*', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 43(7), pp. 1657–61.

Besser, J. *et al.* (2018) 'Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections', *Clinical Microbiology and Infection*, 24(4), pp. 335–341. doi: 10.1016/j.cmi.2017.10.013.

Beukers, A. G. *et al.* (2017) 'Comparative genomics of *Enterococcus* spp. isolated from bovine feces', *BMC Microbiology*, 17(1), p. 52. doi: 10.1186/s12866-017-0962-1.

Bevan, E. R., Jones, A. M. and Hawkey, P. M. (2017) 'Global epidemiology of CTX-M β-lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), pp. 2145–2155. doi: 10.1093/jac/dkx146.

BioMérieux (2018) *VITEK® MS*. Available at: https://www.biomerieux.pt/microbiologia-industrial/industria-biofarmaceutica/vitekr-ms?dest=view (Accessed: 16 October 2018).

Blair, J. M. A. *et al.* (2015) 'Molecular mechanisms of antibiotic resistance', *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), pp. 42–51. doi: 10.1038/nrmicro3380.

Blake, D. P. *et al.* (2003) 'Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions', *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), pp. 428–436. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01988.x.

van den Bogaard, A. E. and Stobberingh, E. E. (2000) 'Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans', *International journal of antimicrobial agents*, 14(4), pp. 327–35. doi: 10.1016/s0924-8579(00)00145-x.

Bonnet, R. (2004) 'Growing Group of Extended-Spectrum β-Lactamases: The CTX-M Enzymes', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), pp. 1–14. doi: 10.1128/AAC.48.1.1-14.2004.

Bonten, M. J., Willems, R. and Weinstein, R. A. (2001) 'Vancomycin-resistant enterococci: Why are they here, and where do they come from?', *Lancet Infectious Diseases*, 1(5), pp. 314–325. doi: 10.1016/S1473-3099(01)00145-1.

Borgen, K. *et al.* (2001) 'VanA-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned', *International Journal of Food*

Microbiology, 64(1–2), pp. 89–94. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00435-9.

Bradford, P. A. (2001) 'Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat', *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), pp. 933–941. doi: 10.1128/CMR.14.4.933-951.2001.

Bravo-Angel, A. M. *et al.* (1999) 'Bacterial conjugation protein MobA mediates integration of complex DNA structures into plant cells', *Journal of Bacteriology*, 181(18), pp. 5758–5765.

Bronzwaer, S. L. A. M. *et al.* (2002) 'The Relationship between Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in Europe', *Emerging Infectious Diseases*, 8(3), pp. 278–282. doi: 10.3201/eid0803.010192.

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

Busani, L. *et al.* (2004) 'Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and -resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections', *International journal of food microbiology*, 97(1), pp. 17–22. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.008.

Bush, K. (2013a) 'Proliferation and significance of clinically relevant β-lactamases', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277, pp. 84–90. doi: 10.1111/nyas.12023.

Bush, K. (2013b) 'The ABCD's of Beta-lactamase nomenclature', *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19(4), pp. 549–559.

Butaye, P., Devriese, L. A. and Haesebrouck, F. (2003) 'Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria', *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), pp. 175–188. doi: 10.1128/CMR.16.2.175-188.2003.

Carattoli, A. (2009) 'Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), pp. 2227–2238. doi: 10.1128/AAC.01707-08.

Carattoli, A. (2013) 'Plasmids and the spread of resistance', *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), pp. 298–304. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.001.

Cavaco, L. M. *et al.* (2017) 'Detection of linezolid resistance due to the *optrA* gene in *Enterococcus faecalis* from poultry meat from the American continent (Colombia)', *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 72(3), pp. 678–683. doi: 10.1093/jac/dkw490.

Çetinkaya, F. *et al.* (2013) 'Prevalence and antibiotic resistance of vancomycin-resistant enterococci in animal originated foods', *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(5), pp. 588–593. doi: 10.3906/vet-1211-34.

Chah, K. F. *et al.* (2018) 'Detection and molecular characterisation of extended-spectrum β-lactamase-producing enteric bacteria from pigs and chickens in Nsukka, Nigeria', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 15, pp. 36–40. doi: 10.1016/j.jgar.2018.06.002.

Chishimba, K. *et al.* (2016) 'Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Market-Ready Chickens in Zambia', *International Journal of Microbiology*, 2016, pp. 1–5. doi: 10.1155/2016/5275724.

Chong, Y., Ito, Y. and Kamimura, T. (2011) 'Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*', *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), pp. 1499–1504. doi: 10.1016/j.meegid.2011.06.001.

Chotinantakul, K., Chansiw, N. and Okada, S. (2018) 'Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from Thai fermented pork in Chiang Rai Province, Thailand', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 12, pp. 143–148. doi: 10.1016/j.jgar.2017.09.021.

Clarke, J. *et al.* (2009) 'Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing', *Nature Nanotechnology*, 4(4), pp. 265–270. doi: 10.1038/nnano.2009.12.

Clemente, L. *et al.* (2019) 'Revealing *mcr-1* -positive ESBL-producing *Escherichia coli* strains among Enterobacteriaceae from food-producing animals (bovine, swine and poultry) and meat (bovine and swine), Portugal, 2010–2015', *International Journal of Food Microbiology*, 296, pp. 37–42. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.006.

Coates, A. R., Halls, G. and Hu, Y. (2011) 'Novel classes of antibiotics or more of the same?', *British Journal of Pharmacology*, 163(1), pp. 184–194. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x.

Costa, D. *et al.* (2006) 'Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(6), pp. 1311–1312. doi: 10.1093/jac/dkl415.

Darmon, E. and Leach, D. R. F. (2014) 'Bacterial Genome Instability', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. American Society for Microbiology, 78(1), pp. 1–39. doi: 10.1128/MMBR.00035-13.

Davies, J. and Davies, D. (2010) 'Origins and Evolution of Antibiotic Resistance', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), pp. 417–433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10.

Daza, R., Gutiérrez, J. and Piédrola, G. (2001) 'Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18(3), pp. 211–215. doi: 10.1016/S0924-8579(01)00389-2.

Deamer, D., Akeson, M. and Branton, D. (2016) 'Three decades of nanopore sequencing', *Nature Biotechnology*, 34, pp. 518–524. doi: 10.1038/nbt.3423.

Devriese, L. A. *et al.* (1992) 'Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats', *Journal of Applied Bacteriology*, 73(5), pp. 421–425.

doi: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04998.x.

Diekema, D. *et al.* (1999) 'Survey of Bloodstream Infections Due to Gram-Negative Bacilli: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997', *Clinical Infectious Diseases*, 29(3), pp. 595–607. doi: 10.1086/598640.

van Dijk, E. L. *et al.* (2014) 'Ten years of next-generation sequencing technology', *Trends in Genetics*, 30(9), pp. 418–426. doi: 10.1016/j.tig.2014.07.001.

DiPersio, L. P. *et al.* (2008) 'Prevalence of the *erm*(T) gene in clinical isolates of erythromycin-resistant group D *Streptococcus* and *Enterococcus*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), pp. 1567–1569. doi: 10.1128/AAC.01325-07.

Duriez, P. *et al.* (2001) 'Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations', *Microbiology*, 147(Pt 6), pp. 1671–1676. doi: 10.1099/00221287-147-6-1671.

Edelstein, P. H. (2004) 'Pneumococcal Resistance to Macrolides, Lincosamides, Ketolides, and Streptogramin B Agents: Molecular Mechanisms and Resistance Phenotypes', *Clinical Infectious Diseases*, 38(Suppl 4), pp. S322–S327. doi: 10.1086/382687.

Eid, J. *et al.* (2009) 'Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules', *Science*, 323(5910), pp. 133–138. doi: 10.1126/science.1162986.

Eisenstein, M. (2012) 'Oxford Nanopore announcement sets sequencing sector abuzz', *Nature Biotechnology*, 30(4), pp. 295–296. doi: 10.1038/nbt0412-295.

Eisenstein, M. (2017) 'An ace in the hole for DNA sequencing', *Nature*, 550(7675), pp. 285–288. doi: 10.1038/550285a.

Elal Mus, T. *et al.* (2017) 'Pathogenicity determinants and antibiotic resistance profiles of enterococci from foods of animal origin in Turkey', *Acta Veterinaria Hungarica*, 65(4), pp. 461–474. doi: 10.1556/004.2017.044.

Van Elsas, J. D. *et al.* (2011) 'Survival of *Escherichia coli* in the environment: Fundamental and public health aspects', *ISME Journal*, 5(2), pp. 173–183. doi: 10.1038/ismej.2010.80.

Emaneini, M. *et al.* (2016) 'Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital.', *Journal of preventive medicine and hygiene*, 57(4), pp. E197–E200.

Evans, B. A. and Amyes, S. G. B. (2014) 'OXA β-lactamases', *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), pp. 241–263. doi: 10.1128/CMR.00117-13.

Facklam, R., Carvalho, M. and Teixeira, L. (2002) 'History, Taxonomy, Biochemical Characteristics, and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci', in Gilmore M et al. (eds)

The Enterococci. Washington DC: ASM Press, pp. 1–54. doi: 10.1128/9781555817923.ch1.

Fang, H. *et al.* (2012) 'Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates', *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(11), pp. 3073–3077. doi: 10.1007/s10096-012-1667-x.

Ferreira, W. F. C. and Sousa, J. C. (1998) *Microbiologia*. Lidel.

Fluit, A. C. *et al.* (2002) 'Antimicrobial Susceptibility and Frequency of Occurrence of Clinical Blood Isolates in Europe from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 and 1998', *Clinical Infectious Diseases*, 30(3), pp. 454–460. doi: 10.1086/313710.

Fuentes-Castillo, D. *et al.* (2019) 'Wild owls colonized by international clones of extended-spectrum β-lactamase (CTX-M)-producing *Escherichia coli* and *Salmonella Infantis* in the Southern Cone of America', *Science of The Total Environment*, 674, pp. 554–562. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.149.

Garcês, A. et al. (2019) 'First report on extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Escherichia coli from European free-tailed bats (Tadarida teniotis) in Portugal: A one-health approach of a hidden contamination problem', Journal of Hazardous Materials, 370, pp. 219-224. doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.12.053.

Garrido-Cardenas, J. A. *et al.* (2017) 'DNA sequencing sensors: An overview', *Sensors (Switzerland)*, 17(3), p. 588. doi: 10.3390/s17030588.

Garrido-Cardenas, J. A. and Manzano-Agugliaro, F. (2017) 'The metagenomics worldwide research', *Current Genetics*, 63(5), pp. 819–829. doi: 10.1007/s00294-017-0693-8.

George, K. S. *et al.* (1997) 'Capillary electrophoresis methodology for identification of cancer related gene expression patterns of fluorescent differential display polymerase chain reaction', *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 695(1), pp. 93–102. doi: 10.1016/S0378-4347(97)00115-1.

Giedraitienė, A. *et al.* (2011) 'Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria', *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 47(3), pp. 137–146.

Gold, H. S. (2002) 'Vancomycin-Resistant Enterococci: Mechanisms and Clinical Observations', *Clinical Infectious Diseases*, 33(2), pp. 210–219. doi: 10.1086/321815.

Gonçalves, A. et al. (2012a) 'Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates in faecal samples of Iberian lynx', Letters in Applied Microbiology, 54(1), pp. 73-77. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03173.x.

Gonçalves, A. et al. (2012b) 'Iberian Wolf as a Reservoir of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Escherichia coli of the TEM, SHV, and CTX-M Groups', Microbial Drug Resistance, 18(2), pp. 215-219. doi: 10.1089/mdr.2011.0145.

Goodwin, S., McPherson, J. D. and McCombie, W. R. (2016) 'Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies', *Nature Reviews Genetics*, 17(6), pp. 333–351. doi: 10.1038/nrg.2016.49.

Greenwood, D. and Whitley, R. (2002) 'Modes of action', *Antibiotic and Chemotherapy: Anti-Infective Agents and Their Use in Therapy*. doi: 10.1111/j.1610-0387.2011.07700.x.

Del Grosso, M. *et al.* (2000) 'Detection and characterization of vancomycin-resistant enterococci in farm animals and raw meat products in Italy', *Microbial Drug Resistance*, 6(4), pp. 313–318. doi: 10.1089/mdr.2000.6.313.

Guerrero-Ramos, E. *et al.* (2016) 'Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Genotypic Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococci in Meat Preparations', *Journal of Food Protection*, 79(5), pp. 748–756. doi: 10.4315/0362-028x.jfp-15-390.

Gundran, R. S. *et al.* (2019) 'Prevalence and distribution of *blaCTX-M*, *blaSHV*, *blaTEM* genes in extended- spectrum β- lactamase- producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines', *BMC Veterinary Research*, 15(1), p. 227. doi: 10.1186/s12917-019-1975-9.

Hall, N. (2007) 'Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology', *Journal of Experimental Biology*, 210(Pt 9), pp. 1518–1525. doi: 10.1242/jeb.001370.

Hammerum, A. M. (2012) 'Enterococci of animal origin and their significance for public health', *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), pp. 619–625. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03829.x.

Hansson, K. *et al.* (2002) 'IntI2 integron integrase in Tn7', *Journal of Bacteriology*, 184(6), pp. 1712–1721. doi: 10.1128/JB.184.6.1712-1721.2002.

Harbottle, H. *et al.* (2006) 'Genetics of antimicrobial resistance', *Animal Biotechnology*, 17(2), pp. 111–124. doi: 10.1080/10495390600957092.

Harwood, V. J., Whitlock, J. and Withington, V. (2000) 'Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: Use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters', *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), pp. 3698–3704. doi: 10.1128/AEM.66.9.3698-3704.2000.

Hayes, J. R. *et al.* (2004) 'Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from commercial poultry production environments', *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), pp. 6005–6011. doi: 10.1128/AEM.70.10.6005-6011.2004.

Heinemann, J. A. and Sprague, G. F. (1989) 'Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast', *Nature*, 340(6230), pp. 205–209. doi: 10.1038/340205a0.

Hiraoka, S., Yang, C. and Iwasaki, W. (2016) 'Metagenomics and Bioinformatics in Microbial Ecology: Current Status and Beyond', *Microbes and environmentsMicrobes and Environments*, 31(3), pp. 204–212. doi: 10.1264/jsme2.me16024.

Holmes, R. K. and Jobling, M. G. (1996) *Medical Microbiology: Chapter 5 Genetics, University of Texas Medical Branch at Galveston*.

Huys, G. *et al.* (2004) 'Prevalence and Molecular Characterization of Tetracycline Resistance in *Enterococcus* Isolates from Food', *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), pp. 1555–1562. doi: 10.1128/AEM.70.3.1555-1562.2004.

Hyman, E. D. (1988) 'A new method of sequencing DNA', *Analytical Biochemistry*, 174(2), pp. 423–436. doi: 10.1016/0003-2697(88)90041-3.

Igbinosa, E. O. and Beshiru, A. (2019) 'Antimicrobial Resistance, Virulence Determinants, and Biofilm Formation of *Enterococcus* Species From Ready-to-Eat Seafood', *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 728. doi: 10.3389/fmicb.2019.00728.

Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and C. (1998) 'Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B_6, Folate, Vitamin B_{12}, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline', in *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. doi: 10.1016/S0924-2244(01)00010-3.

Jackson, C. R. *et al.* (2004) 'Genetic Relatedness of High-Level Aminoglycoside-Resistant Enterococci Isolated from Poultry Carcasses', *Avian Diseases*, 48(1), pp. 100–107. doi: 10.1637/7071.

Jehl, F. *et al.* (2016) 'Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie', *Recommandations 2016. V1. 0 Février*, p. 117.

Jia, B. *et al.* (2017) 'CARD 2017: Expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database', *Nucleic Acids Research*, 45(D1), pp. D566–D573. doi: 10.1093/nar/gkw1004.

Jung, W. K. *et al.* (2007) 'Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea', *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), pp. 102–107. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.023.

Kado, C. I. and Liu, S. T. (1981) 'Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids', *Journal of Bacteriology*, 145(3), pp. 1365–1373.

Kåhrström, C. T. (2012) 'Bacterial pathogenesis: *E. coli* claims the driving seat for cancer', *Nature Reviews Microbiology*, 10(10), p. 670. doi: 10.1038/nrmicro2878.

Kalina, A. P. (1970) '[The position of enterococci in the system of microorganisms].', *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*, 47(6), pp. 20–21.

Kargar, M. *et al.* (2014) 'High prevalence of class 1 to 3 integrons among multidrug-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* in southwest of iran', *Osong Public Health and Research Perspectives*, 5(4), pp. 193–198. doi: 10.1016/j.phrp.2014.06.003.

Kasimoglu-Dogru, A., Gencay, Y. E. and Ayaz, N. D. (2010) 'Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species in chicken at slaughter level; absence of *vanA* and *vanB* genes in *E. faecalis* and *E. faecium*', *Research in Veterinary Science*, 89(2), pp. 153–158. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.02.005.

Kieffer, N. *et al.* (2017) 'High rate of MCR-1–producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among pigs, Portugal', *Emerging Infectious Diseases*, 23(12), pp. 2023–2029. doi: 10.3201/eid2312.170883.

Kijima-Tanaka, M. *et al.* (2003) 'A national surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Japan', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(2), pp. 447–451. doi: 10.1093/jac/dkg014.

Kilani, H. *et al.* (2019) 'Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among *Escherichia coli* strains isolated from animals in Tunisia: specific pathovars acquired *qnr* genes', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. doi: 10.1016/j.jgar.2019.07.023.

Kircher, M. and Kelso, J. (2010) 'High-throughput DNA sequencing - Concepts and limitations', *BioEssays*, 32(6), pp. 524–536. doi: 10.1002/bies.200900181.

Klibi, N. *et al.* (2013) 'Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia', *Meat Science*, 93(3), pp. 675–680. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.11.020.

Kumar, V. *et al.* (2011) 'Comparative Genomics of *Klebsiella pneumoniae* Strains with Different Antibiotic Resistance Profiles', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9), pp. 4267–4276. doi: 10.1128/aac.00052-11.

Lander, E. S. *et al.* (2001) 'Initial sequencing and analysis of the human genome', *Nature*, 409(6822), pp. 860–921. doi: 10.1038/35057062.

LeCointre, G. *et al.* (1998) '*Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test', *Molecular Biology and Evolution*, 15(12), pp. 1685–1695. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025895.

De Leener, E. *et al.* (2005) 'Distribution of the *erm*(B) Gene, tetracycline Resistance Genes, and Tn1545 -like Transposons in Macrolide- and Lincosamide-Resistant Enterococci from Pigs and Humans', *Microbial Drug Resistance*, 10(4), pp. 341–345. doi: 10.1089/mdr.2004.10.341.

Lellek, H. *et al.* (2015) 'Emergence of daptomycin non-susceptibility in colonizing vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates during daptomycin therapy', *International Journal of Medical Microbiology*, 305(8), pp. 902–909. doi: 10.1016/j.ijmm.2015.09.005.

Levene, H. J. *et al.* (2003) 'Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations', *Science*, 299(5607), pp. 682–686. doi: 10.1126/science.1079700.

Levy, S. B. (2002) 'Factors impacting on the problem of antibiotic resistance', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(1), pp. 25–30. doi: 10.1093/jac/49.1.25.

Li, H. *et al.* (2017) 'CMOS electrochemical instrumentation for biosensor microsystems: A review', *Sensors (Switzerland)*, 17(1), p. 74. doi: 10.3390/s17010074.

Li, H. and Homer, N. (2010) 'A survey of sequence alignment algorithms for next-generation sequencing.', *Briefings in bioinformatics*, 11(5), pp. 473–483. doi: 10.1093/bib/bbq015.

Li, X.-S. *et al.* (2014) 'Presence and genetic environment of pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance gene *lsa*(E) in enterococci of human and swine origin', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(5), pp. 1424–1426. doi: 10.1093/jac/dkt502.

Li, X.-Z. and Nikaido, H. (2004) 'Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria', *Drugs*, 64(2), pp. 159–204. doi: 10.2165/00003495-200464020-00004.

Literak, I. *et al.* (2010) 'Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the baltic sea coast of Poland', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24), pp. 8126–8134. doi: 10.1128/AEM.01446-10.

López, M. *et al.* (2012) 'First Detection of the Staphylococcal Trimethoprim Resistance Gene *dfrK* and the *dfrK* -Carrying Transposon Tn559 in Enterococci', *Microbial Drug Resistance*, 18(1), pp. 13–18. doi: 10.1089/mdr.2011.0073.

Lundquist, P. M. *et al.* (2008) 'Parallel confocal detection of single molecules in real time', *Optics Letters*, 33(9), pp. 1026–1028. doi: 10.1364/ol.33.001026.

Madec, J. Y. and Haenni, M. (2018) 'Antimicrobial resistance plasmid reservoir in food and food-producing animals', *Plasmid*, 99, pp. 72–81. doi: 10.1016/j.plasmid.2018.09.001.

Madigan, M. T. *et al.* (2009) *Brock Biology of Microorganisms 13th Edition, Benjamin Cummings*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

Magiorakos, A. P. *et al.* (2012) 'Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance', *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), pp. 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

Mardis, E. R. (2008) 'Next-Generation DNA Sequencing Methods', *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, pp. 387–402. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359.

Mardis, E. R. (2013) 'Next-Generation Sequencing Platforms', *Annual Review of Analytical Chemistry*, 6, pp. 287–303. doi: 10.1146/annurev-anchem-062012-092628.

Marinho, C. *et al.* (2014) 'Azorean wild rabbits as reservoirs of antimicrobial resistant *Escherichia coli*', *Anaerobe*, 30, pp. 116–119. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.09.009.

Marinho, C. A. M. (2013) 'Resistência a antibióticos em *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* de equinodermes: um problema ambiental e de saúde pública'. Dissertação de Mestrado em Genética

Molecular Comparativa e Tecnológica.

Martel, A. *et al.* (2003) 'Presence of macrolide resistance genes in streptococci and enterococci isolated from pigs and pork carcasses', *International Journal of Food Microbiology*, 84(1), pp. 27–32. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00390-2.

Matsumoto, Y. *et al.* (2014) 'Characterization of *blaTEM-52* -carrying plasmids of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Salmonella enterica* isolates from chicken meat with a common supplier in Japan', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12), pp. 7545–7547. doi: 10.1128/AAC.02731-14.

Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1977) 'A new method for sequencing DNA', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2), pp. 560–564.

McEwen, S. A. and Fedorka-Cray, P. J. (2002) 'Antimicrobial Use and Resistance in Animals', *Clinical Infectious Diseases*, 34(s3), pp. S93–S106. doi: 10.1086/340246.

Merriman, B., Torrent, I. and Rothberg, J. M. (2012) 'Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing', *Electrophoresis*, 33(23), pp. 3397–3417. doi: 10.1002/elps.201200424.

Messi, P. *et al.* (2006) 'Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples', *International journal of food microbiology*, 107(2), pp. 218–222. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.026.

Metzker, M. L. (2010) 'Sequencing technologies - the next generation', *Nature reviews. Genetics*, 11(1), pp. 31–46. doi: 10.1038/nrg2626.

Mikheyev, A. S. and Tin, M. M. Y. (2014) 'A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer', *Molecular Ecology Resources*, 14(6), pp. 1097–1102. doi: 10.1111/1755-0998.12324.

Moodley, A. and Guardabassi, L. (2009) 'Transmission of IncN Plasmids Carrying *blaCTX-M-1* between Commensal *Escherichia coli* in Pigs and Farm Workers', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), pp. 1709–1711. doi: 10.1128/AAC.01014-08.

Morgan, X. C., Segata, N. and Huttenhower, C. (2013) 'Biodiversity and functional genomics in the human microbiome', *Trends in Genetics*, 29(1), pp. 51–58. doi: 10.1016/j.tig.2012.09.005.

Morozova, O., Hirst, M. and Marra, M. A. (2009) 'Applications of New Sequencing Technologies for Transcriptome Analysis', *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10, pp. 135–151. doi: 10.1146/annurev-genom-082908-145957.

Mulvey, M. R. and Simor, A. E. (2009) 'Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be?', *CMAJ*, 180(4), pp. 408–415. doi: 10.1503/cmaj.080239.

Munita, J. M. and Arias, C. A. (2016) 'Mechanisms of Antibiotic Resistance', *Microbiology spectrum*. NIH Public Access, 4(2). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

Murray, P., Rosenthal, K. and Pfaller, M. (2014) *Microbiologia medica, Elsevier España*. doi: 9788480864657.

Na, S. H. *et al.* (2019) 'Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Ducks in South Korea', *Foodborne Pathogens and Disease*. doi: 10.1089/fpd.2019.2644.

Naseer, U. and Sundsfjord, A. (2011) 'The CTX-M Conundrum: Dissemination of Plasmids and *Escherichia coli* Clones', *Microbial Drug Resistance*, 17(1), pp. 83–97. doi: 10.1089/mdr.2010.0132.

Navarro, F. *et al.* (2007) 'Evidence for convergent evolution of CTX-M-14 ESBL in *Escherichia coli* and its prevalence', *FEMS Microbiology Letters*, 273(1), pp. 120–123. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00791.x.

Neu, H. C. *et al.* (1996) 'Chapter 11 Antimicrobial Chemotherapy Biochemical Basis of Antimicrobial Action Inhibition of Bacterial Cell Wall Synthesis', *Medical Microbiology*. doi: 10.1007/s00345-013-1154-8.

Noskin, G. A. *et al.* (1995) 'Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces', *Infection control and hospital epidemiology the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 16(10), pp. 577–581. doi: 10.1086/647011.

Ochman, H. and Jones, I. B. (2000) 'Evolutionary dynamics of full genome content in *Escherichia coli*', *EMBO Journal*, 19(24), pp. 6637–6643. doi: 10.1093/emboj/19.24.6637.

Olsen, R. H. *et al.* (2014) 'Extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: A review of current problems, illustrated with some laboratory findings', *Avian Pathology*, 43(3), pp. 199–208. doi: 10.1080/03079457.2014.907866.

Oteo, J. *et al.* (2006) 'Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions', *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7), pp. 2359–2366. doi: 10.1128/JCM.00447-06.

Pabich, W. L. *et al.* (2003) 'Prevalence and Determinants of Vaginal Flora Alterations in Postmenopausal Women', *The Journal of Infectious Diseases*, 188(7), pp. 1054–1058. doi: 10.1086/378203.

Pagès, J. M., James, C. E. and Winterhalter, M. (2008) 'The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria', *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), pp. 893–903. doi: 10.1038/nrmicro1994.

Paterson, D. L. (2006) 'Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae', *The American Journal of Medicine*, 119(6), pp. S20–S28. doi: 10.1016/j.amjmed.2006.03.013.

Peirano, G. and Pitout, J. D. D. (2010) 'Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4', *International Journal*

of Antimicrobial Agents, 35(4), pp. 316–321. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.11.003.

Peyro-Saint-Paul, H. and Hermitte, F. (2013) 'From sample to insight: Bringing NGS into clinical routine', *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 28(3), p. A11.

Piddock, L. J. V (2006a) 'Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria', *Clinical microbiology reviews*, 19(2), pp. 382–402. doi: 10.1128/CMR.19.2.382-402.2006.

Piddock, L. J. V (2006b) 'Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance', *Nature reviews. Microbiology*, 4(8), pp. 629–636. doi: 10.1038/nrmicro1464.

Pierce, B. A. (2012) *Genetics : a conceptual approach*. W.H. Freeman.

Pinto, L. et al. (2010) 'Genetic detection of extended-spectrum β-lactamase-containing Escherichia coli isolates from birds of prey from serra da estrela natural reserve in Portugal', Applied and Environmental Microbiology, 76(12), pp. 4118-4120. doi: 10.1128/AEM.02761-09.

Poeta, P. et al. (2008) 'Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal Escherichia coli harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases', Applied and Environmental Microbiology, 74(23), pp. 7439-7441. doi: 10.1128/AEM.00949-08.

Poeta, P. et al. (2009) 'Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Escherichia coli of different phylogenetic groups', Journal of Basic Microbiology, 49(6), pp. 584-588. doi: 10.1002/jobm.200900066.

Poeta, P., Coelho, A. and Rodrigues, J. (2008) *Manual de Aulas Práticas de Microbiologia Aplicada Á Saúde - Série didática nº340*. Edited by UTAD.

Poirel, L., Bonnin, R. A. and Nordmann, P. (2012) 'Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β-lactamases in Gram-negative rods', *Infection, Genetics and Evolution*, 12(5), pp. 883–893. doi: 10.1016/j.meegid.2012.02.008.

Poole, K. (2005) 'Efflux-mediated antimicrobial resistance', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), pp. 20–51. doi: 10.1093/jac/dki171.

QIAGEN (2013) *Pyrosequencing Technology and Platform Overview - QIAGEN*. Available at: https://www.qiagen.com/us/resources/technologies/pyrosequencing-resource-center/technology-overview/ (Accessed: 29 October 2018).

Radhouani, H. et al. (2010) 'Detection of Escherichia coli harbouring extended-spectrum β-lactamases of the CTX-M classes in faecal samples of common buzzards (Buteo buteo)', Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65(1), pp. 171-173. doi: 10.1093/jac/dkp403.

Ramos, S. et al. (2013) 'Clonal Diversity of ESBL-Producing Escherichia coli in Pigs at Slaughter Level in Portugal', Foodborne Pathogens and Disease, 10(1), pp. 74-79. doi: 10.1089/fpd.2012.1173.

Rebbah, N. *et al.* (2018) 'Diversity of CTX-M Extended-Spectrum β-Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Retail Raw Ground Beef: First Report of CTX-M-24 and CTX-M-32 in Algeria', *Microbial Drug Resistance*, 24(7), pp. 896–908. doi: 10.1089/mdr.2017.0171.

Reuter, J. A., Spacek, D. V and Snyder, M. P. (2015) 'High-throughput sequencing technologies', *Molecular cell*, 58(4), pp. 586–597. doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.004.

Reynolds, R. (2009) 'Antimicrobial resistance in the UK and Ireland', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(Suppl 1), pp. i19–i23. doi: 10.1093/jac/dkp257.

Rice, L. B. (2001) 'Emergence of vancomycin-resistant enterococci', *Emerging Infectious Diseases*, 7(2), pp. 1833–187. doi: 10.3201/eid0702.010205.

Richter, S. N. *et al.* (2007) 'Hot-spot consensus of fluoroquinolone-mediated DNA cleavage by Gram-negative and Gram-positive type II DNA topoisomerases', *Nucleic Acids Research*, 35(18), pp. 6075–6085. doi: 10.1093/nar/gkm653.

Roberts, M. C. (1996) 'Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution', *FEMS microbiology reviews*, 19(1), pp. 1–24. doi: 10.1016/0168-6445(96)00021-6.

Rondon, M. R. *et al.* (2000) 'Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms', *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), pp. 2541–2547. doi: 10.1128/AEM.66.6.2541-2547.2000.

Rothberg, J. M. *et al.* (2011) 'An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing', *Nature*, 475, pp. 348–352. doi: 10.1038/nature10242.

Sáenz, Y. (2004) 'Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* no patógenas de alimentos y de la microflora intestinal de humanos y animales'. Dissertação de Doutoramento na área de Bioquímica e Biologia Molecular.

Sáenz, Y. *et al.* (2004) 'Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), pp. 3996–4001. doi: 10.1128/AAC.48.10.3996-4001.2004.

Sahm, D. F. *et al.* (2001) 'Multidrug-resistant urinary tract isolates of *Escherichia coli*: prevalence and patient demographics in the United States in 2000', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(5), pp. 1402–1406. doi: 10.1128/AAC.45.5.1402-1406.2001.

Ben Sallem, R. *et al.* (2014) 'IncI1 Plasmids Carrying *blaCTX-M-1* or *blaCMY-2* genes in *Escherichia coli* from healthy humans and animals in Tunisia', *Microbial Drug Resistance*, 20(5), pp. 495–500. doi: 10.1089/mdr.2013.0224.

Salmela, L. (2010) 'Correction of sequencing errors in a mixed set of reads', *Bioinformatics*, 26(10), pp. 1284–1290. doi: 10.1093/bioinformatics/btq151.

Salyers, A. A., Gupta, A. and Wang, Y. (2004) 'Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes', *Trends in Microbiology*, 12(9), pp. 412–416. doi: 10.1016/j.tim.2004.07.004.

Sanger, F. *et al.* (1977) 'Nucleotide sequence of bacteriophage φx174 DNA', *Nature*, 265(5596), pp. 687–695. doi: 10.1038/265687a0.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

dos Santos, K. M. O. *et al.* (2015) 'Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses', *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), pp. 237–249. doi: 10.1590/S1517-838246120131245.

Schaufler, K. *et al.* (2016) 'Clonal spread and interspecies transmission of clinically relevant ESBL-producing *Escherichia coli* of ST410-another successful pandemic clone?', *FEMS Microbiology Ecology*, 92(1), p. fiv155. doi: 10.1093/femsec/fiv155.

Sefton, A. M. (2002) 'Mechanisms of antimicrobial resistance: Their clinical relevance in the new millennium', *Drugs*, 62(4), pp. 557–566. doi: 10.2165/00003495-200262040-00001.

Seral, C., Gude, M. J. and Castillo, F. J. (2012) 'Emergence of plasmid mediated *AmpC* β-lactamasas: Origin, importance, detection and therapeutical options', *Revista espanola de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia*, 25(2), pp. 89–99.

Sharon, I. *et al.* (2013) 'Time series community genomics analysis reveals rapid shifts in bacterial species, strains, and phage during infant gut colonization', *Genome Research*, 23(1), pp. 111–120. doi: 10.1101/gr.142315.112.

Shen, Z. *et al.* (2016) 'Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals', *The Lancet Infectious Diseases*. Elsevier, 16(3), p. 293. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00061-X.

Shoemaker, N. B. *et al.* (2001) 'Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon', *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), pp. 561–568. doi: 10.1128/AEM.67.2.561-568.2001.

Shulman, S. T., Friedmann, H. C. and Sims, R. H. (2007) 'Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician?', *Clinical Infectious Diseases*, 45(8), pp. 1025–1029. doi: 10.1086/521946.

Siguier, P., Gourbeyre, E. and Chandler, M. (2014) 'Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity', *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), pp. 865–891. doi: 10.1111/1574-6976.12067.

Silva, N. et al. (2012) 'Genetic characterisation of extended-spectrum β-lactamases in Escherichia coli isolated from retail chicken products including CTX-M-9 containing isolates: A food safety

risk factor', British Poultry Science, 53(6), pp. 747-755. doi: 10.1080/00071668.2012.740554.

Singh, P. S. (2015) 'From Sensors to Systems: CMOS-Integrated Electrochemical Biosensors', *IEEE Access*, 3, pp. 249–259. doi: 10.1109/ACCESS.2015.2410256.

Sokurenko, E. V. *et al.* (1998) 'Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), pp. 8922–8926. doi: 10.1073/pnas.95.15.8922.

Sousa, J. C. (2006) 'Manual de Antibióticos Antibacterianos.', *Universidade de Fernando Pessoa*.

Souza, V. *et al.* (1999) 'Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents', *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), pp. 3373–3385.

Spratt, B. G. and Cromie, K. D. (1988) 'Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria', *Clinical Infectious Diseases*, 10(4), pp. 699–711. doi: 10.1093/clinids/10.4.699.

Srinivasan, S. and Batra, J. (2014) 'Four Generations of Sequencing- Is it Ready for the Clinic Yet?', *Next Generation: Sequencing & Applications*, 1(1), pp. 1–8. doi: 0.4172/2469-9853.1000107.

Suay-García, B. *et al.* (2019) 'Detection and Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Producing *Escherichia coli* in Animals', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 19(2), pp. 115–120. doi: 10.1089/vbz.2018.2333.

Sun, J., Deng, Z. and Yan, A. (2014) 'Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(2), pp. 254–267. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.090.

Sunde, M. *et al.* (1998) 'Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* of the Normal Intestinal Flora of Swine', *Microbial Drug Resistance*, 4(4), pp. 289–299. doi: 10.1089/mdr.1998.4.289.

Swerdlow, H. and Gesteland, R. (1990) 'Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing', *Nucleic Acids Research*, 18(6), pp. 1415–1419. doi: 10.1093/nar/18.6.1415.

Tadesse, D. A. *et al.* (2018) 'Whole-Genome Sequence Analysis of CTX-M Containing *Escherichia coli* Isolates from Retail Meats and Cattle in the United States', *Microbial Drug Resistance*, 24(7), pp. 939–948. doi: 10.1089/mdr.2018.0206.

Tauxe, R. V., Cavanagh, T. R. and Cohen, M. L. (1989) 'Interspecies Gene Transfer *in Vivo* Producing an Outbreak of Multiply Resistant Shigellosis', *Journal of Infectious Diseases*, 160(6), pp. 1067–1070. doi: 10.1093/infdis/160.6.1067.

Tenover, F. C. (2006) 'Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria', *American Journal of Infection Control*, 34(5), pp. S3–S10. doi: 10.1016/j.ajic.2006.05.219.

Teuber, M. (2001) 'Veterinary use and antibiotic resistance', *Current Opinion in Microbiology*,

4(5), pp. 493–499. doi: 10.1016/S1369-5274(00)00241-1.

Thiercelin, M. E. and Jouhaud, L. (1899) 'Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene', *CR Soc Biol*, 5(26971.2).

Thiercelin, M. E. and Jouhaud, L. (1903) 'Reproduction de l'enterocoque; taches centrales; granulations peripheriques et microblastes', *CR Seances Soc. Biol. Paris*, 55, pp. 686–688.

Thu, W. P. *et al.* (2019) 'Prevalence, Antimicrobial resistance, virulence genes and class 1 integrons of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from pigs, pork and humans in Thai-Laos border provinces', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 18, pp. 130–138. doi: 10.1016/j.jgar.2019.05.032.

Tollefson, L. and Karp, B. E. (2004) 'Human health impact from antimicrobial use in food animals.', *Medecine et maladies infectieuses*, 34(11), pp. 514–521.

Torres, C. and Zarazaga, M. (2002) 'Antibiotics as growth promoters in animals. Are we going down the right road?', *Gaceta sanitaria*, 16(2), pp. 109–112.

Tortora, G. J., Funke, B. R. and Case, C. L. (2019) *Microbiology : an introduction*.

Toumazou, C. and Georgiou, P. (2011) 'Piet Bergveld - 40 years of ISFET technology: From neuronal sensing to DNA sequencing', *Electronics Letters*, 47(26), pp. S7–S12. doi: 10.1049/el.2011.3231.

Turner, P. J. (2005) 'Extended-Spectrum β-Lactamases', *Clinical Infectious Diseases*. Narnia, 41(s4), pp. S273–S275. doi: 10.1086/430789.

Valouev, A. *et al.* (2008) 'A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning', *Genome Research*, 18(7), pp. 1051–1063. doi: 10.1101/gr.076463.108.

Veldman, K. *et al.* (2013) 'Characteristics of cefotaxime-resistant *Escherichia coli* from wild birds in the Netherlands.', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 79(24), pp. 7556–61. doi: 10.1128/AEM.01880-13.

Voelkerding, K. V., Dames, S. A. and Durtschi, J. D. (2009) 'Next-generation sequencing:from basic research to diagnostics', *Clinical Chemistry*, 55(4), pp. 641–658. doi: 10.1373/clinchem.2008.112789.

Walsh, C. (2003a) *Antibiotics: actions, origins, resistance.* American Society for Microbiology (ASM).

Walsh, C. (2003b) 'Where will new antibiotics come from?', *Nature Reviews Microbiology*, 1(1), pp. 65–70. doi: 10.1038/nrmicro727.

Wang, J. *et al.* (2017) 'The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial

resistance genes.', *Zoological research*. Editorial Office of Zoological Research, Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, 38(2), pp. 55–80. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2017.003.

Wang, Ling *et al.* (2019) 'Comparative Analysis of Antimicrobial Resistance, Integrons, and Virulence Genes Among Extended-Spectrum β-Lactamase-Positive *Laribacter hongkongensis* from Edible Frogs and Freshwater Fish', *Microbial Drug Resistance*, 25(6), pp. 855–864. doi: 10.1089/mdr.2018.0366.

Waters, V. L. (2001) 'Conjugation between bacterial and mammalian cells', *Nature Genetics*, 29(4), pp. 375–376. doi: 10.1038/ng779.

WHO (2001) *WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance, World Health Organisation*. doi: WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2 99 p.

Willey, J., Sherwood, L. and Woolverton, C. (2007) *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*, *Microbiology*.

Witte, W. (1998) 'Medical consequences of antibiotics use in agriculture', *Science*, 279(5353), pp. 996–997. doi: 10.1126/science.279.5353.996.

Woodford, N., Turton, J. F. and Livermore, D. M. (2011) 'Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance', *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), pp. 736–755. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x.

World Health Organization (2017) 'List of critically important antimicrobials for human medicine', *World Health Organization*, p. 5th revision.

World Organisation for Animal Health (2015) 'Oie List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance', *OIE International Commitee*. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf.

Ben Yahia, H. *et al.* (2018) 'Detection of CTX-M-15 harboring *Escherichia coli* isolated from wild birds in Tunisia', *BMC Microbiology*, 18(1), p. 26. doi: 10.1186/s12866-018-1163-2.

Yocum, R. R., Rasmussen, J. R. and Strominger, J. L. (1980) 'The mechanism of action of penicillin. Penicillin acylates the active site of *Bacillus stearothermophilus* D-alanine carboxypeptidase', *Journal of Biological Chemistry*, 255(9), pp. 3977–3986.

Young, B., O'Dowd, G. and Woodford, P. (2006) *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas, Churchill Livingstone*. doi: 10.7861/clinmedicine.14-4-453.

Yurdakul, N. E., Erginkaya, Z. and Ünal, E. (2013) 'Antibiotic resistance of enterococci, coagulase negative Staphylococci and Staphylococcus aureus isolated from chicken meat', *Czech Journal of Food Sciences*, 31(1), pp. 14–19.

Zankari, E. *et al.* (2012) 'Identification of acquired antimicrobial resistance genes', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), pp. 2640–2644. doi: 10.1093/jac/dks261.

Zarfel, G. *et al.* (2014) 'Multiresistant bacteria isolated from chicken meat in Austria', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(12), pp. 12582–125893. doi: 10.3390/ijerph111212582.

Zurfluh, K. *et al.* (2014) 'Replicon typing of plasmids carrying *blaCTX-M-1* in Enterobacteriaceae of animal, environmental and human origin.', *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media SA, 5, p. 555. doi: 10.3389/fmicb.2014.00555.

Anexo I: Meios de cultura utilizados no decurso deste trabalho

Meio de Cultura	Composição (g/L)
Slanetz-Bartley agar (SB) - Meio seletivo utilizado para o crescimento e isolamento de *Enterococcus* spp.	Triptose – 20 Extrato de levedura – 5 Glucose – 2 Fosfato dissódico hidratado – 4 Azida de sódio – 0.4 Cloreto de trifeniltetrazólio – 0,1 Agar – 12
Eosin Methylene Blue Agar (Levine) - Meio seletivo utilizado para o isolamento de enterobacterias.	Peptona – 10 Lactose – 10 Fosfato dipotássico hidrogenado – 2 Eosina Y – 0,4 Azul-de-metileno – 0,065 Agar – 15
Brain-Heart Infusion (BHI) - Meio nutritivo usado para o crescimento de bactérias.	Cérebro de vitelo – 200 Coração de vaca – 250 Bacto protease peptona – 10 Bacto dextrose – 2 Cloreto de sódio – 5 Fosfato dissódico – 2,5 Agar – 15
Trypticase Soy Agar (TSA) - Meio nutritivo utilizado para o crescimento de bactérias.	Hidrolisado pancreático de caseína – 15 Hidrolisado papaínico de soja – 5 Cloreto de sódio – 5 Agar - 15
Columbia Blood Agar Base - Meio nutritivo utilizado para o crescimento de bactérias.	Peptona – 23 Amido de milho – 1 Cloreto sódio – 5 Agar - 10
Mueller-Hinton agar (MH) - Meio utilizado para o estudo de sensibilidade a antibióticos.	Infusão desidratada de carne de vitelo – 300 Bacto casamino ácidos – 17,5 Amido – 1,5 Agar – 15
Skim milk - Meio utilizado para conservar os isolados a temperaturas de congelação.	Leite desnatado, desidratado utilizado a 10%, dissoluto em água esterilizada e desionizada

Anexo II: Análise estatística após *assembly de novo* das amostras de *E. coli*

E. coli													
	Contig count	**Total read count**	**Total contig lenght**	**N50 (Min contig length)**	**N50 (Max contig length)**	**N50 (%GC)**	**Read Count mapped**	**Reads in aligned pairs**	**%A**	**%C**	**%G**	**%T**	**Coverage**
1-102	114	1513824	4908753	119365	228247	51,02	1513824	1331912	24,6	25,5	25,4	24,3	63,05236228
2-101	102	920334	4911370	129406	304015	50,73	920334	787522	24,6	24,9	25,5	24,8	39,05273434
13-103	106	1654337	5198055	134592	570039	50,73	1654337	1446456	24,6	25,5	25,1	24,6	68,44836172
21-101	110	2774193	4898883	127677	378631	50,93	2774193	2443394	24,6	25,3	25,3	24,6	80,29984148
BU10A	152	2580069	5153086	113592	270994	50,90	2580069	2301920	24,7	25,3	25,2	24,8	70,11530414
BU10B	149	3190936	5155048	114667	271327	50,96	3190936	2829634	24,4	25,4	25,5	24,6	87,72661951
BU22A	120	2866451	5187735	134822	574039	50,68	2866451	2506262	24,9	25,0	25,2	24,8	76,05681245
BU41A	159	887329	5157064	105371	271151	50,97	887329	753332	24,9	25,1	25,1	24,9	37,21164577
GV-23	80	1967345	4584495	123523	234515	50,94	1556789	2346881	24,6	25,2	25,6	24,9	81,80154841
J31	147	2558056	5157613	113338	271131	50,92	2558056	2258802	24,9	25,1	25,3	24,8	67,99988133
J64	109	2547262	4930509	135624	243467	50,96	1745767	2413253	24,3	25,3	25,5	24,7	72,71452367
J69	174	1147931	5245599	104514	262387	50,92	2026632	2358790	24,2	25,6	25,1	24,6	71,49147963
L16	107	2155553	4991842	171343	418719	50,74	2155553	1905538	24,8	25,2	25,3	24,8	59,09374167
L98	154	1111921	5114166	107794	299719	51,35	1111921	967864	24,5	25,5	25,5	24,4	43,50007275
TB63	132	1556234	5121405	145673	284512	51,87	1898231	2214102	24,9	25,1	25,7	24,5	73,22887868
W4	74	1243543	5144478	114556	296787	50,56	1465147	1652126	24,7	25,8	25,5	24,7	72,89526348
W151	82	1735456	4584395	128963	273447	50,84	1986564	2124457	24,5	25,6	25,5	24,6	81,80123025
SU32	92	1540887	4875050	197885	439650	50,88	1540887	1372986	24,4	25,6	25,3	24,6	64,85128179
SU50	155	1099502	4627988	64762	64762	51,09	1099502	942736	24,5	25,4	25,1	24,9	48,74029571
SU54	97	2592827	4796004	138549	286842	51,02	2592827	2298578	24,6	25,2	25,6	24,6	74,68570519
SU62	105	2597653	4695852	112880	245718	50,98	2597653	2269870	24,7	25,1	25,3	24,8	74,05427142
SU65	96	2550092	4693299	119255	245783	50,90	2550092	2264346	24,5	25,0	25,6	24,7	76,42783575
SU80	89	1853545	5070823	138315	376063	51,08	1853545	1647260	24,7	25,5	25,2	24,6	79,73600069
A3A	103	2590405	4795289	140838	287007	50,93	2590405	2309136	24,7	25,4	25,3	24,7	76,17557135
A4A	88	3133549	5197095	212647	655081	50,84	3133549	2789884	24,7	25,2	25,3	24,6	85,73184832
P6A	120	1334336	5452052	186964	331774	50,70	1334336	1150884	24,8	24,4	25,6	24,9	51,61346806
M1A	106	2241597	5113960	151215	446638	50,65	2241597	1979384	24,9	25,0	25,1	24,9	60,13050835
Pe4A	100	1483013	5208739	159622	587496	50,77	1483013	1312516	24,5	25,2	25,7	24,5	59,22152157

Anexo III: Análise estatística após *assembly de novo* das amostras de *Enterococcus* spp.

***Enterococcus* spp.**													
	Contig count	**Total read count**	**Total contig lenght**	**N50 (Min contig length)**	**N50 (Max contig length)**	**N50 (%GC)**	**Read Count mapped**	**Reads in aligned pairs**	**%A**	**%C**	**%G**	**%T**	**Coverage**
H1	158	1688997	2871561	52652	122336	37,79	1688997	1485508	31,1	18,8	19,2	30,7	13,05956327
H2	76	1659114	2525013	79100	235364	38,45	1659114	1466014	31,0	19,0	19,9	30,1	14,85145698
H3	76	1669285	2500009	73028	235446	38,41	1669285	1476132	30,1	19,7	19,3	30,9	15,00025874
H4	138	1741986	2959023	55209	152116	38,76	1741986	1534134	30,7	19,0	19,6	30,6	12,67363259
H7	67	1717820	2528157	87493	266485	38,48	1717820	1530066	30,7	19,2	19,5	30,6	14,83341525
H8	156	1165635	2864859	41462	179414	38,07	1165635	1001640	30,6	19,1	18,7	31,4	13,09078523
A10	82	1443349	2498917	69347	235199	38,45	1443349	1274704	31,3	19,1	19,6	30,0	15,00745269
A13	173	2148839	2857983	40449	105062	38,16	2148839	1888896	30,8	19,3	18,8	31,0	13,12115158
A14	75	1872439	2468116	72916	206351	38,46	1872439	1676522	30,2	19,7	19,4	30,7	15,19445368
A16	154	1795758	2876425	48754	304108	38,1	1795758	1578378	30,9	18,9	19,5	30,6	13,03796783
CP17	69	1683687	2461377	79100	234190	38,36	1683687	1489882	30,6	19,3	19,6	30,5	15,23578321
CP18	73	1764426	2557312	78678	266917	38,38	1764426	1545384	30,9	19,1	19,6	30,4	14,66445289
CP19	164	1895301	2871794	52488	179516	38,22	1895301	1689080	31,2	18,8	19,3	30,6	13,05898743
CP21	80	2393456	2551705	73174	235317	38,42	2393456	2158220	30,7	19,2	19,5	30,6	14,69602549
H6	54	1404040	3226289	231043	471605	40,97	1404040	1239704	29,0	21,0	20,1	29,9	11,62360347
A12	42	2121440	3237092	261695	777413	40,63	2121440	1897008	29,6	20,7	20,3	29,4	11,58450369
CP23	21	1618798	3143117	77834	226054	38,51	1634108	1133716	30,4	19,3	19,5	30,7	11,93101447
A11	80	2549020	2930018	85650	202395	37,38	2549020	2284480	31,2	18,9	19,1	30,3	12,79911458
CP22	79	2081380	2927837	97918	219920	37,6	2081380	1859342	31,3	18,8	19,3	30,5	12,80875580