

CARLOTA MATEUS GONÇALVES

Licenciada em Produção Alimentar em Restauração

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA
DE ESTIRPES DE *ESCHERICHIA COLI* E *SALMO-*
NELLA SPP. ISOLADAS EM SUÍNOS E CARNES
CRUAS PARA CONSUMO, EM PORTUGAL

MESTRADO EM TECNOLOGIA E SEGURANÇA ALIMENTAR

Universidade NOVA de Lisboa
setembro, 2023

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ESTIRPES DE *ESCHERICHIA COLI* E *SALMONELLA* SPP. ISOLADAS EM SUÍNOS E CARNES CRUAS PARA CONSUMO, EM PORTUGAL

CARLOTA MATEUS GONÇALVES

Licenciada em Produção Alimentar em Restauração

Orientadora: Ângela Maria Chambel Pista,
Investigadora Auxiliar, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Coorientador: Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão,
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando,
Professora Associada, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Arguentes: Ana Filomena Romeira de Jesus Amaro,
Investigadora Auxiliar do Laboratório de Bacteriologia e Micologia,
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Vogais: Ângela Maria Chambel Pista,
Investigadora Auxiliar, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Caracterização fenotípica e genotípica de estirpes de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. isoladas em suínos e carnes cruas para consumo, em Portugal

Copyright © Carlota Mateus Gonçalves, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Presto aqui os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a finalização desta importante etapa da minha vida.

Agradeço, em primeiro lugar, às instituições que tornaram possível a realização desta dissertação de Mestrado, à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Às minhas orientadoras, Doutora Ângela Pista e Professora Doutora Ana Lúcia Leitão, por me terem dado o privilégio de ter a sua orientação, pela disponibilidade, motivação e ensinamentos. À minha orientadora Doutora Ângela Pista pela paciência, por todas as palavras de incentivo e pelo apoio constante, nos bons e maus momentos. Pelo seu profissionalismo e rigor científico. Por todos os conhecimentos que me transmitiu que me fizeram crescer mais crítica, definindo o meu modo de trabalho, o meu grande obrigada! À coorientadora Professora Doutora Ana Lúcia Leitão que desde o primeiro dia acreditou em mim, valorizando sempre o meu potencial. Muito obrigada!

A todos os funcionários do Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Departamento de Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, em especial à Doutora Leonor Silveira por todo o apoio, motivação e generosidade na partilha de conhecimento.

Ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA, em especial à Dra. Rosália Furtado por toda a ajuda, simpatia e boa disposição.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Lisboa por nos ceder os produtos biológicos de matriz animal, sem os quais não seria possível concretizar esta dissertação.

Ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Doenças Infeciosas e à Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA pela colaboração.

Aos meus colegas de laboratório Elena e Ricardo pela vossa amizade, companheirismo e apoio ao longo deste percurso.

Aos meus amigos e colegas de faculdade, em especial à Carolina, à Diana, à Matilde, ao Marcos e à Mariana pelas gargalhadas e boa disposição constante. Sem vocês não seria a mesma coisa!

Às minhas amigas Inês R., Inês M., Joana e Filipa por todos os momentos de descontração, sempre bons, e que são tão importantes, principalmente, em alturas como esta.

Ao Toby, por ser a minha companhia em todos os momentos.

Ao Benjamin, por toda a ajuda, incentivo, força, motivação, carinho, amor e paciência nesta fase mais complicada, por estar sempre ao meu lado e me lembrar, sempre, que sou capaz.

Por último, quero prestar um agradecimento especial à minha família, aos meus pais, aos meus avós, à minha irmã e ao Pedro, pela motivação e apoio incondicional. Especialmente a vós, mãe e pai, obrigada por tudo o que me proporcionaram ao longo do meu percurso académico e de toda a minha vida.

A todos, muito obrigada!

“If I have seen further than others, it is by standing upon the shoulders of giants.”

(Isaac Newton)

RESUMO

As doenças de origem alimentar constituem um grave problema de saúde pública, e os animais produtores de alimentos são uma das principais fontes de contaminação.

Neste estudo foram caracterizadas fenotípica e genotipicamente estirpes de *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Salmonella* spp. isoladas de fezes (n=100) e de carne (n=52) de suínos.

Relativamente à qualidade microbiológica, baseada na contagem de *E. coli* (ufc/g), 7,7% das amostras de carne foram classificadas como insatisfatórias. A bactéria *Salmonella* spp. foi identificada em 5,8% das amostras de carne analisadas, mas não nas fezes. Em 69,2% das amostras de carne e em todas as de fezes foi isolada *E. coli*, tendo sido detetada *E. coli* produtora de toxina *Shiga* (1,9%) e *E. coli* enterotoxigénica (3,9%) nos isolados de fezes. Todos os isolados de *E. coli* sequenciados apresentaram genes de virulência de *E. coli* patogénica extraintestinal, sendo *csgA* e *fimH* os genes mais frequentes (presentes em mais de 90% dos isolados). A diversidade de serotipos e de sequências tipo foi elevada. A resistência a antibióticos foi observada em 75,0% das estirpes de *E. coli* (40,7% multirresistentes - MDR) e em duas das três estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de carne (ambas MDR) e em 71,8% (51,4% MDR) das estirpes de *E. coli* isoladas de fezes. As resistências à tetraciclina, ampicilina e sulfametoxazol foram as mais frequentes, e foram identificados três isolados produtores de β -lactamases de espectro alargado (ESBL). A análise filogenética das estirpes de *E. coli* permitiu identificar quatro *clusters*. No caso das estirpes de *Salmonella* spp., não foram identificados *clusters*.

A presença de *E. coli* patogénicas, *Salmonella* spp. e isolados MDR nas amostras de fezes e de carne de porco, destaca o seu papel como uma potencial fonte de transmissão ao Homem. Este estudo evidencia a necessidade de colaboração entre as várias componentes no âmbito do conceito *One Health*, de modo a estabelecer estratégias de monitorização "do prado ao prato", garantindo a segurança alimentar e promovendo a saúde pública.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; *Salmonella* spp.; Resistência a antimicrobianos; Suínos; Segurança dos alimentos; WGS.

ABSTRACT

Foodborne diseases are a serious public health problem, with food-producing animals considered a primary source of contamination.

In this study, *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Salmonella* spp. isolated from faecal samples (n=100) and from raw pork meat (n=52) were characterised phenotypically and genotypically.

According to their microbiological quality, based on the number of *E. coli* (cfu/g), 7.7% of the meat samples were classified as unsatisfactory. *Salmonella* spp. was detected in 5.8% of the meat samples but not in faeces. *E. coli* was isolated in 69.2% of meat samples and in all faeces, with *Shiga* toxin-producing *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli* detected in 1.9% and 3.9% of the faecal samples, respectively. Sequenced *E. coli* isolates (14 from meat and 47 from faeces) revealed virulence genes for extraintestinal pathogenic *E. coli*, being *csgA* and *fimH* genes the most frequent (present in more than 90%). A high diversity of serotypes and sequence types was identified. Antibiotic resistance was observed in 75.0% of the *E. coli* (40.7% multidrug resistant - MDR) and in two of the three *Salmonella* spp. strains isolated from meat (both MDR), and in 71.8% (51.4% MDR) of the *E. coli* strains isolated from faeces. Tetracycline, ampicillin, and sulfamethoxazole resistance were the most common. Three extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing isolates were identified. The phylogenetic analysis revealed four distinct *E. coli* clusters and none for *Salmonella* spp.

The presence of pathogenic and MDR *E. coli* and *Salmonella* spp. in faeces and meat collected from pigs highlights the role of this animal as a potential source of human contamination. This study shows the critical importance of a One Health approach, emphasizing the importance of collaboration and information sharing amongst all sectors, in order to develop monitoring strategies from farm-to-fork, ensuring food safety and promoting public health.

Keywords: *Escherichia coli*; *Salmonella* spp.; Antimicrobial resistance; Pigs; Food safety, WGS.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Importância da Segurança Alimentar	1
1.2	Doenças de Origem Alimentar	2
1.3	Bactérias Patogénicas de Origem Alimentar	3
1.3.1	<i>Escherichia coli</i>	4
1.3.1.1	Caracterização de <i>E. coli</i>	4
1.3.1.2	Estirpes patogénicas e mecanismos de patogenicidade.....	5
1.3.1.3	Epidemiologia	10
1.3.2	<i>Salmonella</i> spp.	11
1.3.2.1	Caracterização de <i>Salmonella</i> spp.	11
1.3.2.2	Epidemiologia	12
1.4	Animais Produtores de Alimentos: Suínos e Carne de Origem Suína	13
1.4.1	<i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp. em suínos e em carne de origem suína.....	13
1.4.2	Legislação aplicada à enumeração de <i>E. coli</i> e à deteção de <i>Salmonella</i> spp. em carne de origem suína.....	14
1.5	Resistência Antimicrobiana	16
1.5.1	Utilização de antibióticos na criação de animais	20
1.5.2	Disseminação da resistência antimicrobiana ao longo da cadeia alimentar.....	21
1.5.3	Resistência de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp. a antibióticos.....	22
1.6	Métodos de Isolamento e Identificação de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.....	23
1.7	Caracterização de Isolados de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.....	25

1.7.1	Reação de polimerase em cadeia	25
1.7.2	Serotipagem.....	26
1.7.3	Testes de suscetibilidade a antibióticos.....	27
1.7.4	Sequenciação completa do genoma	28
2	OBJETIVOS	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	Amostragem.....	33
3.1.1	Origem e descrição dos produtos biológicos	33
3.2	Isolamento e Identificação de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp. de Carne de Origem Suína	36
3.2.1	Análises microbiológicas.....	37
3.2.1.1	Preparação das amostras	37
3.2.1.2	Contagem e identificação de <i>E. coli</i>	37
3.2.1.3	Pesquisa e identificação de <i>Salmonella</i> spp.	38
3.2.1.4	Crerios microbiológicos utilizados para a interpretação dos resultados obtidos	39
3.3	Isolamento e Identificação de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp. de Fezes de Suínos.....	40
3.4	Identificação de <i>E. coli</i>	41
3.4.1	Equipamento VITEK®	41
3.4.2	Reação de polimerase em cadeia para detecão do gene <i>16S rRNA</i>	41
3.5	Identificação de <i>Salmonella</i> spp.	42
3.6	Caracterização dos Isolados de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.	43
3.6.1	Reação de polimerase em cadeia	45
3.6.1.1	Pesquisa e identificação de fatores de patogenicidade de <i>E. coli</i> (IPEC)	45
3.6.1.2	Identificação da presença de genes de resistência à colistina	48
3.6.2	Serotipagem de <i>Salmonella</i> spp.	50
3.6.3	Testes de suscetibilidade a antibióticos.....	50
3.6.4	Sequenciação completa do genoma	52
3.6.4.1	Extração e quantificação do DNA.....	52
3.6.4.2	Sequenciação completa do genoma	53

3.6.4.3	Análise genômica dos isolados	53
3.7	Análise Estatística.....	54
4	RESULTADOS.....	55
4.1	Avaliação da Qualidade Microbiológica das Amostras Alimentares.....	55
4.2	Isolamento de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.....	56
4.3	Caracterização dos Isolados de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.....	57
4.3.1	Identificação dos patótipos de <i>E. coli</i>	58
4.3.2	Identificação dos genes de virulência de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.....	59
4.3.3	Identificação <i>in silico</i> dos filogrupos de <i>E. coli</i>	63
4.3.4	Identificação dos serotipos de <i>Salmonella</i> spp.....	63
4.3.5	Identificação <i>in silico</i> dos serotipos de <i>E. coli</i>	63
4.3.6	Identificação <i>in silico</i> da sequência tipo.....	64
4.3.7	Previsão <i>in silico</i> da patogenicidade para o Homem.....	66
4.3.8	Identificação fenotípica de resistência a antibióticos	66
4.3.9	Identificação de genes de resistência e relação com o perfil de resistência fenotípica.....	69
4.3.10	Identificação de plasmídeos.....	76
4.4	Análise Filogenética.....	77
5	DISCUSSÃO DE RESULTADOS	81
6	CONCLUSÃO.....	93
	BIBLIOGRAFIA	97
A.	ANEXO: GENES DE VIRULÊNCIA UTILIZADOS NA CLASSIFICAÇÃO DE ExPEC.....	123
B.	ANEXO: GENES DE VIRULÊNCIA DAS ESTIRPES DE <i>SALMONELLA</i> SPP. SUBMETIDAS A WGS.....	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Classificação dos patótipos de <i>E. coli</i>	6
Figura 1.2. Esquema representativo dos mecanismos de invasão de células eucariotas pelos patótipos ETEC, STEC/EHEC, EAEC, EPEC E EIEC.....	9
Figura 1.3. Vias de disseminação de resistência aos antibióticos entre os potenciais reservatórios: o homem, os animais e o ambiente.....	22
Figura 3.1. Distribuição geográfica, por regiões, dos produtores das amostras de carne crua de suíno e das explorações de origem dos suínos enviados para o matadouro.....	34
Figura 3.2. Metodologias utilizadas no isolamento e identificação de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp. de amostras de carne crua.....	36
Figura 3.3. Meio de cultura CCA com crescimentos de colónias de <i>E. coli</i>	37
Figura 3.4. Meio de cultura IRIS com crescimentos de colónias de <i>Salmonella</i> spp.....	38
Figura 3.5. Esquema para isolamento e seleção de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp. de amostras de fezes.....	40
Figura 3.6. Metodologias utilizadas para a caracterização dos isolados de <i>E. coli</i>	43
Figura 3.7. Metodologias utilizadas para a caracterização dos isolados de <i>Salmonella</i> spp... ..	44
Figura 3.8. Método de aglutinação em lâmina, (A) Reação positiva; (B) Reação negativa.....	50
Figura 3.9. Método de difusão em disco (<i>Kirby-Bauer</i>).....	51
Figura 4.1. Meio de cultura CCA com crescimentos de colónias de <i>E. coli</i> (azuis-escuras) isoladas de uma amostra de carne de suínos.....	57
Figura 4.2. Meio de cultura HK com crescimentos de colónias de <i>E. coli</i> (alaranjadas e brilhantes) isoladas de uma amostra de fezes de suínos.	57
Figura 4.3. Meio de cultura IRIS com crescimentos de colónias de <i>Salmonella</i> spp. (cor-de-rosa) isoladas de uma amostra de carne de suínos.....	57
Figura 4.4. Imagem do gel eletroforese resultante da PCR para os genes <i>stx1</i> e <i>stx2</i>	59
Figura 4.5. Genes de virulência identificados nas estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de carne de suínos.	61

Figura 4.6. Genes de virulência identificados nas estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de fezes de suínos.	62
Figura 4.7. Filogrupos, serotipo, sequência tipo e CH <i>type</i> (<i>fumC/fimH</i>) das estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de carne de suínos.	64
Figura 4.8. Filogrupos, serotipo, sequência tipo e CH <i>type</i> (<i>fumC/fimH</i>) das estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de fezes de suínos.	65
Figura 4.9. Perfil de resistência aos antibióticos testados nas estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de carne (n=36) e de fezes de suínos (n=103).	67
Figura 4.10. Genes de resistência a antimicrobianos e mutações pontuais identificados nas estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de carne de suínos.	70
Figura 4.11. Genes de resistência a antimicrobianos e mutações pontuais identificados nas estirpes de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de carne de suínos.	71
Figura 4.12. Genes de resistência a antimicrobianos e mutações pontuais identificados nas estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de fezes de suínos.	72
Figura 4.13. Plasmídeos identificados nas estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de carne e de fezes de suínos.	77
Figura 4.14. Análise filogenética (<i>minimum spanning tree</i>) de <i>E. coli</i> , baseada no cgMLST dos 14 isolados de carne e 47 isolados de fezes de suínos, utilizando o esquema <i>cgMLST V1 + HierCC V1</i> com 2513 <i>loci</i> , disponível na plataforma <i>Enterobase</i>	78
Figura 4.15. Produtor/exploração das amostras de carne/suínos, data de compra/colheita da carne/fezes de suínos, filogrupos, ST, serotipo, perfil de virulência e perfil de resistência dos isolados ExPEC cuja análise filogenética deu origem a <i>clusters</i>	79
Figura 4.16. Análise filogenética (<i>minimum spanning tree</i>) de <i>Salmonella</i> London, baseada no cgMLST de 28 isolados de França, Estados Unidos, Portugal e Canadá, utilizando o esquema <i>cgMLST V2 + HierCC V1</i> , com 3002 <i>loci</i> , disponível na plataforma <i>Enterobase</i>	80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Critérios de segurança e critérios de higiene aplicáveis à carne de suínos.....	15
Tabela 1.2. Classificação de antibióticos de acordo com o mecanismo de ação.	17
Tabela 3.1. Produtores das amostras de carne crua de suíno, agrupados por região.	34
Tabela 3.2. Explorações de origem dos suínos enviados para o matadouro agrupadas por região.	35
Tabela 3.3. Critérios microbiológicos utilizados para a avaliação da qualidade microbiológica da carne de suínos.....	39
Tabela 3.4. Descrição dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação do gene alvo <i>16S rRNA</i> , tamanho do fragmento amplificado e condições da reação de amplificação.	42
Tabela 3.5. Descrição dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação dos genes <i>eae</i> , <i>estp</i> , <i>esth</i> , <i>elt</i> , <i>aaiC</i> , <i>aggR</i> , <i>aatA</i> e <i>ipaH</i> , tamanho do fragmento amplificado e condições da reação de amplificação.....	46
Tabela 3.6. Descrição dos <i>primers</i> utilizados para amplificação dos genes <i>stx1</i> e <i>stx2</i> , tamanho do fragmento amplificado e condições da reação de amplificação.	47
Tabela 3.7. Descrição dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação dos genes alvo <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> , <i>mcr-4</i> , <i>mcr-5</i> , <i>mcr-6</i> , <i>mcr-7</i> , <i>mcr-8</i> e <i>mcr-9</i> , tamanho do fragmento amplificado e condições da reação de amplificação.....	49
Tabela 3.8. Antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.	52
Tabela 4.1. Resultados da contagem de <i>E. coli</i> (ufc/g) e pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. nas amostras de carne de suínos, agrupados pela sua qualidade microbiológica.....	56
Tabela 4.2. Patótipos de <i>E. coli</i> identificados nos isolados de amostras de carne e de fezes de suínos.	58
Tabela 4.3. Filogrupos das estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de carne e de fezes de suínos.	63
Tabela 4.4. Perfis de multirresistência observados nas estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de carne e fezes de suínos.....	68

Tabela 4.5. Perfil de resistência (fenotípico <i>versus</i> genotípico) das estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de carne de suínos.....	73
Tabela 4.6. Perfil de resistência (fenotípico <i>versus</i> genotípico) das estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de fezes de suínos.	74
Tabela 4.7. Perfil de resistência (fenotípico <i>versus</i> genotípico) das estirpes de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de carne de suínos.	76

SIGLAS, ABREVIATURAS & SÍMBOLOS

A	Adenina
A/E	<i>Attaching and effacing lesion</i>
AEQ	Avaliação Externa de Qualidade
AKN	Amicacina
ALG	Algarve
ALT	Alentejo
AMC	Amoxicilina-Ácido clavulânico
AMEG	Grupo de Peritos <i>Ad Hoc</i> sobre a Resistência aos Agentes Antimicrobianos, do inglês <i>Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group</i>
AMP	Ampicilina
APEC	<i>E. coli</i> patogénica aviária, do inglês <i>Avian Pathogenic E. coli</i>
AZM	Azitromicina
C	Citosina
CAZ	Ceftazidima
CC	Carne Crua
CCA	Meio Agar Coliforme Cromogénico, do inglês <i>Chromogenic Coliform Agar</i>
CE	Comunidade Europeia
CGE	<i>Center of Genomic Epidemiology</i>

cgMLST	<i>Core Genome Multilocus Sequence Typing</i>
CHL	Cloranfenicol
CIP	Ciprofloxacina
COX	Cefotaxima
CRO	Ceftriaxona
CT	Centro
D	Desconhecido
DAEC	<i>E. coli</i> de adesão difusa, do inglês <i>Diffusely-adherent E. coli</i>
ddNTPs	Dideoxinucleótidos, do inglês <i>Dideoxynucleotides</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxirribonucleótidos fosfatados, do inglês <i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa, do inglês <i>Enteraggregative E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças, do inglês <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
ECOFFs	Valores de <i>cut-off</i> epidemiológicos, do inglês <i>Epidemiological cut-off values</i>
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, do inglês <i>European Food Safety Authority</i>
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica, do inglês <i>Enterohemorrhagic E. coli</i>
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva, do inglês <i>Enteroinvasive E. coli</i>
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénica, do inglês <i>Enteropathogenic E. coli</i>
ESBL	β -lactamases de espectro alargado, do inglês <i>Extended Spectrum β-Lactamase</i>
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica, do inglês <i>Enterotoxigenic E. coli</i>
EUCAST	Comité Europeu de Avaliação da Suscetibilidade Antimicrobiana, do inglês <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>

ExPEC	<i>E. coli</i> patogénica extraintestinal, do inglês <i>Extraintestinal Pathogenic E. coli</i>
F	<i>Forward</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FEP	Cefepima
FOX	Cefoxitina
g	Gramas
G	Guanina
GC	Guanina e Citosina
GMN	Gentamicina
GN	Caldo de enriquecimento Gram-Negativo
GS	Gelose Simples
h	Horas
H	Flagelar
H₂S	Gás sulfídrico
HACCP	Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos, do inglês <i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>
HK	Meio Agar Hektoen
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
IPEC	<i>E. coli</i> patogénica intestinal, do inglês <i>Intestinal Pathogenic E. coli</i>
LVT	Lisboa e Vale do Tejo
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i>
MDR	Multirresistente, do inglês <i>Multidrug Resistant</i>
MEM	Meropenem
MH	Mueller-Hinton agar
min	Minutos
mL	Mililitros

MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MPEC	<i>E. coli</i> patogénica mamária, do inglês <i>Mammary Pathogenic E. coli</i>
mRNA	RNA mensageiro, do inglês <i>Messenger RNA</i>
n	Número
N	Norte
N/A	Não Aplicável
NAL	Ácido nalidíxico
ND	Não Definido
NGS	Técnica de sequenciação total do genoma, do inglês <i>Next Generation Sequencing</i>
NMEC	<i>E. coli</i> associada à meningite neonatal, do inglês <i>Neonatal Meningitis-causing E. coli</i>
NMP	Número Mais Provável
N/S	Não Significativo
O	Somático
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Reação de polimerase em cadeia, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEF	Pefloxacina
R	<i>Reverse</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic acid</i>
rRNA	RNA ribossómico, do inglês <i>Ribosomal RNA</i>
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
S.	<i>Salmonella</i>
SEPEC	<i>E. coli</i> associada a sépsis, do inglês <i>Human sepsis-associated E. coli</i>
SG	<i>Sven Gard</i>

SHU	Síndrome Hemolítico-Urémica
SM	Suínos Matadouro
SMX	Sulfametoxazol
spp.	Espécies, do inglês <i>species</i>
ST	Sequência tipo, do inglês <i>Sequence Type</i>
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina <i>Shiga</i> , do inglês <i>Shiga toxin-producing E. coli</i>
SX2	<i>Salmonella Xpress 2</i>
T	Timina
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TET	Tetraciclina
TGC	Tigeciclina
Tir	<i>Translocated intimin receptor</i>
Tm	Temperatura de <i>melting</i> , do inglês <i>Melting Temperature</i>
TMP	Trimetoprim
tRNA	RNA transportador, do inglês <i>Transfer RNA</i>
TSA	Testes de Susceptibilidade a Antibióticos
TSB	Caldo de Triptona Soja, do inglês <i>Tryptic Soy Broth</i>
UE	União Europeia
ufc	Unidades formadoras de colónias
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogénica, do inglês <i>Uropathogenic E. coli</i>
URMI-L	Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA
V	Volt
VFDB	<i>Virulence Factors of Pathogenic Bacteria</i>
XLD	Agar Xilose Lisina Desoxicolato, do inglês <i>Xylose Lysine Deoxycholate Agar</i>
WGS	Sequenciação completa do genoma, do inglês <i>Whole Genome Sequencing</i>
µg	Micrograma

μL	Microlitro
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
%	Por cento
<	Menor
>	Maior
$\leq$	Menor ou igual
∞	Infinito

INTRODUÇÃO

1.1 Importância da Segurança Alimentar

A segurança dos alimentos (*food safety*) é uma parte essencial da segurança alimentar (*food security*), sendo fundamental para a promoção da saúde pública (Abebe *et al.*, 2020; Akbar & Anal, 2011; Hemalata & Virupakshaiah, 2016; Karimi, 2022). Adicionalmente, está também interligada com outras áreas essenciais para a vida, como a nutrição, o desenvolvimento socioeconómico e a sustentabilidade ambiental (WHO, 2022).

É desejo do consumidor que os produtos alimentares sejam seguros, ou seja, livres de microrganismos patogénicos, resíduos químicos e quaisquer outros contaminantes (Karimi, 2022). A garantia da segurança dos produtos alimentares depende da implementação de medidas preventivas, nomeadamente pela definição de normas de segurança alimentar. Essas normas estabelecem critérios que visam promover a segurança sanitária dos alimentos, a proteção dos consumidores e garantir práticas justas no comércio de alimentos (DGAV, 2021a).

Em 1963, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) criaram a Comissão do *Codex Alimentarius* (DGAV, 2021a; FAO & WHO, 2023). Este conjunto de normas, códigos, diretivas e recomendações internacionais, que tem tido diversas atualizações ao longo do tempo, é crucial para assegurar que os alimentos tenham qualidade e sejam seguros para consumo humano (DGAV, 2021a; FAO & WHO, 2023). Neste sentido, é fundamental que os governos promovam políticas alinhadas com as normas internacionais estabelecidas pela Comissão do *Codex Alimentarius*, de modo a promover um sistema alimentar global mais seguro, saudável e sustentável (DGAV, 2020; FAO & WHO, 2023).

1.2 Doenças de Origem Alimentar

As doenças de origem alimentar são definidas como doenças de natureza infecciosa ou tóxica causadas pelo consumo de alimentos ou água contaminados (Abebe *et al.*, 2020).

De acordo com os últimos dados da OMS, é estimado que anualmente existam 600 milhões de casos de doenças provocadas pela ingestão de alimentos contaminados a nível mundial, dos quais 420 000 resultam em morte. Destes casos de doença, 40% ocorrem em crianças com menos de cinco anos, e provocam 125 000 mortes (FAO & WHO, 2023).

As doenças transmitidas pela via alimentar são geralmente provocadas pela presença de microrganismos infecciosos (como bactérias, vírus, fungos e parasitas) ou de agentes químicos (como toxinas naturais, poluentes de origem industrial, contaminantes resultantes do processamento alimentar, pesticidas, resíduos de medicamentos veterinários e alergénios) nos alimentos e na água que são consumidos pelo Homem (ASAE, 2023; DGAV, 2020).

As bactérias constituem um dos principais agentes biológicos causadores de doenças de origem alimentar, não só em número como também em frequência (WHO, 2022). Os alimentos podem ser contaminados em diferentes fases da cadeia alimentar, num conceito “do prado ao prato”, ou seja, desde a produção primária, a transformação, a distribuição e a preparação, até ao momento em que existe consumo do alimento (CDC, 2022b; Hemalata & Virupakshaiah, 2016). Neste contexto, todos os intervenientes, como os consumidores, os operadores do setor alimentar, os manipuladores de alimentos, os parceiros políticos, entre outros, são responsáveis por garantir a segurança dos alimentos (Correia *et al.*, 2019). Na produção primária, a contaminação pode ocorrer durante a fase de alimentação dos animais ou através do meio ambiente onde estes se encontram inseridos. Por outro lado, a eliminação de excrementos animais para os cursos de água ou a sua utilização como fertilizantes agrícolas, sem qualquer tratamento prévio, constituem uma potencial fonte de contaminação dos alimentos de origem vegetal e da água de irrigação (Machado-Moreira *et al.*, 2019). Durante o processo de abate, a fase de evisceração pode constituir outra fonte de contaminação dos produtos de origem animal, especialmente quando não são mantidas as condições de higiene adequadas. Ao longo da linha de abate, as bactérias presentes no conteúdo intestinal dos animais podem ser facilmente transferidas para as carcaças, levando à contaminação do produto alimentar final (Abebe *et al.*, 2020; Adzitey *et al.*, 2021). Nos processamentos adicionais, os microrganismos presentes em outros produtos agrícolas crus ou em superfícies de contacto com alimentos, podem também ser importantes fatores contaminantes (CDC, 2022b). Por fim, aquando da preparação dos alimentos (em cozinhas de *caterings*, de restaurantes, de casas particulares), os microrganismos podem ser transferidos de um alimento para outro, através da utilização inadequada de utensílios de cozinha, ou pela manipulação de alimentos por pessoas infetadas (CDC, 2022b; Machado-Moreira *et al.*, 2019).

Quando pelo menos duas pessoas desenvolvem a mesma doença de origem alimentar, após terem ingerido ou bebido os mesmos alimentos contaminados, estamos perante um surto de origem alimentar (EFSA, 2014).

O consumo de alimentos crus, a ocorrência de contaminações cruzadas, o armazenamento impróprio dos alimentos, as más práticas de higiene pessoal por parte dos manipuladores, o arrefecimento e reaquecimento inadequados dos alimentos, e o intervalo de tempo prolongado entre a preparação e o consumo dos alimentos foram mencionados como alguns dos fatores que contribuem para a ocorrência de surtos de origem alimentar (Abebe *et al.*, 2020).

Desta forma, a implementação de boas práticas de higiene, nos sectores alimentar e agrícola, é crucial para reduzir e evitar a propagação de surtos e de doenças transmitidas pela via alimentar (DGAV, 2020).

A diversidade e a gravidade das doenças de origem alimentar, aliadas à complexidade da cadeia de produção alimentar, evidenciam a necessidade de uma abordagem integrada e multidisciplinar, baseada na colaboração e partilha da informação entre as componentes humana, animal e ambiental, no âmbito do conceito *One Health* (Correia *et al.*, 2019).

1.3 Bactérias Patogénicas de Origem Alimentar

Nos últimos anos, os microrganismos patogénicos de origem alimentar tornaram-se um problema de saúde pública mundial, e o seu impacto na saúde (taxa significativa de morbilidade e mortalidade) e na economia tem sido cada vez mais relevante (Abebe *et al.*, 2020; Akbar & Anal, 2011).

A maioria dos microrganismos patogénicos associados a surtos de origem alimentar têm uma origem zoonótica, ou seja, o seu reservatório natural são os animais. Tendo isto em consideração, os alimentos de origem animal representam uma das principais fontes de contaminação associadas a doenças de origem alimentar (Abebe *et al.*, 2020).

Apesar de os dados da OMS evidenciarem que a Europa é a região em que o impacto económico das doenças de origem alimentar é o mais baixo, a nível mundial, estas doenças são um problema de saúde pública disseminado e grave (WHO, 2015; Correia *et al.*, 2019).

De acordo com o último relatório anual de monitorização de zoonoses, elaborado pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) e pelo Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC), foram reportados mais de 200.000 casos de doenças zoonóticas em humanos na União Europeia (UE) em 2021 (EFSA&ECDC, 2022). A maioria dos surtos de origem alimentar estão associados a infeções por *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp.,

Yersinia enterocolitica, *Escherichia coli* produtora da toxina *Shiga* e *Listeria monocytogenes* (EFSA&ECDC, 2022).

Tendo em consideração que o presente estudo incide sobre as bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Salmonella* spp., nos capítulos seguintes apenas serão abordadas estas bactérias.

1.3.1 *Escherichia coli*

1.3.1.1 Caracterização de *E. coli*

A bactéria *Bacterium coli commune* foi identificada pela primeira vez em 1885, após o bacteriologista Theodor Escherich ter isolado uma bactéria em forma de bastonetes em amostras fecais de crianças (Escherich, 1885). Em 1920 a bactéria foi renomeada, e passou a ser designada como *Escherichia coli* (ICMSF, 1996). Esta bactéria é Gram-negativa, da família *Enterobacteriaceae*, não esporulada e que, estruturalmente, tem a forma de bacilo coliforme. É anaeróbia facultativa, geralmente móvel, devido à presença de múltiplos flagelos, e cresce numa ampla gama de temperaturas (entre 7 e 45°C), sendo a temperatura ótima de crescimento entre os 35 e 40°C (Allocati *et al.*, 2013; Parija, 2012; Poli *et al.*, 2005). Cresce facilmente em meios de cultura ou meios sintéticos simples, apenas com glicerol ou glicose como o único nutriente. É fermentadora de lactose e glucose, catalase positiva e citocromo c-oxidase negativa (Aryal, 2022c; Parija, 2012). Esta bactéria é indicadora de contaminação fecal em águas e alimentos, refletindo o estado sanitário e de segurança dos mesmos (Ghafir *et al.*, 2008).

As estirpes de *E. coli* podem ser classificadas serologicamente com base nas diferenças dos antígenos somáticos (O) e flagelares (H), de acordo com o esquema de serotipagem desenvolvido em 1947 por Kauffmann (Kauffman, 1947). O conjunto de estirpes caracterizadas pelo mesmo antígeno O constitui um serogrupo, enquanto a combinação específica dos antígenos O e H define o serotipo (Sora *et al.*, 2021). Associar uma estirpe de *E. coli* a um serogrupo ou serotipo específico pode fornecer alguns indícios sobre a presença de determinados fatores de patogenicidade e sobre a capacidade de causar sintomas específicos no ser humano. No entanto, o serotipo, por si só, não é suficiente para identificar características genotípicas ou definir o grau de patogenicidade de *E. coli*. Por exemplo, devido ao fenómeno de transferência horizontal de genes entre as bactérias, é possível que estirpes com características fenotípicas idênticas (ou seja, com o mesmo serotipo) apresentem diferenças genotípicas (por exemplo, diferentes fatores de patogenicidade) (Sora *et al.*, 2021).

Neste sentido, e para além do esquema de classificação de Kaufmann, os isolados de *E. coli* podem ser classificados em patotipos, com base no seu perfil patogénico, que considera os fatores de virulência e as doenças associadas, principalmente no caso das infeções clínicas (Geurtsen *et al.*, 2022; Kaper *et al.*, 2004; Sora *et al.*, 2021).

1.3.1.2 Estirpes patogénicas e mecanismos de patogenicidade

A bactéria *E. coli* faz parte da microbiota intestinal dos seres humanos e dos animais de sangue quente. No entanto, apesar de a maioria das estirpes de *E. coli* serem comensais, algumas desenvolvem e apresentam mecanismos patogénicos que podem ser transmitidos ao Homem, a diversas espécies animais e ao ambiente (Adzitey *et al.*, 2021; Geurtsen *et al.*, 2022). Cada patotipo de *E. coli* tem associado mecanismos de patogenicidade característicos e apresenta um perfil específico de fatores de virulência (Pakbin *et al.*, 2021a).

Diversas características conferem patogenicidade à bactéria *E. coli*, desde a produção de toxinas, à presença de proteínas envolvidas na adesão, colonização e invasão celular (Pakbin *et al.*, 2021a; Sarowska *et al.*, 2019; Sora *et al.*, 2021). Estes fatores de patogenicidade são codificados por genes específicos localizados no cromossoma ou em elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposões, bacteriófagos, ilhas de patogenicidade) das bactérias patogénicas (Kaper *et al.*, 2004; Pakbin *et al.*, 2021a).

Com base na sua capacidade de causar infeção dentro ou fora do sistema gastrointestinal, podem ser definidos dois grupos principais de *E. coli* patogénicas: *E. coli* patogénica intestinal (IPEC) e *E. coli* patogénica extraintestinal (ExPEC) (Kaper *et al.*, 2004; Sarowska *et al.*, 2019; Sora *et al.*, 2021).

No grupo IPEC, podem ser considerados seis patotipos: (1) *E. coli* enteropatogénica (EPEC), (2) *E. coli* produtora de toxina *Shiga*/enterohemorrágica (STEC/EHEC), (3) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), (4) *E. coli* enteroagregativa (EAEC), (5) *E. coli* de adesão difusa (DAEC) e (6) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (Kaper *et al.*, 2004; Sora *et al.*, 2021) (**Figura 1.1.**).

Por outro lado, o grupo ExPEC integra os seguintes patotipos: *E. coli* uropatogénica (UPEC), *E. coli* associada a meningite neonatal (NMEC), *E. coli* associada a sépsis (SEPEC), *E. coli* patogénica aviária (APEC) e *E. coli* patogénica mamária (MPEC), este último observado em bovinos (**Figura 1.1.**) (Sora *et al.*, 2021).

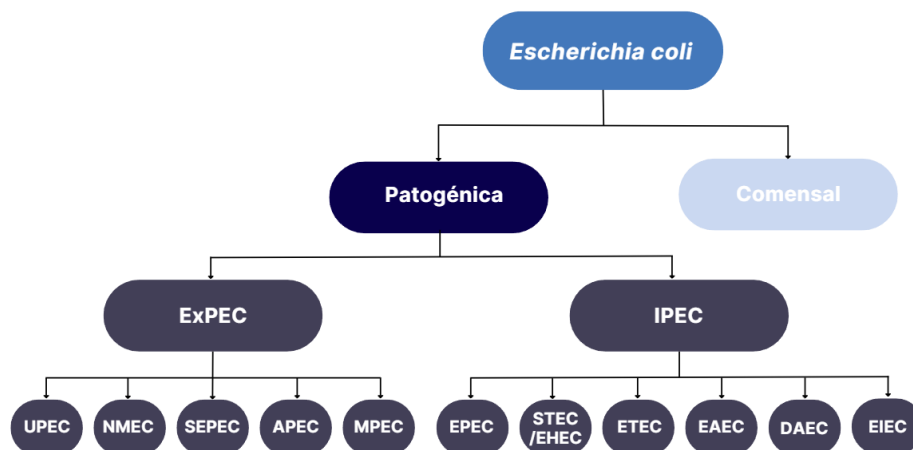


Figura 1.1. Classificação dos patótipos de *E. coli* (Adaptado de Sora *et al.*, 2021).

ExPEC, *E. coli* patogénica extraintestinal; UPEC, *E. coli* uropatogénica; NMEC, *E. coli* associada a meningite neonatal; SEPEC, *E. coli* associada a sépsis; APEC, *E. coli* patogénica aviária; MPEC, *E. coli* patogénica mamária; IPEC, *E. coli* patogénica intestinal; EPEC, *E. coli* enteropatogénica; STEC/EHEC, *E. coli* produtora de toxina Shiga/enterohemorrágica; ETEC, *E. coli* enterotoxigénica; EAEC, *E. coli* enteroagregativa; DAEC, *E. coli* de adesão difusa; EIEC, *E. coli* enteroinvasiva.

EPEC:

O patótipo EPEC é uma das principais causas de diarreia em crianças. Esta bactéria tem a capacidade de colonizar o intestino, aderindo inicialmente à superfície do epitélio intestinal sob a forma de microcólonias localizadas (aderência localizada). Numa fase posterior, induz o aparecimento de uma lesão típica nas células intestinais, denominada *attaching and effacing lesion* (A/E). Os sintomas mais comuns da infeção por EPEC incluem diarreia aquosa e mucosa, mas sem sangue, febre, mal-estar e vômitos (Food and Drug Administration, 2012; Geurtsen *et al.*, 2022; Kaper *et al.*, 2004; Nataro & Kaper, 1998).

A identificação molecular de EPEC pode ser realizada, por exemplo, pela deteção do gene *eae*, o gene responsável pela produção de intimina. Esta proteína liga-se ao *translocated intimin receptor* (Tir), sintetizado pela bactéria e responsável pela sua aderência às células do hospedeiro (Meng *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2005; Thakur *et al.*, 2018).

STEC/EHEC:

O mecanismo de patogenicidade de STEC não está ainda completamente elucidado, apesar de se terem identificado importantes fatores de virulência (Lee *et al.*, 2020). A toxina Shiga é codificada pelos genes *stx*, e representa o principal fator de virulência no patótipo STEC/EHEC (Food and Drug Administration, 2012; Kaper *et al.*, 2004; Thakur *et al.*, 2018).

Apesar de todas as estirpes de STEC terem a capacidade de produzir a toxina Shiga, algumas não estão associados a doenças humanas graves. Por este motivo foi criado o termo EHEC, que integra as estirpes de *E. coli* produtoras da toxina Shiga, que adquiriram outros

fatores de virulência específicos, associadas a doenças mais graves. O termo STEC, mais global, compreende as duas categorias e é o mais amplamente utilizado (Joseph *et al.*, 2020; Kaper *et al.*, 2004).

As bactérias STEC/EHEC estão frequentemente associadas a surtos de doenças de origem alimentar e são consideradas de grande relevância nas áreas da segurança alimentar e da saúde pública. O serotipo mais frequente e mais conhecido é o O157:H7 (WHO, 2018b), mas existem outros serogrupos (serotipos) que têm sido associados a importantes surtos, e integram o "Top 7" da vigilância epidemiológica de STEC/EHEC na Europa, nomeadamente na área alimentar: O26 (O26:H11), O45 (O45:H2), O103 (O103:H2), O111 (O111:H8), O121 (O121:H19), e O145 (O145:H28) (EFSA&ECDC, 2022).

A infecção humana causada por STEC/EHEC pode apresentar um amplo espectro clínico. De entre as situações clínicas mais graves, destaca-se a síndrome hemolítico-urémica (SHU), em que os sintomas de diarreia, com ou sem sangue, podem progredir e dar origem a uma doença grave, caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e lesão renal aguda, que pode evoluir para falência renal (Food and Drug Administration, 2012; Geurtsen *et al.*, 2022). A incidência é maior em crianças com menos de cinco anos e mais frequente nos meses quentes do ano (ECDC, 2022a).

A identificação molecular de STEC/EHEC pode ser realizada através da deteção de genes *stx*, característicos da presença da toxina *Shiga*. Existem 2 tipos principais de *stx* (*stx1* e *stx2*) que estão ainda subdivididos em subtipos (atualmente, 4 para *stx1* e 15 para *stx2*) (Lindsey *et al.*, 2023). Apesar da presença do gene *eae* não ser estritamente necessária para caracterizar *E. coli* como STEC/EHEC, a sua presença indica que o isolado apresenta maior virulência (EFSA, 2013; Joseph *et al.*, 2020).

ETEC:

O patotipo ETEC é a causa mais comum de uma doença conhecida como diarreia do viajante (Thakur *et al.*, 2018). Esta bactéria coloniza o intestino delgado através de várias fímbrias de superfície, tendo capacidade de produzir toxinas que se podem distinguir com base na resistência térmica, peso molecular e modo de ação. As bactérias ETEC produzem duas classes de enterotoxinas: as termoestáveis e as termolábeis (Food and Drug Administration, 2012; Kaper *et al.*, 2004; Nataro & Kaper, 1998). Os sintomas mais comuns da infecção por ETEC são diarreia aquosa e dor abdominal (Food and Drug Administration, 2012).

Para a identificação molecular de *E. coli* enterotoxigénica podem ser detetados, por exemplo, os genes, *elt* e *est*, associados à expressão das toxinas termolábeis e das toxinas termoestáveis, respetivamente (Food and Drug Administration, 2012; Nguyen *et al.*, 2005; Thakur *et al.*, 2018).

EAEC:

O patotipo EAEC é considerado um microrganismo patogénico emergente de origem alimentar, principalmente associado a diarreia infantil persistente e aguda, e consequentemente a atraso no crescimento, em países em desenvolvimento (Kaper *et al.*, 2004; Thakur *et al.*, 2018). A ação de EAEC envolve a adesão ao epitélio intestinal através de fímbrias de adesão agregativa I (reguladas pelo gene *aggR*), a formação de um biofilme espesso, e a produção de enterotoxinas e citotoxinas secretoras (Kaper *et al.*, 2004; Nataro & Kaper, 1998). As estirpes de EAEC, tal como o nome indica, são caracterizadas pelo seu padrão de aderência agregativa, em que as bactérias aderem umas às outras, numa conformação semelhante a "tijolos empilhados" (conformação *stacked-brick*), provocando a autoaglutinação dos enterócitos (Nataro & Kaper, 1998; Parija, 2012).

Os genes *aatA* (gene responsável pela produção da dispersina do sistema de transporte) e *aggR* (gene responsável pela produção do fator de transcrição AggR, que ativa a transcrição de diversos genes de patogenicidade), são característicos da infeção por EAEC, e podem ser utilizados para identificar estirpes típicas da bactéria. O gene *aaiC*, pertencente ao grupo cromossómico denominado Aai, e responsável pela produção de uma proteína secretada pelo sistema de secreção de tipo IV codificado no agrupamento cromossómico Aai, pode ser utilizado para diferenciar estirpes típicas e atípicas de EAEC (Boisen *et al.*, 2012; Jensen *et al.*, 2014).

EIEC:

As estirpes de EIEC são pouco frequentes, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (Aryal, 2022a). O mecanismo de patogenicidade de EIEC é muito semelhante ao das espécies de *Shigella*, partilhando de diversos fatores de virulência (Istituto Superiore di Sanità, 2013; Kaper *et al.*, 2004). Esta bactéria multiplica-se na mucosa do cólon, invadindo as células epiteliais adjacentes, e pode, eventualmente, causar uma úlcera no intestino (Food and Drug Administration, 2012; Kaper *et al.*, 2004; Nataro & Kaper, 1998). Os sintomas mais comuns da infeção incluem diarreia profusa, mucosa e sanguinolenta, febre e cólicas abdominais (Food and Drug Administration, 2012; Pakbin *et al.*, 2021a).

Para a identificação molecular de *E. coli* enteroinvasiva pode detetar-se, por exemplo, o gene *ipaH*, responsável pela produção da proteína efetora que inicia a cascata da ubiquitina, associada ao processo de invasão da bactéria às células hospedeiras (Istituto Superiore di Sanità, 2013).

Na **Figura 1.2.** encontra-se um esquema representativo dos mecanismos de invasão de células eucariotas pelos patotipos acima mencionados: ETEC, STEC/EHEC, EAEC, EPEC e EIEC.

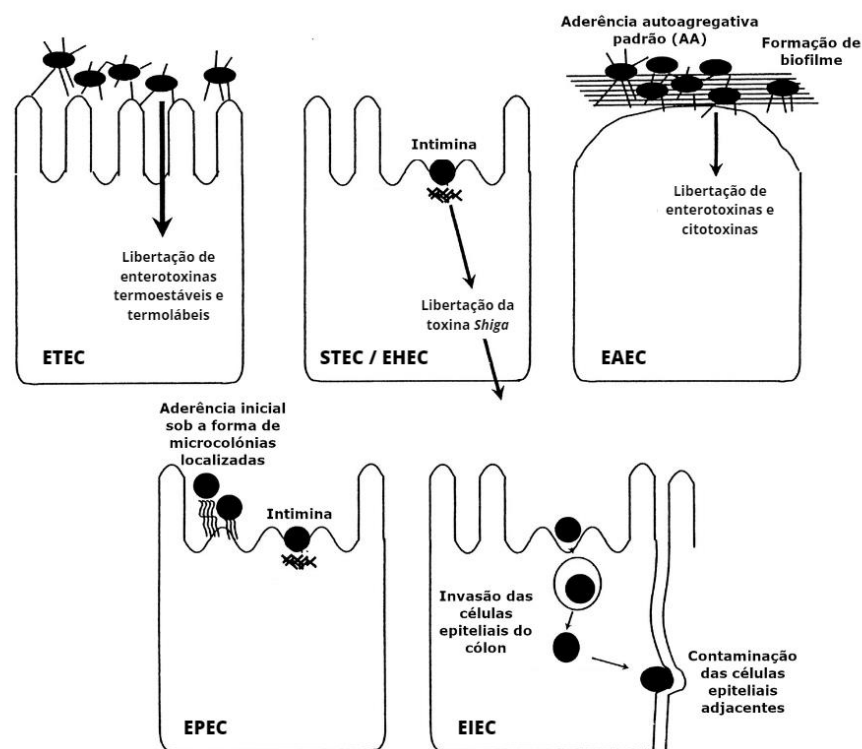


Figura 1.2. Esquema representativo dos mecanismos de invasão de células eucariotas pelos patótipos ETEC, STEC/EHEC, EAEC, EPEC E EIEC (Adaptado de Nataro & Kaper, 1998).

ETEC, *E. coli* enterotoxigênica; STEC/EHEC, *E. coli* produtora de toxina Shiga/enterohemorrágica; EAEC, *E. coli* enteroagregativa; EPEC, *E. coli* enteropatogênica; EIEC, *E. coli* enteroinvasiva.

ExPEC:

O grupo ExPEC é responsável por causar infecções fora do sistema gastrointestinal, nomeadamente no trato urinário e no sistema circulatório dos seres humanos (e outros animais). As infecções urinárias representam as infecções extraintestinais mais comuns no Homem, e são causadas por estirpes designadas como UPEC (Meena *et al.*, 2022; Sora *et al.*, 2021).

Os fatores de virulência de ExPEC são numerosos, e podem ser divididos em cinco categorias principais: adesinas, codificadas, por exemplo, pelos genes *fim*, *afa*, *dra*, *pap*, *sfa*, *foc*, *iha*, *mat*, *crl*, *csg*, *agn43(flu)*; invasinas, codificadas, por exemplo, pelos genes *ibeA*, *B*, *C*; sistemas de aquisição de ferro, os sideróforos, codificados, por exemplo, pelos genes *iuc*, *era*, *irp*, *iroN*, *chu*, *hma*, *sitA,B,C*; proteínas protetoras, as protetinas, codificadas, por exemplo, pelos genes *traT*, *KpsMI-neuA*, *KpsMII*, *ompA*, *iss*, *colV*, *cvaC*; e toxinas, codificadas por genes como *pic*, *sat*, *vat*, *hlyA*, *cnf*, *cdt* (Sarowska *et al.*, 2019; Sora *et al.*, 2021).

Para além da presença de fatores de patogenicidade específicos destas bactérias, são necessárias características específicas no hospedeiro para o desenvolvimento de doença. Por essa

razão, ExPEC são consideradas uma causa necessária, porém não suficiente, para a ocorrência de infeções extraintestinais por *E. coli* (Sarowska *et al.*, 2019; Sora *et al.*, 2021).

1.3.1.3 Epidemiologia

1.3.1.3.1 Reservatórios e Transmissão

A bactéria *E. coli* está presente no trato intestinal dos humanos e de outros animais de sangue quente (Poli *et al.*, 2005).

A transmissão desta bactéria ocorre principalmente por via fecal-oral, através do consumo de alimentos contaminados com fezes de seres humanos ou animais, do contacto direto entre pessoas, e do contacto direto com animais, principalmente em ambientes de produção agrícola (WHO, 2018a; Manyi-Loh & Lues, 2023).

No caso particular de STEC/EHEC, o principal reservatório são os ruminantes, em particular os bovinos, seguido dos ovinos e dos caprinos (Abebe *et al.*, 2020). Este patotipo é essencialmente transmitido ao Homem através do consumo de alimentos contaminados, nomeadamente através do consumo de carne de vaca crua ou mal-cozinhada, e do consumo de leite cru e seus derivados (Abebe *et al.*, 2020; ECDC, 2022a; FAO & WHO, 2022; WHO, 2018a).

1.3.1.3.2 Prevalência e surtos associados

O patotipo STEC/EHEC é um importante microrganismo patogénico de origem alimentar, sendo responsável por surtos em diversas regiões do mundo. Foram notificados surtos na Europa, nos Estados Unidos, no Canadá, na Ásia e na Austrália (Abebe *et al.*, 2020; EFSA&ECDC, 2022).

A infeção por STEC/EHEC foi a quarta infeção gastrointestinal de origem alimentar mais reportada em humanos na UE, em 2021 (EFSA&ECDC, 2022).

A notificação de infeções por STEC/EHEC, ao contrário do que acontece para os restantes patotipos de *E. coli*, é obrigatória em praticamente todos os países na União Europeia (com exceção de França e Bélgica, onde é voluntária), não só para a área clínica, mas também para o setor alimentar e animal (ECDC, 2022a).

De acordo com o relatório anual epidemiológico de monitorização de infeções por STEC/EHEC, o número de casos confirmados em 2021 foi de 6.534, o que corresponde a uma taxa de notificação na UE de 2,2 por 100.000 habitantes. Este valor representa um aumento de 37,5% em relação ao ano de 2020 (ECDC, 2022a). De salientar que em 2020, o ECDC, registou o menor número de casos em humanos desde o início da vigilância de STEC/EHEC a nível da UE, o que poderá ser explicado pela saída do Reino Unido da UE, bem como pelo impacto da pandemia por COVID-19 (ECDC, 2022a).

Em Portugal, e de acordo com os registos oficiais, foram reportados dois casos clínicos de infeções por STEC/EHEC em 2021, o que representa uma taxa de 0,02 por 100.000 habitantes (ECDC, 2022a).

Na Europa, em 2021 foram reportados 31 surtos de origem alimentar por STEC/EHEC, que causaram 275 casos de doença e 47 hospitalizações, não se registando mortes. A carne de vaca e os produtos derivados, os produtos de origem vegetal (frutas e vegetais) e o leite cru e derivados, foram os principais alimentos associados aos surtos de STEC/EHEC (EFSA&ECDC, 2022).

1.3.2 *Salmonella* spp.

1.3.2.1 Caracterização de *Salmonella* spp.

O género *Salmonella* foi descoberto pelo veterinário Daniel Elmer Salmon e pelo seu assistente, Theobald Smith, em 1884 (Salmon, 1884).

As espécies de *Salmonella* são bactérias Gram-negativas, não esporuladas, da família *Enterobacteriaceae*. São anaeróbias facultativas e apresentam motilidade peritrica (Jajere, 2019; Talib *et al.*, 2022; Uzairue & Shittu, 2023). Podem multiplicar-se numa ampla gama de temperaturas (7 - 45°C), sendo a sua temperatura ideal de crescimento de 37°C (Uzairue & Shittu, 2023). Esta bactéria identifica-se bioquimicamente como positiva para catalase e vermelho de metilo, e negativa nos testes de urease e oxidase. É um microrganismo geralmente produtor de gás sulfídrico (H₂S), que fermenta a glucose, mas não a lactose (Talib *et al.*, 2022).

Este género inclui duas espécies: *Salmonella* (*S.*) *enterica* e *S. bongori*. A maioria das estirpes de *Salmonella* spp. responsáveis por infeções nos seres humanos (salmonelose) ou outros animais de sangue quente pertencem à espécie *S. enterica*, que inclui seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV), e *S. enterica* subsp. *indica* (V) (Ehuwa *et al.*, 2021; Pławinska-Czarnak *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2018).

Com base no sistema de serotipagem de *White-Kaufman-LeMinor*, as seis subespécies de *S. enterica* são ainda classificadas em diversos serotipos (**ponto 3.6.2**) (Grimont & Weill, 2007). Os mais de 2600 serotipos de *S. enterica* podem ainda ser subdivididos em duas categorias principais: serotipos tifoides e não tifoides, sendo que ambos provocam doença no Homem (EFSA, 2022). Os serotipos tifoides (*S. Typhi* e *S. Paratyphi*) estão associados a uma doença infecciosa potencialmente fatal, conhecida como febre tifoide ou paratifoide (EFSA, 2022; Uzairue & Shittu, 2023). Os serotipos não tifoides estão associados, maioritariamente, a casos de gastroenterite (EFSA, 2022; Uzairue & Shittu, 2023).

1.3.2.2 Epidemiologia

1.3.2.2.1 Reservatórios e Transmissão

Embora o principal reservatório de *Salmonella* spp. sejam as aves e os suínos, estas bactérias encontram-se amplamente distribuídas na natureza, sendo isoladas numa grande diversidade de animais e no ambiente (Abebe *et al.*, 2020; EFSA, 2022).

Os serotipos de *S. enterica* subsp. *enterica*, que representam mais de 99,5% das estirpes isoladas, bem como a subespécie *salamae* estão maioritariamente associados a infeções em animais de sangue quente. Por outro lado, as subespécies *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* estão geralmente associadas a animais de sangue-frio e ao ambiente (Graziani *et al.*, 2017; Lamas *et al.*, 2018).

O principal meio de transmissão de *Salmonella* não tifoide é a ingestão de alimentos ou água contaminados, e o contacto direto com animais (EFSA, 2022). Estes microrganismos encontram-se disseminados na natureza devido a contaminação fecal, uma vez que são excretados no meio ambiente pelos seus hospedeiros. Consequentemente, podem ser encontrados numa grande variedade de alimentos de origem animal, bem como em frutas e vegetais (Andino & Hanning, 2015; EFSA, 2022).

1.3.2.2.2 Prevalência e surtos associados

A salmonelose é uma das doenças de origem alimentar mais frequentes, tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos, embora as taxas de incidência variem consoante o país (Abebe *et al.*, 2020).

Esta foi a segunda infeção gastrointestinal de origem alimentar mais reportada em humanos na UE em 2021, sendo responsável por 29% de todos os casos humanos confirmados (EFSA&ECDC, 2022).

De acordo com o relatório anual epidemiológico de monitorização de salmoneloses, em 2021 o número de casos confirmados foi de 61.236, o que corresponde a uma taxa de notificação na UE de 16,6 por 100.000 habitantes. Este valor representa um aumento de 14% em relação a 2020 (ECDC, 2022b). De salientar que no ano de 2020, à semelhança do observado para os casos de infeção por STEC/EHEC, o ECDC registou o menor número de casos de salmonelose em seres humanos desde o início da vigilância de *Salmonella* spp. a nível da UE (EFSA&ECDC, 2022). Também nestes casos, a notificação é obrigatória em praticamente todos os países na União Europeia (ECDC, 2022b). Os principais serotipos de *Salmonella* spp. associados às infeções humanas foram *S. Enteritidis* (54%), *S. Typhimurium* (11%) e *S. Typhimurium* monofásica (1,4,[5],12:i:-) (9%) (ECDC, 2022b).

Em Portugal, em 2021, foram reportados 361 casos de salmonelose, o que representa uma taxa de 3,5 por 100.000 habitantes (ECDC, 2022b).

As espécies de *Salmonella* foram responsáveis por 19,4% de todos surtos de origem alimentar na UE em 2021. No total, foram reportados 773 surtos de origem alimentar por *Salmonella* spp. que causaram 6755 doenças, 1123 hospitalizações e 1 morte. A maioria dos surtos de origem alimentar foram causados por *S. Enteritidis* (EFSA&ECDC, 2022).

Os ovos e produtos derivados, a carne de porco e produtos cárneos derivados, e os produtos de origem vegetal (frutas, vegetais e produtos derivados) constituem os principais alimentos associados a surtos e casos de salmonelose na Europa (EFSA&ECDC, 2022).

1.4 Animais Produtores de Alimentos: Suínos e Carne de Origem Suína

A UE é o segundo maior produtor mundial de suínos, a seguir à China, e o maior exportador de suínos e de produtos à base de carne de porco (Renaudeau & Dourmad, 2022).

Em Portugal, a fileira suinícola representa uma atividade económica relevante, contribuindo para o abastecimento alimentar das populações, para o equilíbrio da balança comercial portuguesa e para o desenvolvimento económico das regiões onde esta atividade se insere (Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral, 2022).

De acordo com a FAO, a carne de porco é a carne mais consumida no mundo (34%), constituindo uma parte substancial da dieta da maioria da população mundial (Costa *et al.*, 2023). A carne de suíno constitui uma importante fonte de proteína de elevada qualidade, a par de algumas vitaminas e minerais essenciais para a nutrição humana (Rajaei *et al.*, 2021). No entanto, este produto de origem animal é considerado uma das principais fontes de transmissão de microrganismos patogénicos, nomeadamente de *E. coli* e de *Salmonella* spp. (Abebe *et al.*, 2020; Rajaei *et al.*, 2021).

1.4.1 *E. coli* e *Salmonella* spp. em suínos e em carne de origem suína

Diversos estudos têm revelado a presença de *E. coli* não patogénica (Costa *et al.*, 2022a; Lugsomya *et al.*, 2018) e patogénica, nomeadamente de EPEC (fezes de suínos - 49,1%; carne de porco - 21,4%), de STEC/EHEC (fezes de suínos - 3,2%; carne de porco - 3,6%) e de ETEC (fezes de suínos - 16,1%; carne de porco - 3,6%) em fezes de suínos e carne de porco para consumo (Wang *et al.*, 2017).

Apesar do principal reservatório de STEC/EHEC ser o gado bovino, a deteção de STEC/EHEC em fontes de origem suína tem sido descrita em vários países, nomeadamente

nos Estados Unidos (65,3%) (Tseng *et al.*, 2015), em Itália (52,1%) (Arancia *et al.*, 2019), na Argentina (4,1%) (Colello *et al.*, 2016), na África do Sul (3,5%) (Abdalla *et al.*, 2022) e no México (2,3%) (Tamayo-Legorreta *et al.*, 2020). Foram igualmente identificados surtos de STEC/EHEC associados ao consumo de produtos preparados com carne de porco (Honish *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

Segundo os últimos dados do relatório anual de monitorização de zoonoses da UE, a prevalência de STEC/EHEC isolada de carne de porco foi de 16,6% e de suínos foi de 11,8% (EFSA&ECDC, 2022).

No que se refere às infeções humanas por *Salmonella* spp., em 2021, 29,7% dos casos de salmonelose reportados na UE foram atribuídos a fontes de origem suína (EFSA&ECDC, 2022). Os serotipos mais frequentes em suínos e carne de porco têm sido *S. Typhimurium* (42,0% - 2019, 33,5% - 2020, 29,7% - 2021); *S. Typhimurium* monofásica (72,1% - 2019, 45,1% - 2020, 65,4% - 2021) e *S. Derby* (72,0% - 2019, 68,8% - 2020, 75,3% - 2021). Estes três serotipos estão também entre os principais serotipos isolados em humanos (EFSA&ECDC, 2021a; EFSA&ECDC, 2021b; EFSA&ECDC, 2022).

O risco de infeção por *Salmonella* spp. associado ao consumo de carne de origem suína é agravado pela sua prevalência em matadouros (31,3%) e em animais de produção assintomáticos (24,1%), que atuam como portadores da bactéria (Ma *et al.*, 2017).

Foi demonstrado que o risco de contaminação por *Salmonella* spp. aumenta ao longo da cadeia de produção de carne de porco, atingindo o seu “pico” no matadouro (Roasto *et al.*, 2023; Martelli *et al.*, 2021). O ambiente do matadouro e as operações da linha de abate parecem não só incluir serotipos provenientes dos suínos (*S. Typhimurium*, *Typhimurium* monofásica, *Derby* e *Rissen*), mas também propagá-los através de processos de contaminação cruzada, que envolvem os manipuladores da carne (Campos *et al.*, 2019; Gomes-Neves *et al.*, 2014; Lauteri *et al.*, 2022).

1.4.2 Legislação aplicada à enumeração de *E. coli* e à deteção de *Salmonella* spp. em carne de origem suína

Nos termos do disposto no artigo 4.º do Regulamento (CE) n.º 852/2004 de 29 de abril, os operadores das empresas do setor alimentar, nomeadamente do setor da carne e produtos cárneos, devem respeitar os critérios microbiológicos que definem a aceitabilidade dos géneros alimentícios ou dos seus processos de fabrico, manuseamento e distribuição, baseando-se na ausência ou na presença de determinados microrganismos (Regulamento (CE) n.º 852/2004, 2004). Neste contexto, o Regulamento (CE) n.º 1441/2007 da Comissão, de 5 de dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005, estabelece os critérios de segurança e os critérios de higiene dos processos que devem ser cumpridos pelos operadores das

empresas do setor alimentar, para garantir a segurança dos alimentos (Regulamento (CE) n.º 2073/2005, 2005; Regulamento (CE) n.º 1441/2007, 2007).

Relativamente aos critérios de segurança aplicáveis a carne de suínos, para *Salmonella* spp. estão definidos critérios para carne picada, preparados de carne e carne separada mecanicamente. Estes critérios definem a qualidade microbiológica dos produtos em: satisfatória, se todos os valores observados indicarem a ausência da bactéria, e em insatisfatória, se for detetada a presença da bactéria em qualquer uma das unidades da amostra (**Tabela 1.1.**). Relativamente à bactéria *E. coli*, não estão definidos critérios microbiológicos de segurança aplicáveis a carnes.

Quanto aos critérios de higiene dos processos aplicáveis à cadeia de produção de suínos, estão definidos critérios para *E. coli*, utilizada como indicadora de contaminação fecal, para carne picada, carne separada mecanicamente e preparados de carne. Estes critérios definem a qualidade microbiológica dos processos de produção em satisfatória, aceitável e insatisfatória (**Tabela 1.1.**).

Tabela 1.1. Critérios de segurança e critérios de higiene aplicáveis à carne de suínos (Adaptado de Regulamento (CE) n.º 1441/2007).

Categoria de alimentos	Microrganismos	Plano de amostra- gem		Limites		Método de análise de referência	Fase em que o critério se aplica
		n	c	m	M		
Critérios de segurança							
Carne picada; Pre- parados de carne; Carne separada mecanicamente	Salmonella spp.	5	0	Não detetado em 10 g		ISO 6579-1	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil
Critérios de higiene							
Carne picada; Carne separada mecanicamente	E. coli	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 ou 2	Fim do processo de fabrico
Preparados de carne	E. coli	5	2	500 ufc/g ou cm²	5000 ufc/g ou cm²	ISO 16649-1 ou 2	Fim do processo de fabrico

n, número de unidades que constituem a amostra; c, número de unidades da amostra com valores entre m e M; m e M, limites microbiológicos que determinam a aceitabilidade dos géneros alimentícios; ufc/g, unidades formadoras de colónias por grama; g, grama.

1.5 Resistência Antimicrobiana

Os antimicrobianos são substâncias naturais, sintéticas ou semissintéticas que têm a capacidade de inibir o crescimento, ou até mesmo eliminar, um microrganismo, sendo utilizados para prevenir e tratar infecções causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas em humanos, animais e plantas. Estas substâncias incluem antibióticos, antivirais, antifúngicos, desinfetantes e antissépticos (O'Neill, 2016; WHO, 2021).

A resistência antimicrobiana define-se como a capacidade de os microrganismos, como é o caso das bactérias, se tornarem resistentes a um antimicrobiano ao qual eram anteriormente suscetíveis (O'Neill, 2016; WHO, 2021). Essa resistência pode ocorrer de forma natural, inerente à própria espécie bacteriana, ou ser adquirida, como resultado de modificações genéticas (mutações e aquisição de novos genes) (Direção-Geral da Saúde, 2019; Passadouro, 2021; Fernandes *et al.*, 2022; Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

Nos últimos anos tem-se observado um número crescente de bactérias resistentes aos antibióticos, o que se traduz num grave problema de saúde pública e de segurança alimentar. Na ótica da segurança alimentar, o risco pode ser direto, quando o microrganismo patogénico resistente está presente no alimento ingerido, ou indireto, dado que os genes de resistência do microrganismo podem ser transmitidos ao longo da cadeia alimentar a outras bactérias (Rajaei *et al.*, 2021; Sora *et al.*, 2021).

A Comissão Europeia, em conjunto com os Estados-Membros, considerou a resistência antimicrobiana como uma das três ameaças à saúde pública mais preocupantes do século XXI (Health Emergency Preparedness and Response Authority, 2022). Por ano, morrem cerca de 35.000 pessoas na Europa com infeções não tratáveis, devido à ocorrência de estirpes bacterianas patogénicas resistentes a antimicrobianos (ECDC, 2022c). Caso não sejam aplicadas medidas eficazes, são estimadas 10 milhões de mortes, a nível global, no ano de 2050, maioritariamente associadas a infeções por bactérias Gram-negativas (EClinicalMedicine, 2021; O'Neill, 2016).

O uso excessivo e inadequado de antibióticos na prática clínica e na medicina veterinária, nomeadamente nos animais destinados ao consumo humano, representa o maior risco de disseminação das resistências antimicrobianas no ecossistema (WHO, 2021). Como tal, uma utilização prudente e responsável dos antibióticos é crucial para reduzir o risco da resistência bacteriana. Isto é particularmente importante não só para os antibióticos utilizados simultaneamente para tratar infeções bacterianas nos seres humanos e nos animais, como também para aqueles que constituem a última linha de tratamento de infeções críticas em seres humanos (EMA, 2020; WHO, 2019).

Os antibióticos podem ser classificados de diversas formas, mas a mais frequente baseia-se nos mecanismos de ação (**Tabela 1.2.**). Cada classe de antibióticos possui um mecanismo

diferente, que pode inibir o crescimento bacteriano (bacteriostático) ou neutralizar e eliminar os microrganismos alvo (bactericida) (Ray *et al.*, 2017).

Tabela 1.2. Classificação de antibióticos de acordo com o mecanismo de ação (Adaptado de van Bambeke *et al.*, 2017).

Mecanismo de ação		Classe de antibióticos	Exemplos de antibióticos*	
Inibição da síntese da parede celular		β-lactâmicos	Penicilinas	Amoxicilina-Ácido clavulânico; Ampicilina
			Cefalosporinas	Cefoxitina (2ª Geração); Ceftazidima; Cefotaxima; Ceftriaxona (3ª Geração); Cefepima (4ª Geração)
			Carbapenemes	Meropenem
Inibição da síntese proteica	Atuação na subunidade ribossomal 30S	Aminoglicosídeos		Amicacina; Gentamicina
		Tetraciclinas		Tetraciclina
		Glicilciclinas		Tigeciclina
	Atuação na subunidade ribossomal 50S	Fenicóis		Cloranfenicol
		Macrólidos		Azitromicina
Inibição da síntese dos ácidos nucleicos		Fluoroquinolonas		Ciprofloxacina; Pefloxacina
		Quinolonas		Ácido nalidíxico
Bloqueio de processos metabólicos		Antagonistas da Via do Folato		Sulfametoxazol
				Trimetoprim
Modificação da membrana plasmática		Polimixinas		Colistina

*, apenas são referidos os antibióticos utilizados no presente trabalho.

Classe dos β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são antibióticos bactericidas cujo mecanismo de ação passa pela inibição da síntese da camada de peptidoglicano da parede celular bacteriana (Fisher & Mobashery, 2020).

O mecanismo mais comum para o desenvolvimento de resistência a estes antibióticos nas bactérias Gram-negativas é a produção de β -lactamases, nomeadamente as de espectro alargado (ESBL). As ESBL são enzimas codificadas por genes *bla*, que possuem capacidade de

hidrolisar a estrutura dos antibióticos β -lactâmicos. As ESBL não só hidrolisam eficazmente penicilinas, mas também as cefalosporinas de 3^a e 4^a geração (Poirel *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2020). Existem várias famílias de enzimas ESBL, sendo as famílias CTX-M e algumas variantes das famílias SHV e TEM as mais relevantes do ponto de vista epidemiológico (Castanheira *et al.*, 2021).

Classe dos Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antibióticos bactericidas que atuam por ligação à subunidade ribossômica 30S das bactérias, alterando a estrutura do complexo formado pelo aminoacil-RNA transportador (tRNA) e pelo RNA mensageiro (mRNA). Isto resulta numa leitura incorreta da mensagem codificada no mRNA e integração de proteínas diferentes das proteínas constitutivas da membrana celular bacteriana, alterando assim a sua permeabilidade (van Bambeke *et al.*, 2017; Ying *et al.*, 2019).

Um dos mecanismos mais comuns de resistência aos aminoglicosídeos é a inativação dos antibióticos por ação de enzimas bacterianas como as acetiltransferases, as adeniltransferases e as fosfotransferases (Ray *et al.*, 2017).

Classe das Tetraciclínas

As tetraciclínas, antibióticos bacteriostáticos, ligam-se à subunidade ribossomal 30S das bactérias, impedindo a ligação do complexo aminoacil-tRNA ao recetor ribossomal A, inibindo assim a síntese proteica (van Bambeke *et al.*, 2017). Os principais mecanismos de resistência às tetraciclínas são a eliminação destas substâncias para fora da célula através de bombas de efluxo, e através de mutações no *16S rRNA* (Roberts & Schwarz, 2016).

O transporte ativo dos antibióticos para fora da célula bacteriana, nomeadamente através de bombas de efluxo (codificadas pelos genes *tetA, B, C, D, M* entre outras variantes) representa o mecanismo de resistência mais comum a estes antibióticos nas bactérias Gram-negativas (Jahantigh *et al.*, 2020).

Classe dos Fenicóis

Os fenicóis são antibióticos bacteriostáticos que atuam por ligação à subunidade ribossomal 50S das bactérias, impedindo a ligação peptídica e a elongação da cadeia proteica (van Bambeke *et al.*, 2017).

A resistência ao cloranfenicol pode ser conferida pela ação de bombas de efluxo (codificadas pelos genes *cmlA, floR*), ou inativação enzimática pela ação de acetiltransferases (codificadas pelo gene *cat*) (Peterson & Kaur, 2018; Ray *et al.*, 2017; Yaqoob *et al.*, 2018).

Classe dos Macrólidos

O modo de ação dos macrólidos, antibióticos bacteriostáticos, passa por inibir a síntese proteica através da ligação com a subunidade ribossomal 50S das bactérias (Dinos, 2017; van Bambeke *et al.*, 2017).

Os mecanismos de resistência aos macrólidos incluem a ação de bombas de efluxo (codificadas pelos genes *mef* e *msr*) e a inativação dos antibióticos por ação de enzimas produzidas pelas células bacterianas como as fosfotranferases (codificadas pelos genes *mph*) (Dinos, 2017; Ray *et al.*, 2017).

Classe das (Fluoro)Quinolonas

As quinolonas são antibióticos bactericidas que exercem a sua ação bloqueando duas enzimas muito importantes na replicação e transcrição do DNA bacteriano, a DNA girase e a DNA topoisomerase IV (Ray *et al.*, 2017). A DNA girase é constituída por duas subunidades A e B, codificadas, respetivamente, pelos genes *gyrA* e *gyrB*, e a topoisomerase IV possui as subunidades A e B, codificadas pelos genes *parC* e *parE* (van Bambeke *et al.*, 2017).

Na década de 80, com a introdução de um átomo de flúor, surgiram as fluoroquinolonas, com melhor atividade farmacocinética (Aldred *et al.*, 2014).

Os mecanismos de resistência às fluoro(quinolonas) incluem mutações cromossômicas na região codificante das enzimas DNA girase e DNA topoisomerase IV (nos genes *gyrA*, *gyrB* e *parC*, *parE* respetivamente) das células bacterianas, bem como a inibição da ligação das enzimas ao antibiótico ao alvo por modificação enzimática (gene *aac(6')-Ib-cr*), e/ou proteção do alvo por proteínas Qnr (genes *qnr*), mediadas por genes localizados em plasmídeos (Aldred *et al.*, 2014).

Classe dos Antagonistas da Via do Folato

O sulfametoxazol e o trimetoprim são antibióticos bacteriostáticos que pertencem à classe dos antagonistas da via do folato, uma vez que atuam em cadeia, inibindo a síntese do ácido fólico, que é um fator essencial à síntese do DNA bacteriano. O sulfametoxazol inibe a enzima dihidropteroato sintetase, que catalisa a síntese de ácido dihidrofolato parabenzoico, e o trimetoprim atua na etapa seguinte, ao inibir a enzima dihidrofolato redutase, que catalisa a síntese de tetraidrofolato a partir de dihidrofolato (van Bambeke *et al.*, 2017).

A resistência ao sulfametoxazol ocorre por modificações na enzima dihidropteroato sintetase, codificada pelos genes *sul*(1, 2, 3). A resistência ao trimetoprim ocorre por mutações na enzima dihidrofolato redutase, codificada pelos genes *dfr* (Blahna *et al.*, 2006; Brolund *et al.*, 2010; Ray *et al.*, 2017).

Classe das Polimixinas

As polimixinas são antibióticos bactericidas que apresentam um espectro antibacteriano estreito, atuando principalmente contra bactérias Gram-negativas. O seu alvo é a membrana celular externa, onde se ligam ao lípido A, perturbando a permeabilidade e integridade da membrana bacteriana, e levando à morte celular (Sun *et al.*, 2018; van Bambeke *et al.*, 2017).

Devido à toxicidade celular e ao potencial aumento da resistência, esta classe de antibióticos é utilizada apenas como último recurso para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias multirresistentes (MDR) (resistentes a três ou mais classes de antibióticos) (Magiorakos *et al.*, 2011; WHO, 2019).

Até 2015, os mecanismos de resistência da colistina (polimixina do grupo E) relacionavam-se com a ocorrência de mutações cromossômicas, ou seja, apenas se observava uma transmissão vertical, incapaz de se disseminar para outras bactérias (Costa & Silva, 2018). Contudo, nesse ano, na China foi reportado o primeiro caso de resistência à colistina mediada por plasmídeos, tendo sido identificado o gene *mcr* em *E. coli* isoladas de animais, de alimentos e de casos clínicos humanos (Liu *et al.*, 2016). Atualmente, foram identificados os genes *mcr*-1 a *mcr*-10 em diversas espécies bacterianas isoladas de animais e humanos (Zhang *et al.*, 2021).

1.5.1 Utilização de antibióticos na criação de animais

Os antibióticos têm sido utilizados ao longo dos anos na saúde animal, quer para o tratamento de doença quer para a promoção do seu crescimento (Rajaei *et al.*, 2021). Não obstante, na UE, desde 2006, apenas é permitido o uso de antibióticos em animais de produção para o tratamento de infecções bacterianas (Regulamento (UE) n.º 2019/6, 2019).

Os dados relativos à comercialização de antibióticos a nível veterinário em 31 países da Comunidade Europeia (CE) em 2021, indicam que as penicilinas constituem os antibióticos mais vendidos, representando 31,2% do total de vendas, seguidos pelas tetraciclina (25,8%), sulfonamidas (9,9%) e macrólidos (8,5%) (EMA, 2022).

Em Portugal, em 2021, foram comercializadas aproximadamente 159.4 toneladas de antimicrobianos destinados à utilização em animais de produção. À semelhança dos restantes países da CE, as classes de antibióticos com maior volume de vendas foram as tetraciclina (34,1%), as penicilinas (31,2%) e as sulfonamidas (9,9%), totalizando 66,9% das vendas de produtos veterinários medicamentosos (EMA, 2022).

Considerando o período entre 2011 e 2021, o volume de vendas de medicamentos veterinários na UE diminuiu 47%. As vendas diminuíram de forma especialmente acentuada nas classes das cefalosporinas, polimixinas e fluoro(quinolonas), consideradas de importância crítica para a saúde humana e animal (EMA, 2020; WHO, 2019).

Na última década, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) tem vindo a desenvolver um trabalho relevante na área da resistência aos antibióticos, através da implementação de normas internacionais aplicáveis aos diversos antibióticos, sendo o seu uso prudente e responsável o principal objetivo (OIE, 2021).

O Grupo de Peritos *Ad Hoc* sobre a Resistência aos Agentes Antimicrobianos (AMEG) estabeleceu quatro categorias de antibióticos de uso veterinário (A, evitar; B, restringir; C, precaução; D, Prudência), com base nas potenciais consequências para a saúde pública (aumento da resistência antimicrobiana) quando utilizados em animais. Esta categorização constitui uma ferramenta de apoio à tomada de decisões por parte dos veterinários, em relação aos antibióticos a utilizar (EMA, 2020).

1.5.2 Disseminação da resistência antimicrobiana ao longo da cadeia alimentar

À semelhança das bactérias suscetíveis, as bactérias resistentes a antimicrobianos circulam e disseminam-se na população humana e animal através do contacto interindividual, dos alimentos, da água e do ambiente (**Figura 1.3.**) (Direção-Geral da Saúde, 2019; Healthmatch, 2022; Samtiya *et al.*, 2022).

Na produção animal, entre 75-90% dos antibióticos administrados aos animais são excretados pelas fezes e pela urina para o meio ambiente, sendo que grande parte destes antibióticos permanecem ativos mesmo após a sua excreção (Wall *et al.*, 2016). Deste modo, as bactérias presentes no ambiente, expostas a concentrações residuais destes antibióticos, podem adquirir resistência por um processo de pressão seletiva e disseminação, por transferência vertical e horizontal de genes de resistência (CDC, 2022c; Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

O meio ambiente constitui um fator chave para a resistência antimicrobiana. Os animais e os seres humanos podem ficar expostos a bactérias resistentes provenientes do meio ambiente, através do consumo de alimentos e de água contaminados (Healthmatch, 2022).

Diversos estudos têm demonstrado a presença de bactérias resistentes aos antibióticos em produtos alimentares derivados de animais de produção, nomeadamente em carne (Adzitey *et al.*, 2021; Pławinska-Czarnak *et al.*, 2022; Qamar *et al.*, 2023; Rega *et al.*, 2022). A contaminação destes produtos pode ocorrer na fase de produção, durante o abate e evisceração dos animais (por contaminação fecal), e durante a sua manipulação, se não forem seguidas as práticas de higiene adequadas (contaminação cruzada) (Abebe *et al.*, 2020; Adzitey *et al.*, 2021; Sagar *et al.*, 2023; Verraes *et al.*, 2013).

A exposição ocupacional constitui outro risco de contaminação humana por bactérias resistentes, nomeadamente para os agricultores, os médicos veterinários, os trabalhadores das explorações e dos matadouros, e os manipuladores de produtos alimentares de origem animal

(Amaro *et al.*, 2020). A consequente disseminação de genes de resistência, não só na comunidade como também em ambientes hospitalares, torna a resistência a antimicrobianos uma interação complexa entre os seres humanos, os animais de produção e o meio ambiente (Figura 1.3.) (Amaro *et al.*, 2020; Healthmatch, 2022).

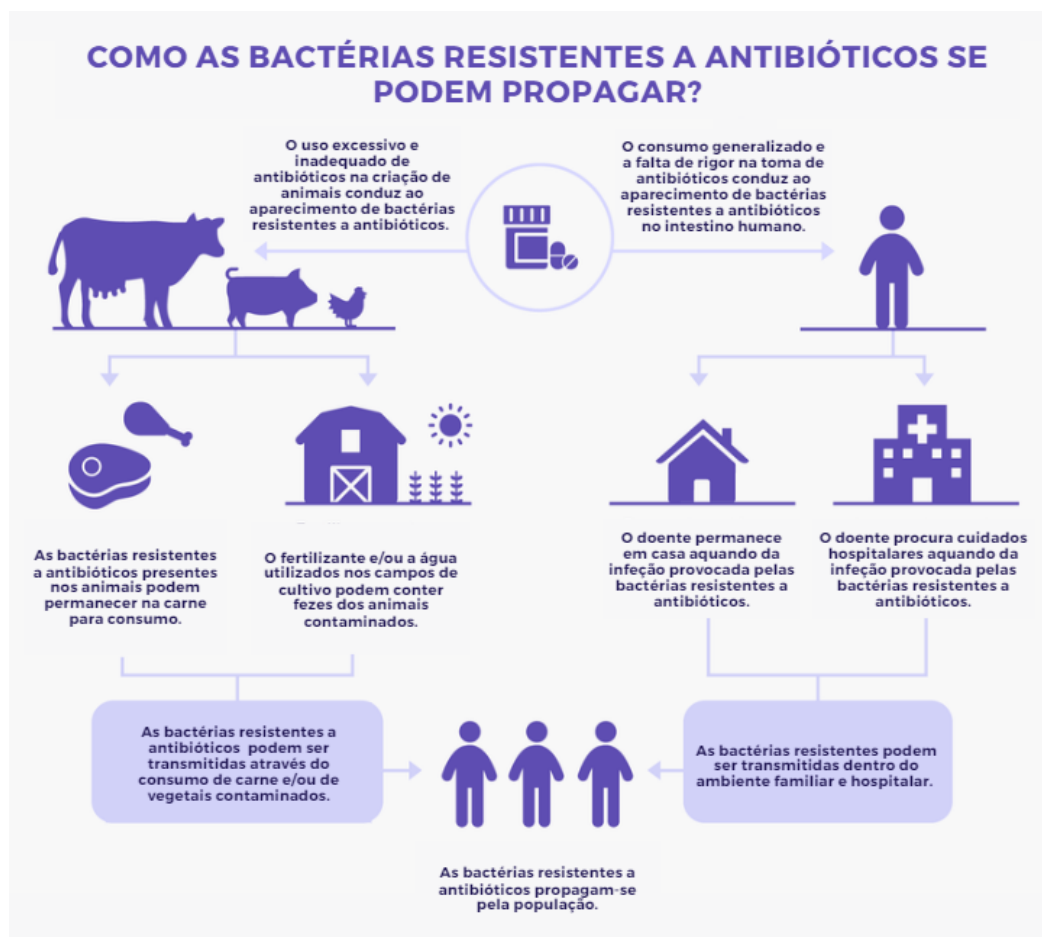


Figura 1.3. Vias de disseminação de resistência aos antibióticos entre os potenciais reservatórios: o homem, os animais e o ambiente (Adaptado de Healthmatch, 2022).

1.5.3 Resistência de *E. coli* e *Salmonella* spp. a antibióticos

As bactérias *E. coli* e *Salmonella* spp. têm sido alvo de variados estudos clínicos e veterinários, no que se refere ao surgimento de resistências a antibióticos (Gambino *et al.*, 2022; Jajere, 2019; Poirel *et al.*, 2018). No caso de *E. coli*, estes estudos têm sido desenvolvidos tanto em estirpes patogênicas como em estirpes comensais (Adzitey *et al.*, 2021; Sora *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2020).

Segundo o último relatório anual de vigilância da resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas, em 2021 a resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. e *E. coli* isoladas de animais de produção (suínos, bovinos, frangos, perus) foi semelhante à resistência reportada

nos produtos cárneos derivados destes animais e no Homem. Nestes isolados, a resistência à ampicilina, sulfonamidas e tetraciclinas variou de moderada (>10,0%-20,0%) a muito alta (>50,0%-70,0%). Foi também reportada uma baixa resistência às cefalosporinas de terceira geração (>1%-10,0%). No caso de *Salmonella* spp., a prevalência de produtoras de ESBL foi baixa (0,1%-1,0%) na maioria dos isolados humanos e animais. Nos isolados de *E. coli*, a prevalência de produtoras de ESBL foi mais variável, tendo sido identificadas *E. coli* produtoras de ESBL em suínos (0,7%), bovinos (0,4%), frangos (1,0%), perus (1,3%) e em carne de bovino (0,9%), em diversos países europeus (EFSA&ECDC, 2023).

Durante as últimas décadas, o isolamento de *E. coli* produtoras de ESBL de fontes humanas, animais e alimentares tem sido cada vez mais recorrente, inclusivamente em Portugal (Clemente *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2022a; Giufrè *et al.*, 2021; Leão *et al.*, 2021; Ramos *et al.*, 2020). A resistência de *E. coli* a diversos antibióticos de último recurso, como as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, associada à presença de ESBL também já foi descrita (Costa *et al.*, 2022a).

Nos últimos anos, tem sido observado um aumento no número de estirpes de *Salmonella* spp. multirresistentes em carnes de bovino, suíno e aves (Costa *et al.*, 2022a; Pławinska-Czarnak *et al.*, 2022). Em Portugal, vários estudos têm evidenciado a presença de estirpes de *Salmonella* spp. multirresistentes, nomeadamente à ampicilina, à tetraciclina e ao sulfametoxazol, isoladas de suínos e de produtos de carne de porco (Costa *et al.*, 2022a; Gomes-Neves *et al.*, 2014).

1.6 Métodos de Isolamento e Identificação de *E. coli* e *Salmonella* spp.

O método clássico para a deteção de *E. coli* e *Salmonella* spp. baseia-se no isolamento em cultura e posterior identificação das colónias sugestivas (Lupindu, 2017; Uzairue & Shittu, 2023).

A capacidade que a bactéria *E. coli* evidencia para fermentar a lactose permite a utilização de meios de cultura como o Agar Coliforme Cromogénico (CCA) e o Agar Hektoen (HK), que diferenciam *E. coli* de outros coliformes não fermentadores deste açúcar. Já no caso de *Salmonella* spp., a incapacidade de fermentar a lactose e a produção de H₂S, pela maioria dos isolados, permite a diferenciação desta bactéria em meio HK e Agar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD).

O meio de cultura CCA contém dois substratos cromogénicos: o X-glucoronide, utilizado para detetar a atividade da enzima β -D-glucuronidase, e o Salmon-GAL, utilizado para detetar a atividade da enzima β -D-galactosidase. A seletividade deste meio é alcançada pela presença de Tergitol® 7, composto que inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas (E&O

Laboratories, 2018; González *et al.*, 2003). A enzima β -D-galactosidase, expressa por todos os coliformes, atua sob o substrato Salmon-GAL e produz colônias vermelhas/cor-de-rosa. Por outro lado, a enzima β -D-glucuronidase, atua sob o substrato X-glucoronide e produz colônias azuis. Uma vez que, e ao contrário dos outros coliformes, *E. coli* é simultaneamente β -D-glucuronidase e β -D-galactosidase positiva, atua em ambos os substratos cromogénicos X-glucoronide e Salmon-GAL, sendo identificada no meio CCA pela presença de colônias azul-escuras a violetas (E&O Laboratories, 2018; González *et al.*, 2003).

No que respeita ao meio de cultura HK, a seletividade deste meio é conferida pela presença de sais biliares, azul de bromotimol e fucsina ácida, que inibem a maioria dos microrganismos Gram-positivos. A diferenciação das Enterobactérias baseia-se na capacidade que exibem de fermentação dos açúcares, lactose, sacarose e salicina. O indicador azul de bromotimol torna-se amarelo na presença de ácidos, e o indicador fucsina torna-se vermelho na presença de aldeídos (Corry *et al.*, 2003a; Hudzicki, 2010). A fermentação de pelo menos um dos açúcares resulta numa coloração alaranjada ou rosa salmão das colônias de *E. coli*. No caso de *Salmonella* spp., como esta bactéria não é capaz de utilizar nenhum destes três hidratos de carbono, as colônias apresentam-se com uma coloração azul-esverdeada a azul. Para *Salmonella* spp., é possível uma diferenciação adicional com base na produção de H₂S, devido à presença de tiosulfato de sódio e citrato de ferro. Um ensaio positivo traduz-se na formação de colônias pretas ou com o centro preto (Corry *et al.*, 2003a; Hudzicki, 2010).

O meio de cultura XLD constitui outro meio de cultura seletivo utilizado no isolamento de *Salmonella* spp. Neste meio, o desoxicolato de sódio, um sal biliar, é utilizado para inibir o crescimento de organismos Gram-positivos, podendo a bactéria *Salmonella* spp. ser diferenciada através de três reações: fermentação da xilose, descarboxilação da lisina e produção de H₂S. Em meio XLD, a bactéria *Salmonella* spp. surge com colônias cor-de-rosa com centros pretos, em resultado da produção de H₂S (Corry *et al.*, 2003b; Parija, 2012).

A confirmação de *E. coli* e *Salmonella* spp. pode ser realizada por diversos métodos, nomeadamente por métodos bioquímicos e espectroscópicos. A escolha do método depende de muitos fatores, incluindo a disponibilidade de recursos (Lupindu, 2017). Os métodos bioquímicos baseiam-se nas propriedades bioquímicas de *E. coli* e *Salmonella* spp. perante substratos específicos, e podem ser realizados com o auxílio de sistemas automatizados como o VITEK[®] 2 (bioMérieux, 2022c; Lupindu, 2017). A técnica de *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry*, com base na espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) pode ser utilizada através de sistemas automatizados, como o VITEK[®] MS (bioMérieux, 2022d). A confirmação de *E. coli* pode também ser realizada por métodos moleculares, como a reação de polimerase em cadeia (PCR) para amplificação do gene *16S rRNA* específico (Sabat *et al.*, 2000), enquanto a confirmação de *Salmonella* spp. pode ser efetuada por serotipagem.

1.7 Caracterização de Isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp.

1.7.1 Reação de polimerase em cadeia

Desenvolvida por Kary Mullis na década de 1990, a reação de polimerase em cadeia é uma técnica de biologia molecular que revolucionou a área da genética e da biologia molecular em geral (Coleman & Tsongalis, 2006; Mullis, 1990; Parija, 2012).

Esta técnica permite a amplificação específica de uma sequência de DNA alvo em milhões de cópias, a partir de uma pequena quantidade inicial de DNA e de dois oligonucleótidos iniciadores (*Forward* e *Reverse*), também designados por *primers*. Os *primers* são sequências de cerca de 20 nucleótidos, complementares às extremidades, internas ou externas, das regiões de DNA que se pretendem amplificar (Douglas, 2021).

A PCR envolve três etapas: desnaturação, hibridação/ *annealing* e extensão. A desnaturação promove a separação ou desnaturação das cadeias de DNA a uma temperatura de 95°C, criando um molde de cadeia simples para a próxima etapa. A hibridação/ *annealing* consiste na ligação dos *primers* às sequências complementares do DNA molde de cadeia simples (Coleman & Tsongalis, 2006; Hames & Hooper, 2005; Parija, 2012). A temperatura de hibridação/ *annealing* deverá ser 3 a 5°C abaixo da temperatura de *melting* (T_m), que é a temperatura em que metade das cadeias do DNA se encontram desnaturadas e a outra metade em cadeia dupla, e está também relacionada com o conteúdo guanina e citosina (GC) dos *primers*. A extensão é a etapa onde ocorre a amplificação do número de cópias da sequência desejada, através da atividade catalítica da enzima DNA polimerase e da temperatura ótima de polimerização (normalmente 72°C). Estes três passos repetem-se entre 25 a 40 vezes (Douglas, 2021).

Para além do DNA alvo e da enzima DNA polimerase (*Taq polimerase*), a mistura de reação deve conter desoxirribonucleótidos fosfatados (dNTPs), ou seja nucleótidos formados por uma base azotada (adenina, citosina, guanina e timina), um açúcar (desoxirribose), e três grupos fosfato; tampão de reação adequado à ação catalítica da DNA polimerase; e cloreto de magnésio, que serve de cofator da enzima DNA polimerase e permite que esta se ligue aos *primers* (Coleman & Tsongalis, 2006; Hames & Hooper, 2005; Parija, 2012).

No caso de *E. coli*, existem várias PCR que permitem, por exemplo, identificar fatores de patogenicidade e toxinas, sendo utilizadas para caracterizar estirpes de *E. coli* patogénicas, através da deteção de diversos genes de virulência (Lupindu, 2017).

A pesquisa de fatores de virulência e de toxinas de *E. coli* pode ser efetuada por técnicas de PCR convencionais, como a PCR *multiplex* (Perry *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1997). A PCR *multiplex* difere da PCR simples pelo facto de utilizar mais do que um par de *primers* diferentes, que apresentam perfis térmicos de amplificação iguais, o que permite a amplificação si-

multânea de mais do que uma sequência alvo (Parija, 2012; Wang *et al.*, 1997). Importa salientar que um protocolo de PCR *multiplex* requer que cada *primer* seja altamente específico para o gene alvo, não emparelhe consigo próprio nem com outras regiões homólogas, e que não forme dímeros com os outros *primers* presentes na reação (Saiki, 1989; Perry *et al.*, 2007).

Após a PCR, os produtos amplificados podem ser visualizados em eletroforese em gel de agarose (Aryal, 2022b). A eletroforese é uma técnica utilizada para separar fragmentos de DNA, de acordo com seu tamanho molecular, e envolve a passagem de uma corrente elétrica através de um gel de agarose. A velocidade de migração dos fragmentos amplificados varia em função do seu tamanho, o que permite que sejam separados uns dos outros (fragmentos de menor tamanho migram mais ao longo do gel). A nível molecular, o gel de agarose é uma matriz de moléculas ligadas por pontes de hidrogénio e que formam micro poros, por onde migram os fragmentos de DNA. O gel pode ser preparado em diferentes concentrações de agarose, de acordo com os tamanhos moleculares dos fragmentos a separar. Na visualização dos fragmentos amplificados é utilizado um corante (como por exemplo o *GelRed*) que se intercala nas moléculas de DNA, e que emite fluorescência quando exposto à luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos amplificados é determinado utilizando um marcador de pesos moleculares (Aryal, 2022b; Coleman & Tsongalis, 2006; Parija, 2012).

1.7.2 Serotipagem

Os sistemas de monitorização e vigilância de salmonelose na UE dependem fortemente de uma caracterização fidedigna e padronizada de *Salmonella* spp., a qual inclui a identificação do serotipo (Robertson *et al.*, 2018).

O método padrão baseia-se na serotipagem, utilizando o esquema *White Kauffman-Le Minor* (Grimont & Weill, 2007; Ibrahim & Morin, 2018; Robertson *et al.*, 2018). Este esquema de serotipagem foi desenvolvido em 1926, e tem sido utilizado desde então. O Centro Colaborativo de Referência e Pesquisa de *Salmonella* spp. da OMS (Instituto Pasteur em Paris, França) é o responsável pela atualização de novas fórmulas antigénicas que vão sendo identificadas (Talib *et al.*, 2022).

Segundo este método, os isolados de *Salmonella* spp. são agrupados em serotipos com base na reação de aglutinação dos antissoros aos antigénios somáticos (O) e aos antigénios flagelares (H) de primeira e segunda fase (Grimont & Weill, 2007).

Existem mais de 2600 serotipos diferentes de *Salmonella* spp. identificados (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014). Os serotipos representam grupos distintos dentro de uma única espécie de microrganismos, nomeadamente bactérias, que apresentam antigénios comuns (Dieckmann & Malorny, 2011).

Os antígenos somáticos, de natureza lipopolissacarídea encontram-se presentes na camada externa da parede celular da bactéria e diferem na sua constituição química. Por outro lado, os antígenos flagelares são proteínas que fazem parte dos flagelos bacterianos, estruturas semelhantes a filamentos responsáveis pela motilidade da bactéria (CDC, 2022a; Ibrahim & Morin, 2018). As bactérias *Salmonella* spp. podem ser difásicas ou monofásicas, em relação aos antígenos H. Isso significa que algumas estirpes podem expressar duas proteínas diferentes de filamentos flagelares (FljB e FliC), num processo controlado pela recombinase Hin e conhecido como viragem de fase, enquanto outras expressam apenas uma fase flagelar (Bonifield & Hughes, 2003).

Uma vez identificados os antígenos somáticos e flagelares, a classificação final do serotipo é representada pela fórmula antígenica: O:H1:H2. Nesta fórmula, 'O' corresponde ao antígeno somático e 'H' representa os antígenos flagelares expressos na primeira e segunda fase, respetivamente. É possível que um serotipo expresse mais de uma combinação de antígenos. Alguns antígenos somáticos ou flagelares podem estar presentes ou ausentes, não estando o mesmo relacionado com o processo de viragem de fase. Nestes casos, os antígenos são representados entre parenteses retos ([]). Se o serotipo for monofásico, o último antígeno é representado por um hífen (-). A título de exemplo, a fórmula antígenica da variante monofásica de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium é 1,4,[5],12:i:- (*S. Typhimurium* monofásica) (Grimont & Weill, 2007).

1.7.3 Testes de suscetibilidade a antibióticos

O teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA) constitui outra metodologia importante na caracterização dos isolados bacterianos. O método *Kirby-Bauer* ou de difusão em disco, é um dos métodos recomendados pelo Comité Europeu de Avaliação da Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST) e permite testar vários agentes antimicrobianos de uma só vez, obtendo rapidamente o perfil de resistência fenotípico de um determinado isolado bacteriano (EUCAST, 2023; Matuschek *et al.*, 2014).

O TSA avalia os padrões de resposta das bactérias a concentrações pré-determinadas de antibióticos. De acordo com os valores obtidos, as bactérias podem ser agrupadas em 3 categorias: resistente (R), suscetível por uma exposição aumentada (I) e suscetível por uma dose *standart* (S) ao antibiótico em estudo (EUCAST, 2023).

Para *Salmonella* spp. e *E. coli* é utilizado o meio de cultura Mueller-Hinton (MH) agar, de acordo com a recomendação do EUCAST. Este meio é caracterizado pela ausência de substâncias que possam interferir com a atividade dos antibióticos.

O método de difusão em disco consiste na colocação de discos impregnados com concentrações conhecidas de antibióticos que difundem no meio inoculado e, dependendo da suscetibilidade, conseguem ou não inibir o crescimento bacteriano (EUCAST, 2023; Matuschek *et al.*, 2014). A inibição é identificada pela formação de halos à volta dos antibióticos, após incubação à temperatura apropriada, e o diâmetro da zona de inibição é medido e comparado com os valores de referência indicados pelo EUCAST (EUCAST, 2023).

1.7.4 Sequenciação completa do genoma

A sequenciação do genoma permite identificar, na ordem precisa, os nucleótidos que constituem um fragmento específico de DNA (Ibrahim & Morin, 2018; Lupindu, 2017).

Em 1977, Frederick Sanger desenvolveu um método pioneiro de sequenciação de DNA que envolve a integração de dideoxinucleótidos (ddNTPs), por uma DNA polimerase, durante a replicação do DNA (Sanger *et al.*, 1977). Este método ficou conhecido como sequenciação de Sanger e foi amplamente utilizado durante décadas (van Dijk *et al.*, 2014). Mais tarde, o desenvolvimento da sequenciação do genoma por *Next Generation Sequencing* (NGS) trouxe uma solução mais completa, mais rápida, mais económica e com uma maior capacidade de processamento (van Dijk *et al.*, 2014).

Atualmente, a sequenciação do genoma por NGS constitui um método superior na caracterização de material genético (Ibrahim & Morin, 2018; Lupindu, 2017). Através da sequenciação completa do genoma (WGS) por NGS, é possível analisar o genoma completo de uma bactéria, nomeadamente de *E. coli* e *Salmonella* spp., num curto espaço de tempo (Ibrahim & Morin, 2018; Lupindu, 2017). Para além da caracterização do material genético, a sequenciação do DNA permite a comparação da composição genética de isolados de diferentes origens, sendo útil na avaliação de diferentes surtos, nomeadamente, de origem alimentar (Ibrahim & Morin, 2018; Lupindu, 2017; WHO, 2018b).

A empresa *Illumina* Inc. desenvolveu uma das plataformas tecnológicas de sequenciação genómica mais populares, sendo a tecnologia atualmente disponível no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Este método é baseado na sequenciação por síntese e requer diferentes etapas: fragmentação do DNA, adição de adaptadores, amplificação, sequenciação e análise preliminar (Meyer & Kircher, 2010).

A informação obtida após sequenciação (*reads*) é posteriormente avaliada (em termos de qualidade) e analisada, com recurso a ferramentas de bioinformática disponíveis *online* e de livre acesso. De entre estas plataformas, destaca-se a *Enterobase* (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) e o *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) (<https://www.genomicepidemiology.org/>).

A plataforma *Enterobase* foi desenvolvida pelo Departamento de Genética da Universidade de Warwick, no Reino Unido, com o objetivo de fornecer recursos e ferramentas para o desenvolvimento de análises filogenéticas e epidemiológicas de diversas bactérias, nomeadamente as pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Esta plataforma disponibiliza igualmente uma ferramenta na sua *pipeline*, a *QAssembly* que, para além de avaliar a qualidade dos *reads* da sequenciação de acordo com os critérios de qualidade definidos, permite a criação dos respetivos *assemblies*. A submissão dos *reads* a esta plataforma, quando acompanhada dos respetivos metadados, permite ainda a realização de análises filogenéticas, com inclusão de isolados nacionais e/ou internacionais (EnteroBase, 2023).

A plataforma CGE é uma plataforma *online*, desenvolvida pela Universidade Técnica da Dinamarca (*Technical University of Denmark*), que fornece ferramentas e recursos para a realização de análises genómicas e epidemiológicas de bactérias, entre as quais *E. coli* e *Salmonella* spp. A identificação e caracterização genómica é realizada por comparação da homologia existente entre os *reads* ou os *assemblies* em estudo e as bases de dados atualizados e curados disponibilizadas na plataforma, que contém milhares de sequências e genes (Anjum, 2015; Chan, 2016).

OBJETIVOS

Este trabalho teve como principal objetivo isolar e caracterizar fenotípica e genotipicamente estirpes de *E. coli* e *Salmonella* spp. isoladas de fezes de suínos e de carnes cruas para consumo, em Portugal. Tendo isso em consideração, pretendeu-se:

- 1) isolar *E. coli* e *Salmonella* spp. de fezes de suínos produzidos para consumo humano, colhidas em diferentes matadouros e de animais provenientes de diferentes explorações;
- 2) isolar *E. coli* e *Salmonella* spp. de amostras de carne de porco crua para consumo, adquiridas em diversas superfícies comerciais;
- 3) avaliar a qualidade microbiológica das amostras de carne crua para consumo;
- 4) identificar isolados patogénicos de *E. coli*;
- 5) identificar os serotipos de *Salmonella* spp.;
- 6) avaliar o perfil de resistência a antibióticos e a presença de genes de resistência à colistina nos isolados de *E. coli* e de *Salmonella* spp.;
- 7) sequenciar e caracterizar o genoma completo de isolados de interesse, nomeadamente de isolados patogénicos intestinais, com genes de resistência à colistina e/ou multirresistentes a antibióticos;
- 8) comparar e avaliar as estirpes de *E. coli* e de *Salmonella* spp. isoladas de fezes de suínos com as estirpes isoladas de carnes cruas para consumo;
- 9) analisar filogeneticamente as estirpes sujeitas a WGS.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

3.1.1 Origem e descrição dos produtos biológicos

No presente estudo foram analisados 152 produtos biológicos de origem suína, correspondentes a matrizes de origem alimentar e animal.

Foram analisadas 52 amostras de carne de porco crua, de origem portuguesa, adquiridas em diversas superfícies comerciais entre os meses de janeiro e abril de 2023. As amostras foram adquiridas refrigeradas, mas não congeladas, e foram transportadas até ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição (URMI-L) do INSA no prazo máximo de 12 horas (h), respeitando sempre as condições de refrigeração apropriadas (transporte em mala isotérmica). No laboratório, as amostras foram conservadas em frigorífico de temperatura controlada e processadas num prazo máximo de 24 h após a aquisição. Em todas as etapas, foram respeitados os prazos de validade dos produtos adquiridos.

Foram igualmente analisadas 100 amostras de fezes de suínos produzidos para consumo humano, provenientes de diferentes explorações portuguesas. As colheitas foram efetuadas em diversos matadouros entre os meses de novembro de 2022 e março de 2023. Os produtos biológicos foram recolhidos durante a fase de evisceração, por um veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Lisboa, e foram transportados de forma refrigerada até ao Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA, sendo processados de imediato ou, em alternativa, conservados a -20°C.

A distribuição geográfica, por regiões, dos produtores das amostras de carne crua de suíno e das explorações dos suínos enviados para o matadouro encontra-se representada na **Figura 3.1.** e nas **Tabelas 3.1. e 3.2.**

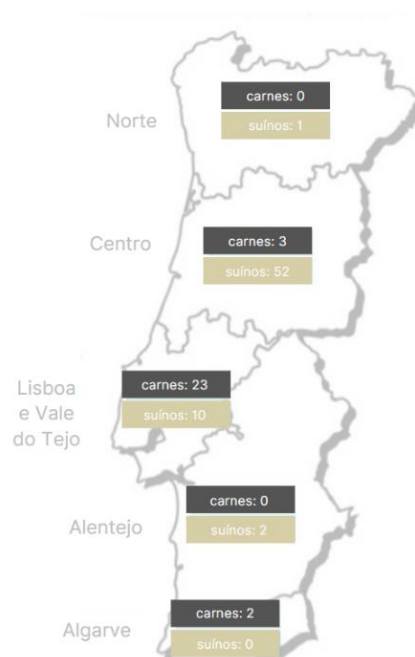


Figura 3.1. Distribuição geográfica, por regiões, dos produtores das amostras de carne crua de suíno e das explorações de origem dos suínos enviados para o matadouro.

Tabela 3.1. Produtores das amostras de carne crua de suíno, agrupados por região.

Região	CT		LVT						ALG	D
Produtor*	CT-2-CC	CT-3-CC	LVT-4-CC	LVT-5-CC	LVT-6-CC	LVT-7-CC	LVT-8-CC	LVT-9-CC	ALG-1-CC	Desconhecido
Nº de amostras de carnes	1	2	2	1	1	14	3	2	2	24

*, os produtores das amostras de carne crua de suíno são representados por uma fórmula cuja primeira letra corresponde à região, seguida da identificação do produtor (número), e pela sigla CC, Carnes Cruas. Por exemplo CT-2-CC, refere-se ao produtor 2 de carnes crua de suíno (CC), da região do Centro de Portugal (CT). CT, Centro; LVT, Lisboa e Vale do Tejo; ALG, Algarve; D, Desconhecida.

Tabela 3.2. Explorações de origem dos suínos enviados para o matadouro agrupadas por região.

Região	N	CT												
Explorações*	N-Q-SM	CT-A-SM	CT-B-SM	CT-C-SM	CT-D-SM	CT-E-SM	CT-F-SM	CT-G-SM	CT-H-SM	CT-I-SM	CT-J-SM	CT-K-SM	CT-L-SM	CT-Y-SM
Nº de amostras fezes de suínos	1	5	3	4	1	7	3	2	4	5	5	4	4	1

*As explorações de origem dos suínos enviados para o matadouro são representadas por uma fórmula cuja primeira letra corresponde à região, seguida da identificação da exploração (letra), e da sigla SM, Suínos Matadouro. Por exemplo N-Q-SM, refere-se à exploração Q de suínos enviados para o matadouro (SM), da região do Norte de Portugal (N). N, Norte; CT, Centro

Tabela 3.2. Explorações de origem dos suínos enviados para o matadouro agrupadas por região (continuação).

Região	LVT		ALT	D								
Explorações*	LVT-M-SM	LVT-N-SM	ALT-X-SM	D-O-SM	D-P-SM	D-R-SM	D-S-SM	D-T-SM	D-U-SM	D-V-SM	D-Z-SM	Desconhecida
Nº de amostras de fezes de suínos	5	5	3	5	5	5	1	3	5	5	5	4

*As explorações de origem dos suínos enviados para o matadouro são representadas por uma fórmula cuja primeira letra corresponde à região, seguida da identificação da exploração (letra), e da sigla SM, Suínos Matadouro. Por exemplo LVT-M-SM, refere-se à exploração M de suínos enviados para o matadouro (SM), da região do Lisboa e Vale do Tejo de Portugal (LVT).

LVT, Lisboa e Vale do Tejo; ALT, Alentejo; D, Desconhecida.

3.2 Isolamento e Identificação de *E. coli* e *Salmonella* spp. de Carne de Origem Suína

Na **Figura 3.2.** encontram-se representadas, sob uma forma esquemática e resumida, as diversas etapas realizadas para a análise microbiológica de amostras de carne crua, nomeadamente para o isolamento, contagem e identificação de *E. coli* e para o isolamento e identificação de *Salmonella* spp.

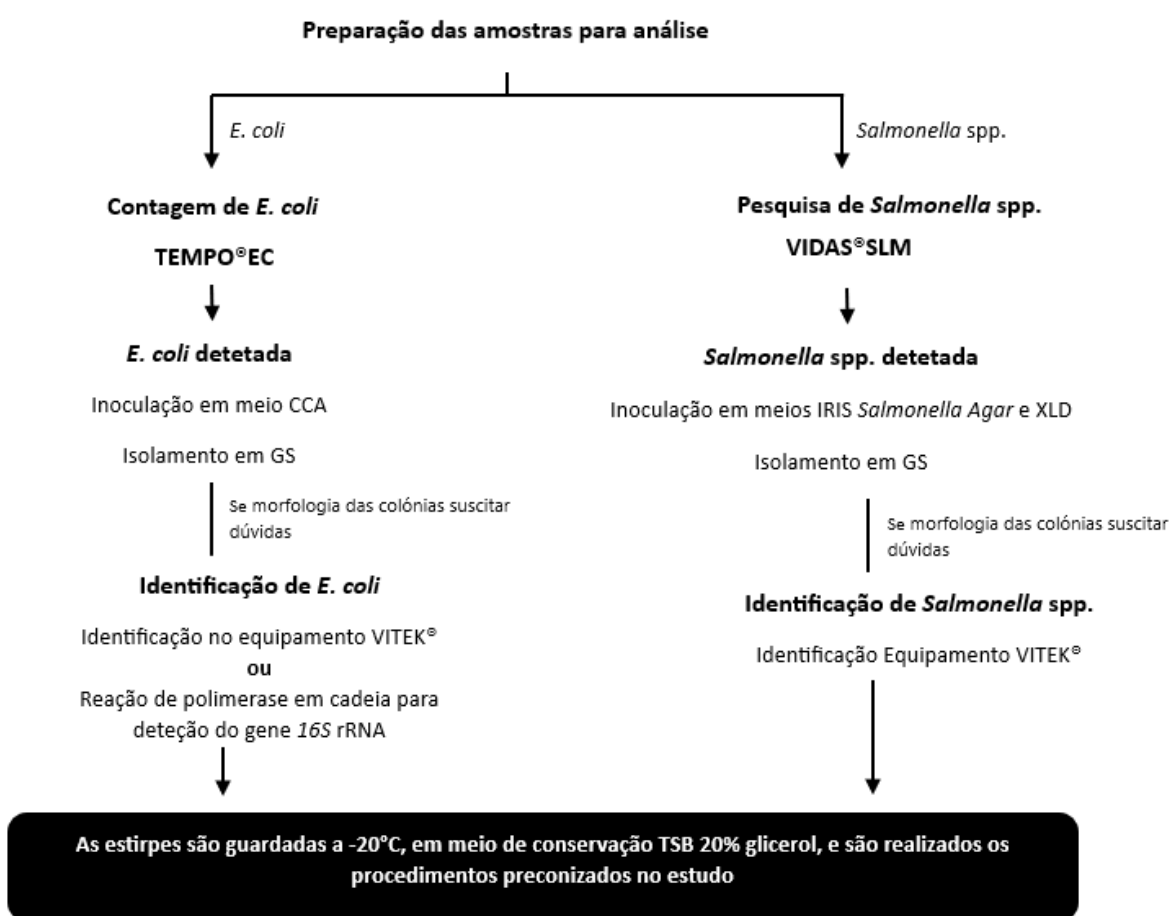


Figura 3.2. Metodologias utilizadas no isolamento e identificação de *E. coli* e *Salmonella* spp. de amostras de carne crua.

CCA, Agar Coliforme Cromogénico; GS, Gelose Simples; XLD, Agar Xilose Lisina Desoxicolato; TSB, Caldo de Triptona Soja.

3.2.1 Análises microbiológicas

Todas as análises microbiológicas foram realizadas na URMI-L, segundo a norma ISO 7218:2007.

3.2.1.1 Preparação das amostras

A preparação das amostras de carne, é uma etapa fundamental para a adequação das mesmas para a detecção, a identificação e a quantificação de *E. coli* e *Salmonella* spp. presentes por unidade de massa (gramas (g)) ou de volume (mililitro (mL)).

Nas amostras de carne embaladas, procedeu-se à desinfecção do exterior das embalagens. Em ambiente de assepsia, foram colhidas 10 g de uma parte representativa de cada amostra para um saco esterilizado e previamente identificado com o número da amostra e a data da realização da análise. Foi adicionado o diluente, a água peptonada tamponada, na proporção de 1:10 (10 g:100 mL), utilizando o diluidor automático com balança, *Dilumat Start* (bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, França). Por fim, o saco foi devidamente homogeneizado, durante 60 segundos (s) e a uma velocidade de 230 rotações por minuto (rpm), utilizando um homogeneizador *Stomacher*® 400 *Circulator* (Seward Limited, Londres, UK).

Esta suspensão foi utilizada para a contagem de *E. coli* no sistema TEMPO® EC (correspondendo à amostra 10^{-1}) e como meio de pré-enriquecimento para a pesquisa de *Salmonella* spp.

3.2.1.2 Contagem e identificação de *E. coli*

Para a contagem de *E. coli* foi utilizado o sistema TEMPO® EC (bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, França), desenvolvido para obter um desempenho análogo ao preconizado na norma ISO 16649-2:2001. Este consiste num sistema comercial automatizado, para a contagem de *E. coli* em géneros alimentícios, composto por um frasco de meio de cultura e uma “carta” de identificação. O equipamento TEMPO® utiliza métodos estatísticos, o método do Número Mais Provável (NMP), para calcular o número de microrganismos presentes nas amostras em estudo (bioMérieux, 2022a).

Para a contagem de *E. coli*, e após hidratação e homogeneização dos meios de cultura TEMPO® EC com 3 mL de água destilada estéril, foi adicionado 1 mL das amostras previamente preparadas (**ponto 3.2.1.1**). As amostras foram automaticamente pipetadas pelo equipamento Tempo® *Filler* para as “cartas” TEMPO® EC e foram incubadas 24 h a 37 ± 1 °C. O valor da contagem de microrganismos foi lido pelo equipamento Tempo® *Reader*. O saco TEMPO®, contendo a diluição 10^{-1} inicial, foi incubado a 37 ± 1 °C durante 24 h. Após este período, foi inserida uma ansa diretamente no saco

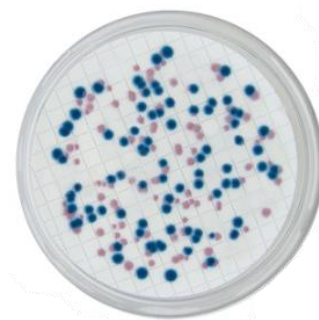


Figura 3.3. Meio de cultura CCA com crescimentos de colónias de *E. coli* (Solabia Group, 2016a).

TEMPO® e procedeu-se ao espalhamento num meio seletivo e diferencial, CCA (Biokar, Beauvais, França), que foi incubado 24 h a 37 ± 1 °C.

Os resultados positivos traduziram-se no crescimento de colónias azuis-escuras (**Figura 3.3.**). De cada placa, foram repicadas até 6 colónias, para isolamento em meio não seletivo, Gelose Simples (GS).

A conservação das estirpes de *E. coli* foi realizada por inoculação num meio nutritivo suplementado com glicerol, Caldo de Triptona Soja (TSB) com 20% glicerol (Biokar, Beauvais, França) a -20 °C.

3.2.1.3 Pesquisa e identificação de *Salmonella* spp.

Para pesquisa de *Salmonella* spp. foi utilizado o sistema VIDAS® SLM (bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, França). Este sistema comercial automatizado consiste num teste imunoenzimático para deteção específica de antígenos de *Salmonella* spp., através da técnica *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA) (bioMérieux, 2022b).

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., o meio de pré-enriquecimento em água peptonada tamponada, descrito no **ponto 3.2.1.1**, foi incubado a 37 ± 1 °C durante 16-20 h. Procedeu-se à transferência de 0,1 mL desta suspensão para um tubo contendo 10 mL de caldo de enriquecimento seletivo *Salmonella Xpress 2* (SX2) (bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, França), que foi homogeneizado e incubado 22-26 h a $41,5\pm 1$ °C. Após o período de incubação, a suspensão foi homogeneizada e 500 µl da mesma foram testados pelo método VIDAS® SLM.

As amostras com resultado positivo foram sujeitas a testes de confirmação e identificação, como recomendado na norma ISO 6579-1:2017. Assim, foi inserida uma ansa diretamente no tubo contendo caldo SX2, a qual foi inoculada, por espalhamento, em meios seletivos e diferenciais, XLD e IRIS *Salmonella* Agar (Biokar, Beauvais, França). As placas foram incubadas 24 h a 37 ± 1 °C.

O isolamento foi realizado a partir da inoculação das amostras no meio IRIS *Salmonella* Agar, e os resultados positivos traduziram-se no crescimento de colónias cor-de-rosa (**Figura 3.4.**). Foi repicada 1 colónia, para isolamento em meio não seletivo de GS.

As estirpes de *Salmonella* spp. foram conservadas em meio TSB 20% glicerol a -20°C.



Figura 3.4. Meio de cultura IRIS com crescimentos de colónias de *Salmonella* spp. (Solabia Group, 2016b).

3.2.1.4 Critérios microbiológicos utilizados para a interpretação dos resultados obtidos

A interpretação dos resultados dos ensaios microbiológicos obtidos nas amostras de carne de suínos teve por base o número de unidades formadoras de colónias (ufc) de *E. coli* por grama (ponto 3.2.1.2) e a presença ou ausência de *Salmonella* spp. (ponto 3.2.1.3) nas amostras analisadas, segundo os critérios microbiológicos definidos no Regulamento (CE) n.º 1441/2007 (ponto 1.4.2).

Relativamente à deteção de *Salmonella* spp., foram utilizados os critérios microbiológicos de segurança definidos pelo regulamento para preparados de carne. No caso de *E. coli*, e uma vez que a legislação vigente não abrange critérios microbiológicos de segurança para a sua contagem em carne, a interpretação dos resultados foi realizada com base nos critérios de higiene dos processos estabelecidos para preparados de carne (Tabela 3.3.).

Tabela 3.3. Critérios microbiológicos utilizados para a avaliação da qualidade microbiológica da carne de suínos.

	Resultado		
	Contagem (ufc/g) ou Pesquisa (em 10 g)		
	Satisfatório	Questionável	Não satisfatório
<i>E. coli</i> (ufc/g)	≤ 500	> 500 ≤ 5000	> 5000
<i>Salmonella</i> spp.	Não detetado	N/A	Detetado

ufc/g, unidades formadoras de colónias por grama; N/A, Não aplicável.

3.3 Isolamento e Identificação de *E. coli* e *Salmonella* spp. de Fezes de Suínos

O procedimento de isolamento e seleção de *E. coli* e *Salmonella* spp. de amostras de fezes foi realizado em ambiente estéril, de acordo com o esquema apresentado na **Figura 3.5**.

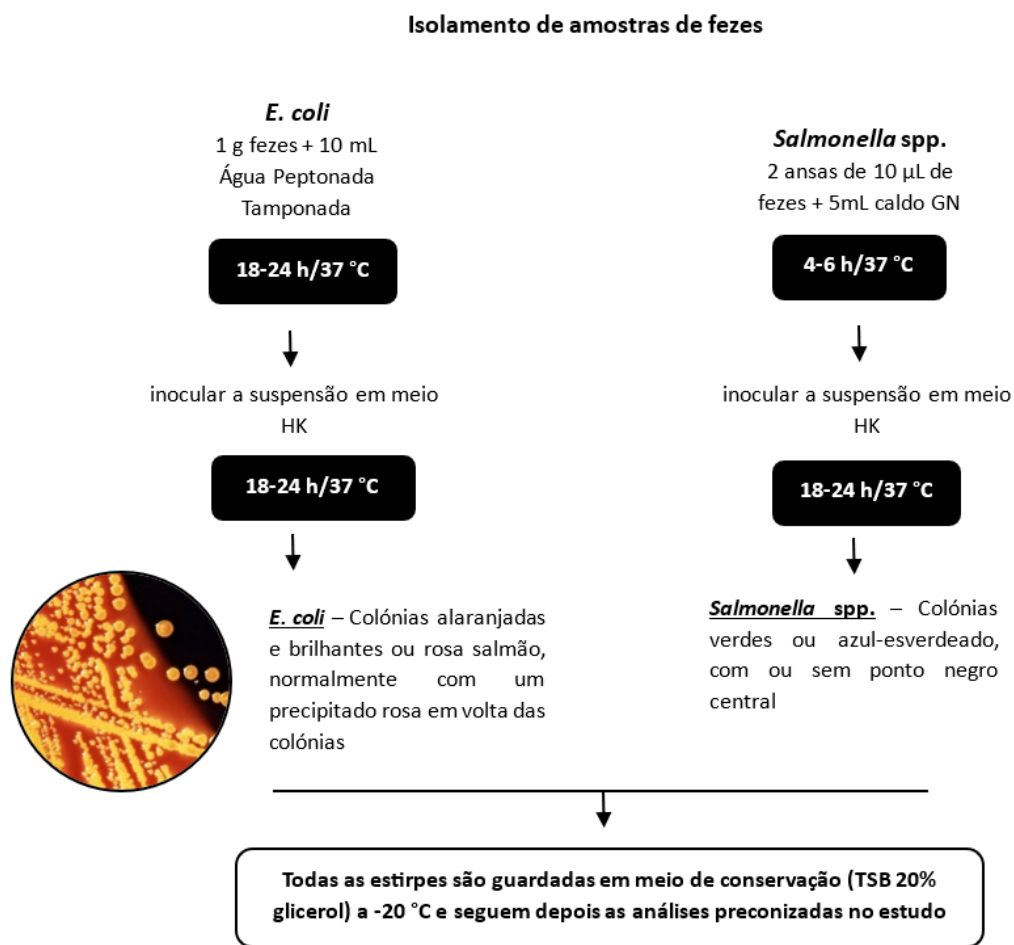


Figura 3.5. Esquema para isolamento e seleção de *E. coli* e *Salmonella* spp. de amostras de fezes.

GN, Gram-negativo; HK, Agar Hektoen; TSB, Caldo de Triptona Soja.

Para o isolamento de *E. coli*, foi efetuada uma suspensão de 1 g de amostra fecal em 10 mL de água peptonada tamponada. Após um período de incubação de 18-24 h a 37±1°C, sem agitação, foi realizado o espalhamento em meio seletivo e diferencial HK. Após incubação a 37±1°C durante 18-24 h, os resultados positivos traduziram-se no crescimento de colônias alaranjadas e brilhantes ou rosa salmão, normalmente com um precipitado rosa em volta (**Figura**

3.5.). Foram repicadas até 6 colónias de cada cultura, para isolamento em meio não seletivo de GS.

No caso de *Salmonella* spp., foi efetuada uma suspensão de 2 ansas de 10 µL de amostra fecal em 5 mL de caldo de enriquecimento seletivo Gram-Negativo (GN). Após uma incubação de 4-6 h a 37±1°C, procedeu-se à inoculação, por espalhamento, em meio HK. A incubação no meio HK ocorreu a 37±1°C durante 18-24 h e os resultados positivos traduziram-se no crescimento de colónias verde ou azul-esverdeado, com ou sem ponto negro central.

As estirpes de *E. coli* e *Salmonella* spp. foram conservadas em TSB 20% glicerol e guardadas a -20°C, até que todos os procedimentos fossem concluídos.

3.4 Identificação de *E. coli*

A identificação de *E. coli* foi feita com base nas características morfológicas das colónias, observadas no meio seletivo. No caso de surgirem dúvidas nesta identificação presuntiva, procedeu-se à identificação por VITEK® 2 e VITEK® MS ou, em alternativa, por PCR para pesquisa do gene *16S rRNA* específico de *E. coli*.

3.4.1 Equipamento VITEK®

As colónias suspeitas de *E. coli* foram confirmadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Doenças Infeciosas do INSA, utilizando os equipamentos automatizados VITEK® 2 COMPACT ou VITEK® MS (bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, França).

O equipamento VITEK® 2 COMPACT permite a identificação de microrganismos com base nas propriedades bioquímicas (bioMérieux, 2022c), enquanto o equipamento VITEK® MS se baseia na espectrometria de massa MALDI-TOF, associada a uma base de dados alargada de espécies clinicamente relevantes (bioMérieux, 2022d).

3.4.2 Reação de polimerase em cadeia para deteção do gene *16S rRNA*

Em alternativa à identificação pelo equipamento VITEK®, as colónias de *E. coli* foram confirmadas através de uma PCR específica para deteção do gene *16S rRNA*.

Para este procedimento, o DNA foi extraído por fervura e diluído a 1:10, em água ultrapura. A partir de uma cultura pura, e com o auxílio de uma ansa estéril de 1 µL, foi feita uma suspensão em 100 µL de água ultrapura, livre de DNases e RNases. A suspensão foi colocada

num banho-maria a 100°C, durante 10 min e, arrefecida a -20°C durante 1 min. Após centrifugação a 10.000 rpm durante 10 min, o sobrenadante foi recolhido e guardado a -20°C, até ser necessário.

Na mistura de reação, para além do DNA (1 µL) foi utilizada a enzima *KAPA robust* (Roche, Basel, Switzerland), segundo as especificações do fabricante, e 1 µL de cada *primer* (para uma concentração 0,4 µM na reação), descritos na **Tabela 3.4**. Como controlo positivo foi utilizado 1 µL de DNA dos painéis de avaliação externa de qualidade (AEQ) em que o laboratório participa, a uma diluição 1:10. O volume final da mistura de reação foi de 25 µL.

A reação de amplificação ocorreu de acordo com as condições descritas na **Tabela 3.4**, e os produtos amplificados foram sujeitos a uma eletroforese (100 V/30 min) em gel de agarose 2,5%, com tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) com uma concentração 0,5x.

Tabela 3.4. Descrição dos *primers* utilizados para a amplificação do gene alvo *16S rRNA*, tamanho do fragmento amplificado e condições da reação de amplificação.

Gene Alvo	<i>Primers</i>	Sequências Nucleótídicas (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Condições de amplificação		Referência
16S rRNA	ECA75	GGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGAC	544	95°C 3 min	1x	Adaptado de Sabat <i>et al.</i> , 2000
				95°C 15 s		
				65°C 15 s		
				72°C 15 s	30 x	
ECR619R	AGCCCGGGGAT-TTCACATCTGACTTA	72°C 1 min	1x			
		12°C		∞		

F, *Forward*; R, *Reverse*; A, Adenina; T, Timina; C, Citosina; G, Guanina; pb, pares de bases; rRNA, RNA ribossómico.

3.5 Identificação de *Salmonella* spp.

As colónias suspeitas de *Salmonella* spp. foram confirmadas por VITEK® 2 ou VITEK® MS (ponto 3.4.1).

3.6 Caracterização dos Isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp.

Na **Figura 3.6. e 3.7.** encontram-se representadas, sob uma forma esquemática, as metodologias utilizadas para a caracterização fenotípica e genotípica dos isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp., respectivamente.

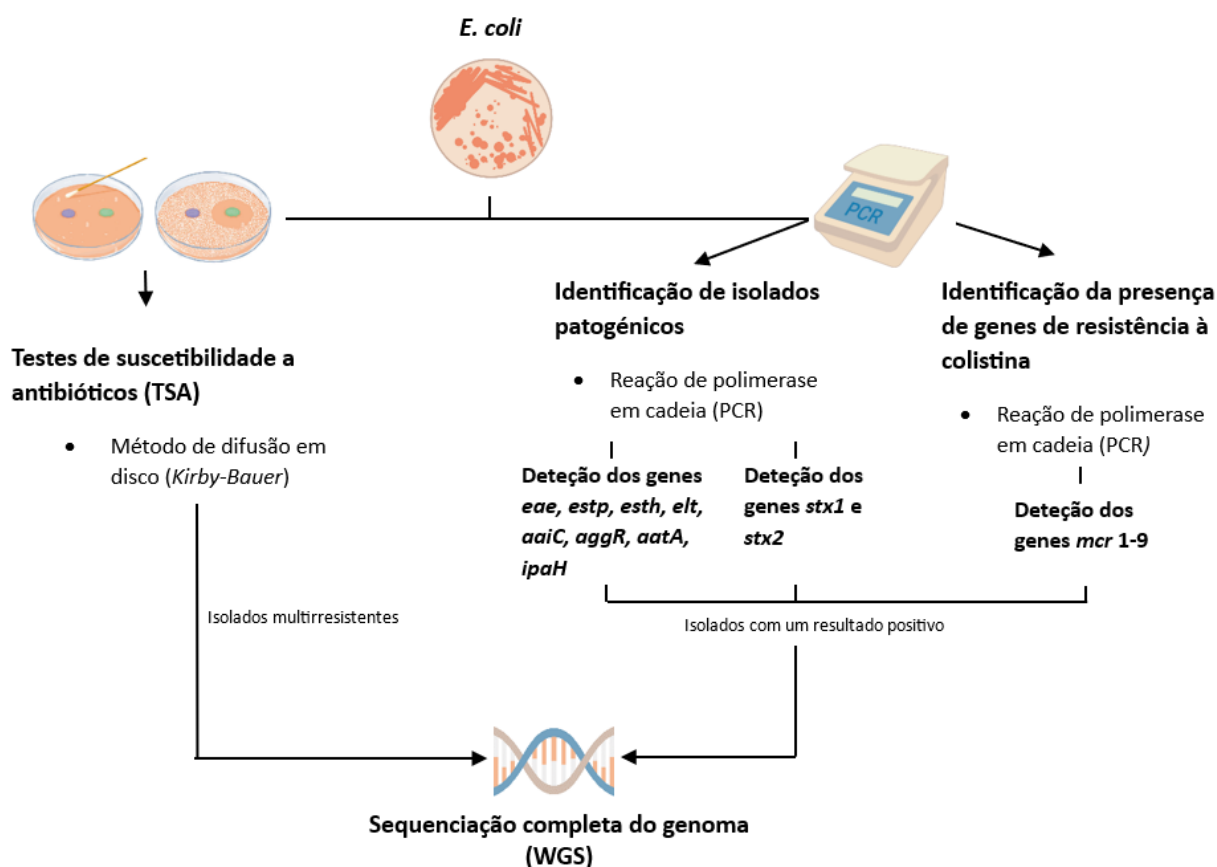


Figura 3.6. Metodologias utilizadas para a caracterização dos isolados de *E. coli*.

eae, gene responsável pela produção de intimina; *estp*, gene responsável pela produção da enterotoxina termooestável *porcine* (*sta1*, *estap*, *stap*); *esth*, gene responsável pela produção da enterotoxina termooestável humana (*st*, *ta2*, *sta3*, *sta4*, *stah*, *estah*); *elt*, gene responsável pela produção da enterotoxina termolábil; *aaiC*, gene responsável pela produção de uma proteína secretada pelo sistema de secreção de tipo IV codificado no agrupamento cromossômico Aai; *aggR*, gene responsável pela produção do fator de transcrição AggR que ativa a transcrição de diversos genes de patogenicidade; *aatA*, gene responsável pela produção da dispersina do sistema de transporte; *ipaH*, gene responsável pela produção da proteína efetora que inicia a cascata de ubiquitina, necessária para a invasão das células; *stx1* e *2*, genes responsáveis pela produção das toxina Shiga 1 e 2 respectivamente, que definem o patótipo STEC/EHEC; *mcr*, gene responsável pela resistência à colistina.

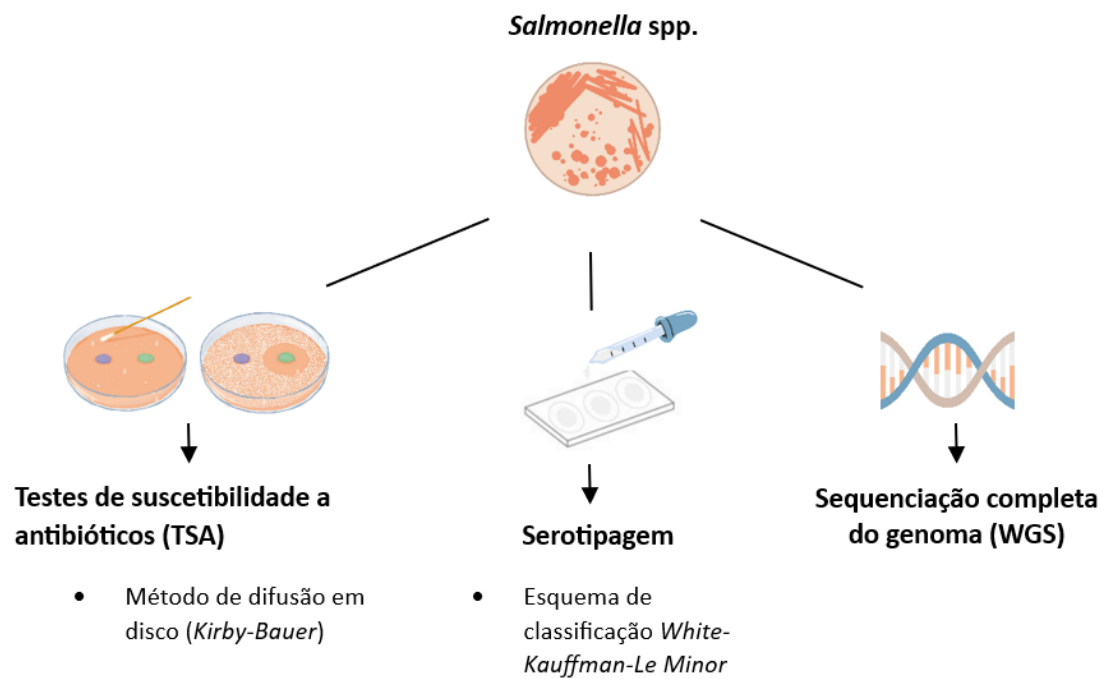


Figura 3.7. Metodologias utilizadas para a caracterização dos isolados de *Salmonella* spp.

3.6.1 Reação de polimerase em cadeia

3.6.1.1 Pesquisa e identificação de fatores de patogenicidade de *E. coli* (IPEC)

3.6.1.1.1 Detecção dos genes *eae*, *estp*, *esth*, *elt*, *aaiC*, *aggR*, *aatA*, *ipaH*

A detecção e identificação dos genes de virulência de *E. coli* *eae*, *estp*, *esth*, *elt*, *aaiC*, *aggR*, *aatA* e *ipaH* foi realizada através de três reações de PCR *multiplex*.

Para este procedimento, foi utilizado o DNA previamente extraído por fervura (consultar **ponto 3.4.2**), diluído em água ultrapura numa proporção 1:5. Tendo em consideração que foram guardadas até seis colónias/estirpes de *E. coli* de cada amostra biológica analisada, a detecção foi inicialmente realizada em *pools* de seis ou menos colónias. Sempre que surgiu um resultado positivo na PCR, todas as estirpes incluídas na *pool* foram analisadas individualmente.

Foram preparadas três misturas de reação, para um volume final de 20 µL: mistura 1 para detecção dos genes *eae* e *ipaH*, mistura 2 para detecção dos genes *elt*, *estp*, *esth* e *aaiC*, e mistura 3 para detecção dos genes *aggR* e *aatA*. Para além do DNA (2,5 µL), a cada mistura foi adicionada a enzima *Hotstar Taq Plus* (Qiagen®, Hilde, Alemanha), segundo as especificações do fabricante, e os respetivos *primers* (para uma concentração de 0,2 µM na reação), descritos na **Tabela 3.5**. Como controlo positivo foi utilizado 2,5 µL de DNA (diluído a 1:5) dos painéis de AEQ em que o laboratório participa.

As condições de amplificação encontram-se descritas na **Tabela 3.5.**, e os produtos amplificados foram sujeitos a uma eletroforese (100 V/40 min) em gel de agarose 2,5%, com tampão TBE 0,5x.

Um isolado de *E. coli* foi classificado como patogénico (EPEC, STEC/EHEC, ETEC, EAEC, EIEC) quando foi detetado, pelo menos, um dos genes testados.

Tabela 3.5. Descrição dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes *eae*, *estp*, *esth*, *elt*, *aaiC*, *aggR*, *aatA* e *ipaH*, tamanho do fragmento amplificado e condições da reação de amplificação.

Patotipo	Gene alvo	Primers	Sequências Nucleotídicas (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Condições de amplificação	Referência
EPEC, STEC*/ EHEC	eae	eae F	GGYCAGCGTTTTTTCCTTCCTG	77	95°C	Adaptado de Persson <i>et al.</i> , 2007
		eae R	TCGTCACCARAGGAATCGGAG			
ETEC	estp	estp F	ACTGAATCACTTGACTCTTCA	120	15 min	Adaptado de Fujioka <i>et al.</i> , 2013
		estp R	TCACAGCAGTAAAATGTGTTGT			
	esth	esth F	TTCACCTTTCCCTCAGGATG	172	94°C 50 s	
		esth R	ATAGCACCCGGTACAAGCAG			
	elt	elt F	AACGTTCCGGAGGTCTTATG	511	55,5°C 40 s	
		elt R	CAACCTTGTGGTGCATGATG			
EAEC	aaiC	aaiC F	TGGTGACTACTTT-GATGGACATTGT	313	72°C 1 min	Adaptado de Boisen <i>et al.</i> , 2012
		aaiC R	GACACTCTCTTCTGGGG-TAAACGA			
	aggR	aggR F	GCAATCAGAT-TAARCAGCGATACA	426	72°C 3 min	
		aggR R	CATTCTT-GATTGCATAAGGATCTGG			
	aatA	aatA F	CAGACTCTGGCRAAAGACTG-TATCAT	642	12°C	
		aatA R	CAGCTAATAATGTATA-GAAATCCGCTGT			
EIEC	ipaH	ipaH F	TTGACCGCCTTTCCGATACC	647		Adaptado de Persson <i>et al.</i> , 2007
		ipaH R	ATCCGCATCACCGCTCAGAC			

EPEC, *E. coli* enteropatogénica; EHEC, *E. coli* enterohemorrágica; ETEC, *E. coli* enterotoxigénica; EAEC, *E. coli* enteroagregativa; EIEC, *E. coli* enteroinvasiva; F, *Forward*; R, *Reverse*; A, Adenina; T, Timina; C, Citosina; G, Guanina; pb, pares de bases; *eae*, gene responsável pela produção de intimina; *estp*, gene responsável pela produção da enterotoxina termoestável *porcine* (sta1, estap, stap); *esth*, gene responsável pela produção da enterotoxina termoestável humana (st, sta2, sta3, sta4, stah, estah); *elt*, gene responsável pela produção da toxina termolábil; *aaiC*, gene responsável pela produção de uma proteína secretada pelo sistema de secreção de tipo IV codificado no agrupamento cromossômico Aai; *aggR*, gene responsável pela produção do fator de transcrição AggR que ativa a transcrição de diversos genes de patogenicidade; *aatA*, gene responsável pela produção da dispersina do sistema de transporte; *ipaH*, gene responsável pela produção da proteína efetora que inicia a cascata de ubiquitina, necessária para a invasão das células; *, quando associado ao gene *stx*.

3.6.1.1.2 Detecção dos genes *stx1* e *stx2*

A detecção e identificação da presença de toxinas *Shiga* nos isolados de *E. coli* foi baseada na identificação dos genes *stx1* e *stx2*, em duas reações de PCR específicas.

Para este procedimento, foi utilizado o DNA previamente extraído por fervura (consultar **ponto 3.4.2**), diluído em água ultrapura numa proporção 1:5. A detecção foi inicialmente realizada em *pools* e só depois foi individualizada, tal como descrito no **ponto 3.6.1.1.1**.

Na mistura de reação para além do DNA (5 µL), foi utilizada a enzima *Hotstar Taq Plus* (Qiagen®, Hilde, Alemanha), segundo as especificações do fabricante, e os *primers* (para uma concentração de 0,2 µM) descritos na **Tabela 3.6**. Como controlo positivo foi utilizado 5 µL de DNA (diluído a 1:10) dos painéis de AEQ em que o laboratório participa. O volume final da mistura de reação foi de 20 µL.

As condições de amplificação encontram-se descritas na **Tabela 3.6.**, e os produtos amplificados foram sujeitos a uma eletroforese (100 V/30 min) em gel de agarose 2,5%, com tampão TBE 0,5x.

Um isolado de *E. coli* foi classificado como patogénico (STEC/EHEC) quando foi detetado, pelo menos, um dos genes testados.

Tabela 3.6. Descrição dos *primers* utilizados para amplificação dos genes *stx1* e *stx2*, tamanho do fragmento amplificado e condições da reação de amplificação.

Patotipo	Gene alvo	Primers	Sequências Nucleotídicas (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Condições de amplificação	Referência
STEC/ EHEC	<i>stx1</i>	vtx1-det-F1	GTACGGGGATGCAGA-TAAATCGC	209	95°C 15 min	1x
		vtx1-det-R1	AGCAGTCATTACATAA-GAACGYCCACT		94°C 50 s	
	<i>stx2</i>	vtx2 F4	GGCAC-TGTCTGAAACTGCTCCTGT	627	60°C 40 s	35 x Adaptado de Scheutz <i>et al.</i> , 2012
		vt2 R1	ATTAAACTGCAC-TTCAGCAAATCC		72°C 1 min	
		vt2 F4-f	CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT	625	72°C 3 min	
		vt2 R1e f	TAAACTTCACCTGGG-CAAAGCC		12°C	

STEC/EHEC, *E. coli* produtora de toxina *Shiga*/enterohemorrágica; A, Adenina; T, Timina; C, Citosina; G, Guanina; pb, pares de bases; *stx1* e 2, genes responsáveis pela produção das toxina *Shiga* 1 e 2 respetivamente, que definem o patotipo STEC/EHEC.

3.6.1.2 Identificação da presença de genes de resistência à colistina

A detecção e identificação da presença de genes de resistência à colistina, *mcr-1* a *mcr-9*, foi realizada através de duas reações de PCR *multiplex*.

Para este procedimento, foi utilizado o DNA previamente extraído por fervura (consultar **ponto 3.4.2**), diluído em água ultrapura numa proporção 1:5. A detecção foi inicialmente realizada em *pools* e só depois foi individualizada, tal como descrito no **ponto 3.6.1.1.1**.

Foram preparadas duas misturas de reação, para um volume final de 20 µL: mistura 1 para detecção dos genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* e *mcr-9*, e mistura 2 para detecção dos genes *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*. Para além do DNA (2 µL). A cada mistura foi adicionada a enzima *Hotstar Taq Plus* (Qiagen®, Hilde, Alemanha), segundo as especificações do fabricante, e os respetivos *primers* (para uma concentração de 0,2 µM na reação), descritos na **Tabela 3.7**. Como controlos positivos foram utilizados 2 µL de DNA (diluído a 1:10), previamente sequenciados por WGS ou gentilmente cedidos pelo Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Instituto Nacional de Investigação Veterinária, Lisboa.

As condições de amplificação encontram-se descritas na **Tabela 3.7.**, e os produtos amplificados foram sujeitos a uma eletroforese (100 V/40 min) em gel de agarose 2,5%, com tampão TBE 0,5x.

Tabela 3.7. Descrição dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes alvo *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8* e *mcr-9*, tamanho do fragmento amplificado e condições da reação de amplificação.

Gene alvo	<i>Primers</i>	Sequências Nucleotídicas (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Condições de amplificação		Referência				
Multiplex 1	mcr-1 F	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	320	95°C 15 min	1x	Adaptado de Rebelo <i>et al.</i> , 2018 e Bertelloni <i>et al.</i> , 2022				
	mcr-1 R	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG								
	mcr-2 F	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	715	94°C 50 s	35 x					
	mcr-2 R	TCTAGCCCCGACAAGCATACC								
	mcr-3 F	AAA- TAAAAATGTTCCGCTTATG	929	58,5°C 15 s			1x			
	mcr-3 R	AATGGAGATCCCCGTTTTT								
	mcr-4 F	TCAC TTTCATCACTGCGTTG	1116	72°C 1 min				∞		
	mcr-4 R	TTGGTCCATGACTACCAATG								
	mcr-5 F	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	1644	72°C 3 min					∞	
	mcr-5R	TCATTGTGGTT- GTCCTTTTCTG								
mcr-9 F	TTCCCTTTGTTCTGGTTG	1011	12°C	∞						
mcr-9 R	GCAGGTAATAAGTCGGTC									
Multiplex 2	mcr-6 F	AGCTATGTCAATCCCGTGAT	252		95°C 15 min	1x				Adaptado de Boro- wiak <i>et al.</i> , 2020 e Ber- telloni <i>et al.</i> , 2022
	mcr-6 R	ATTGGCTAGGTTGTCAATC								
	mcr-7 F	GCCCTTCTTTTCGTTGTT	551		57°C 15 s	30 x				
	mcr-7 R	GGTTGGTCTCTTTCTCGT								
	mcr-8 F	TCAACAATTCTACAAA- GCGTG	856		72°C 3 min	1x				
	mcr-8 R	AATGCTGCGCGAATGAAG								

F, *Forward*; R, *Reverse*; A, Adenina; T, Timina; C, Citosina; G, Guanina; pb, pares de bases; *mcr*, gene responsável pela resistência à colistina.

3.6.2 Serotipagem de *Salmonella* spp.

A serotipagem dos isolados de *Salmonella* spp. foi realizada pelo método de aglutinação em lâmina para os antígenos somático (O) e flagelar (H), utilizando o esquema de classificação *White-Kauffman-Le Minor* (Grimont & Weill, 2007).

Foi aplicada uma gota de antissoro somático numa lâmina de vidro e, com uma ansa, misturaram-se as colónias de *Salmonella* spp. previamente isoladas em meio de GS (**ponto 3.2.1.3**). O antígeno somático foi identificado quando, após inclinar a lâmina durante 5 a 10 s, se observou uma reação positiva (aglutinação visível). Uma reação negativa traduziu-se num meio leitoso e turvo (**Figura 3.8.**).

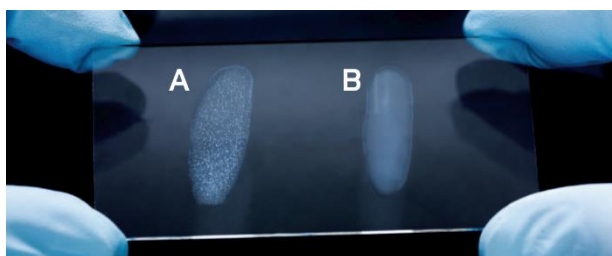


Figura 3.8. Método de aglutinação em lâmina, (A) Reação positiva; (B) Reação negativa (Statens Serum Institut, 2013).

Seguiu-se o enriquecimento da cultura num meio semissólido rico em nutrientes, meio Sven Gard (SG), para identificação dos antígenos flagelares de primeira fase. A cultura foi inoculada, com uma ansa, na superfície da zona central do meio SG. O meio foi incubado 24 h a 37°C e repetiu-se o procedimento de aglutinação em lâmina descrito anteriormente, selecionando as colónias que cresceram na periferia do meio.

Por fim, procedeu-se à viragem de fase, de modo a identificar os antígenos flagelares expressos na segunda fase flagelar. A cultura enriquecida foi inoculada numa nova placa de agar SG, onde foi misturada uma gota de antissoro do antígeno da primeira fase para o qual se obteve uma reação positiva (antissoro de inversão de fase). Após incubação 24 h a 37°C, repetiu-se o procedimento de aglutinação em lâmina, selecionando as colónias que cresceram na periferia do meio (Statens Serum Institut, 2013).

3.6.3 Testes de suscetibilidade a antibióticos

Os TSA foram realizados pelo método de difusão em disco (*Kirby-Bauer*) para todos os isolados de *Salmonella* spp., de acordo com as recomendações do EUCAST. No caso das estir-

pes de *E. coli* isoladas de amostras de carne ou de fezes, o TSA foi realizado em todos os isolados considerados como patogênicos pela PCR (ver pontos 3.6.1.1.1. e 3.6.1.1.2.) e nos restantes isolados foi selecionada, de forma aleatória, uma estirpe. Foram testados 18 antibióticos (das marcas Bio-Rad, Oxoid e Liofilchem), nas doses recomendadas pelo EUCAST para cada uma das bactérias em estudo: amoxicilina-ácido clavulânico; ampicilina; cefepima; cefotaxima; ceftriaxona; cefoxitina; ceftazidima; meropenem; ampicacina; gentamicina; ácido nalidíxico; pefloxacin no caso de *Salmonella* spp., e ciprofloxacina no caso de *E. coli*; trimetoprim; sulfametoxazol; tetraciclina; tigeciclina; azitromicina; e cloranfenicol (Tabela 3.8.).

Para este procedimento foi preparada uma suspensão de colônias de culturas puras e frescas (18-24 h) em solução de soro fisiológico, até se obter 0,5 de turbidez segundo a escala de *McFarland*. A suspensão foi inoculada por espalhamento em meio MH, com o auxílio de uma zaragatoa, e os discos de antibióticos foram aplicados num período máximo de 15 min. As placas foram incubadas a uma temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18-20 h. Após o período de incubação, foi feita a leitura manual do diâmetro dos halos (Figura 3.9.). Os isolados foram classificados como suscetíveis ou resistentes de acordo com os valores de *cut-off* epidemiológicos (ECOFFs) do EUCAST (EUCAST, 2022; EUCAST, 2023). Um isolado foi classificado como MDR quando apresentou resistência a três ou mais classes de antibióticos (Magiorakos *et al.*, 2011).

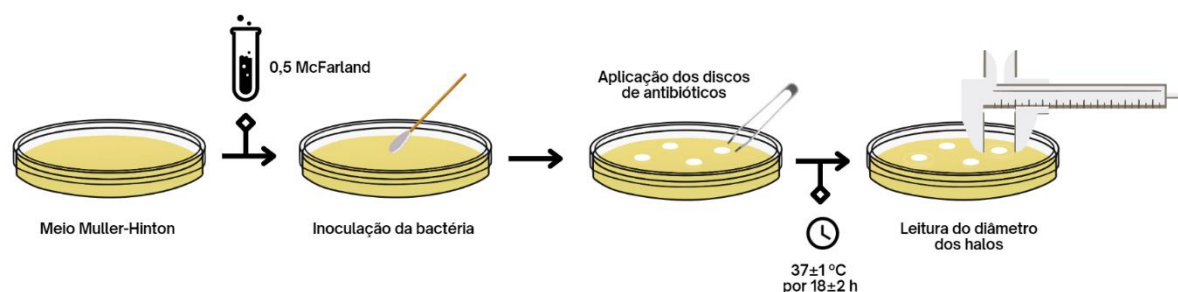


Figura 3.9. Método de difusão em disco (*Kirby-Bauer*).

Tabela 3.8. Antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos de *E. coli* e *Salmonella* spp. (Adaptado de EUCAST, 2022, 2023).

Antibióticos	Abreviatura	Concentração do antibiótico
Amoxicilina-Ácido clavulânico	AMC	30 µg
Ampicilina	AMP	10 µg
Cefepima	FEP	30 µg
Cefotaxima	COX	5 µg
Ceftriaxona	CRO	30 µg
Cefoxitina	FOX	30 µg
Ceftazidima	CAZ	10 µg
Meropenem	MEM	10 µg
Amicacina	AKN	30 µg
Gentamicina	GMN	10 µg
Ciprofloxacina	CIP	5 µg
Ácido nalidíxico	NAL	30 µg
Pefloxacina	PEF	5 µg
Trimetoprim	TMP	5 µg
Sulfametoxazol	SMX	100 µg
Tetraciclina	TET	30 µg
Tigeciclina	TGC	15 µg
Azitromicina	AZM	15 µg
Cloranfenicol	CHL	30 µg

3.6.4 Sequenciação completa do genoma

Para uma caracterização genómica mais aprofundada e para a análise filogenética dos isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp. em estudo, procedeu-se à sequenciação completa do genoma por NGS. Para tal, foram selecionados todos os isolados de *Salmonella* spp., e todos os isolados de *E. coli* patogénicos, identificados por PCR, com genes de resistência à colistina e/ou multirresistentes aos antibióticos testados.

3.6.4.1 Extração e quantificação do DNA

Para realizar a extração de DNA por coluna de sílica, foi utilizado o protocolo de purificação de DNA genómico de culturas de células humanas ou tecidos animais, fornecido pelo

sistema comercial de extração *ISOLATE II Genomic DNA* (Bioline, Londres, RU), de acordo com as especificações do fabricante.

Neste método de extração, os ácidos nucleicos ligam-se a uma fase estacionária de sílica enquanto as impurezas como sais, metabolitos e componentes celulares são removidas no fluxo de lavagens, efetuadas com dois tampões diferentes. No final, é utilizado um tampão de eluição apropriado para recuperar o DNA, através de centrifugação. O DNA obtido por este procedimento é de elevada qualidade, livre de contaminantes, e passível de ser utilizado na sequenciação completa do genoma dos isolados em estudo (Meridian, 2023).

A quantificação do DNA foi realizada utilizando o fluorímetro Qubit® (Invitrogen/Life Technologies, Grand Island, NY) e o sistema comercial *dsDNA HS Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), de acordo com as indicações do fabricante. Os produtos quantificados (25 µL de DNA a uma concentração de 5 ng/µL) foram enviados para a Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA, que é responsável pela preparação e manipulação dos equipamentos de sequenciação, não tendo a autora participado nestes procedimentos.

3.6.4.2 Sequenciação completa do genoma

Para a preparação das bibliotecas foi utilizado o sistema *NexteraXT library preparation protocol* (Illumina, San Diego, CA), de acordo com as instruções do fabricante.

A sequenciação (*paired-end sequencing* 2x250pb ou 2x150pb) foi realizada nos aparelhos MiSeq ou NextSeq 550 (Illumina, EUA), e a qualidade do resultado obtido foi avaliada utilizando o software FastQC v0.11.1. Os *raw reads* foram posteriormente entregues ao laboratório, que procedeu à subsequente análise genómica.

3.6.4.3 Análise genómica dos isolados

Após a sequenciação, os *reads* (em formato *fastq*) foram disponibilizados ao laboratório e foram submetidos na plataforma *Enterobase* (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>). Utilizando a pipeline *QAssembly v3.61*, foram realizados, de forma automática, a avaliação da qualidade dos *reads*, o *trimming* e a construção de *assemblies* de elevada qualidade. A informação sobre o filogrupa dos isolados de *E. coli* em estudo e sobre novas sequências tipo foi obtida *in silico* nesta plataforma.

Os *assemblies* foram posteriormente submetidos na plataforma CGE (<https://www.genomicepidemiology.org/>), para a identificação dos genes de resistência e mutações pontuais preditivas da resistência antimicrobiana (*ResFinder 4.1*), a identificação dos genes de virulência (*VirulenceFinder 2.0*), a previsão *in silico* da patogenicidade para o Homem (*PathogenFinder 1.1*), a identificação *in silico* da sequência tipo (ST) (*MLST 2.0*), a identificação *in silico* do serotipo de *E. coli* (*SeroTypeFinder 2.0*), a identificação/confirmação *in silico* do serotipo de *Salmonella* (*SeqSero 1.2*), a identificação de plasmídeos (*PlasmidFinder 2.1*) e a identificação

in silico do tipo *FimH* e *FumC* de *E. coli* (CHTyper 1.0). Para a identificação dos genes de virulência de *Salmonella* spp., os *assemblies* foram submetidos na plataforma *Virulence Factors of Pathogenic Bacteria* (VFDB), utilizando a ferramenta *Vfanalyser* (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Salmonella>).

Para a análise filogenética dos isolados foi utilizada a plataforma *Enterobase*, seguindo o esquema *cgMLST V1 + HierCC V1*, composto por 2513 *loci* para *E. coli* e o esquema *cgMLST V2 + HierCC V1*, composto por 3002 *loci* para *Salmonella* spp. (Achtman *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020). Com base no *core genome Multilocus Sequence Typing* (cgMLST) dos isolados foram construídas árvores filogenéticas, *minimum spanning trees* (MSTree), utilizando o programa *GrapeTree* (com base no algoritmo NINJA NJ) (Zhou *et al.*, 2018).

3.7 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com recurso ao software *MS-Excel*. Especificamente, a comparação das variáveis entre os dois grupos de estudo (carne e fezes de suínos) foi realizada utilizando o teste exato de *Fisher*, para um nível de confiança de 95% (um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo).

RESULTADOS

No presente estudo foram analisados 152 produtos biológicos de origem suína, quanto à presença de *E. coli* e *Salmonella* spp.

Foram estudadas 52 amostras de carne de suíno, provenientes de diferentes regiões de Portugal: 5,8% (3/52) da região Centro, 44,2% (23/52) da região de Lisboa e Vale do Tejo, 3,8% (2/52) da região do Algarve. Em 24 (46,2%) amostras, não foi possível identificar a região de origem. De entre as amostras de carne consideradas, foi possível distinguir nove produtores diferentes, apesar de não ter sido possível identificar o produtor das 24 amostras de origem desconhecida (**Tabela 3.1., ponto 3.1.1**)

Foram igualmente analisadas 100 amostras de fezes de suínos produzidos para consumo humano, recolhidas em diferentes matadouros, e provenientes de explorações de diferentes regiões de Portugal: 1,0% (1/100) da região Norte, 48,0% (48/100) da região Centro, 10,0% (10/100) da região de Lisboa e Vale do Tejo, e 3,0% (3/100) da região do Alentejo. Em 38,0% (38/100) das amostras de fezes de suínos não foi possível identificar o local de proveniência. De entre as amostras fecais em análise, foram distinguidas 25 explorações (**Tabela 3.2., ponto 3.1.1**).

4.1 Avaliação da Qualidade Microbiológica das Amostras Alimentares

Relativamente às 52 matrizes alimentares em estudo, foram realizadas análises microbiológicas para a contagem de *E. coli* (ufc/g) e para a pesquisa de *Salmonella* spp. De acordo com a sua qualidade microbiológica, e segundo os critérios microbiológicos definidos no Regulamento (CE) n.º 1441/2007, as amostras foram classificadas como satisfatórias, questionáveis e insatisfatórias. Os resultados encontram-se apresentados na **Tabela 4.1**.

As amostras de carne analisadas foram, na maioria dos casos, consideradas de qualidade microbiológica satisfatória (92,3% para *E. coli* e 94,2% para *Salmonella* spp.). No que se refere às sete amostras cuja qualidade microbiológica foi considerada insatisfatória (CC10, CC12, CC15, CC26, CC47, CC51 e CC52), duas eram do produtor LVT-4-CC, duas eram do produtor LVT-7-CC e nas restantes três amostras não foi possível identificar o produtor.

Tabela 4.1. Resultados da contagem de *E. coli* (ufc/g) e pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de carne de suínos, agrupados pela sua qualidade microbiológica.

Contagem de <i>E. coli</i> (ufc/g)	Nº de amostras	Frequência	Qualidade microbiológica
≤ 500	48	92,3%	Satisfatória
> 500 ≤ 5000	0	0,0%	Questionável
> 5000	4	7,7%	Insatisfatória
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. em 10 g	Nº de amostras	Frequência	Qualidade microbiológica
Positiva	3	5,8%	Insatisfatória
Negativa	49	94,2%	Satisfatória

ufc/g, unidades formadoras de colónias por grama.

4.2 Isolamento de *E. coli* e *Salmonella* spp.

Relativamente às matrizes alimentares, foi possível obter isolados de *E. coli* em 69,2% (36/52) das amostras analisadas (**Figura 4.1.**) e isolados de *Salmonella* spp. em 5,8% (3/52) (**Figura 4.3.**). Importa salientar que o isolamento de estirpes de *E. coli* foi possível não só em amostras cuja contagem no equipamento TEMPO® EC foi elevada (>10⁴ ufc/g) como também em amostras que apresentaram uma contagem inferior a 10 ufc/g de alimento. Apesar de terem sido utilizados meios de cultura seletivos, não foi possível proceder ao isolamento de *E. coli* em 16 amostras de carne (maioritariamente nas amostras com contagens <10 ufc/g e devido ao elevado grau de contaminação por outras bactérias, nomeadamente da família *Enterobacteriaceae*). Assim, e no âmbito deste estudo, estas amostras foram consideradas como negativas para *E. coli*.

No que se refere às amostras fecais de suínos produzidos para consumo humano (n=100), foram isoladas *E. coli* em todas as amostras (**Figura 4.2.**), contrariamente ao observado para *Salmonella* spp., que não foi isolada em nenhuma.

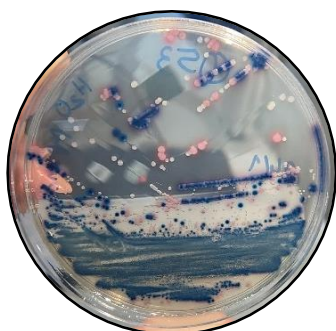


Figura 4.1. Meio de cultura CCA com crescimentos de colônias de *E. coli* (azuis-escuras) isoladas de uma amostra de carne de suínos.

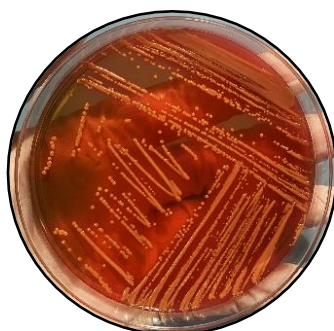


Figura 4.2. Meio de cultura HK com crescimentos de colônias de *E. coli* (alaranjadas e brilhantes) isoladas de uma amostra de fezes de suínos.

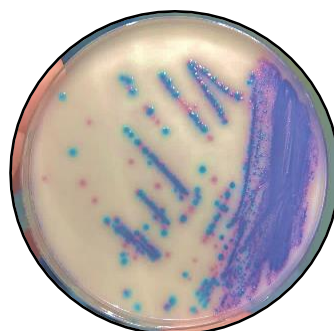


Figura 4.3. Meio de cultura IRIS com crescimentos de colônias de *Salmonella* spp. (cor-de-rosa) isoladas de uma amostra de carne de suínos.

4.3 Caracterização dos Isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp.

A caracterização dos isolados de *E. coli* (182 isoladas de carne e 397 isoladas de fezes de suínos) e de *Salmonella* spp. (três isoladas de carne de suínos) foi realizada segundo os esquemas representados nas **Figuras 3.6. e 3.7.**, do **ponto 3.6.**

Após o isolamento das bactérias, foi realizada a serotipagem de *Salmonella* spp., e a detecção de fatores de patogenicidade e de genes de resistência para a colistina dos isolados de *E. coli* (por PCR). Foi testada fenotipicamente a resistência a antibióticos em todos os isolados de *Salmonella* spp. e em todas as colônias de *E. coli* consideradas como patogênicas pela PCR. Nos restantes isolados de *E. coli* foi selecionada, de forma aleatória, uma colônia de cada amostra.

Tendo em consideração que a detecção de fatores de patogenicidade de *E. coli* foi inicialmente realizada em *pools* de seis ou menos colônias de cada amostra, sempre que surgiu um resultado positivo na PCR, as estirpes incluídas em cada *pool* foram analisadas individualmente. Em particular, em três amostras de fezes de suínos (**SM8, SM37, SM90**) foram analisadas duas colônias da mesma amostra biológica, uma vez que após a PCR foram identificados diferentes fatores de patogenicidade ou os resultados obtidos foram inconclusivos. Todos os isolados cuja identificação de fatores de patogenicidade de *E. coli* por PCR foi inconclusiva (n=11; **CC8, CC15, CC44, SM8, SM10, SM28, SM32, SM37, SM78, SM92, SM99**) foram submetidos a WGS.

No total, foram submetidos a sequenciação completa do genoma 64 isolados: três *Salmonella* spp. isoladas de carne, 14 estirpes de *E. coli* isoladas de carne (3 por fatores de patogenicidade e 11 por multirresistência) e 47 estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de suínos (9 por fatores de patogenicidade, 34 por multirresistência e 4 por fatores de patogenicidade e multirresistência).

4.3.1 Identificação dos patotipos de *E. coli*

Na **Tabela 4.2.** encontram-se apresentados os patotipos de *E. coli* intestinais e extraintestinais encontrados nas amostras de carne e de fezes de suínos. A identificação dos patotipos foi realizada com base nos resultados da PCR e/ou nos dados obtidos através da sequenciação completa do genoma dos isolados.

A classificação dos isolados de *E. coli* como ExPEC foi efetuada de acordo com o referido por Sarowska *et al.*, 2019 e Sora *et al.*, 2021, sempre que foram identificados dois ou mais genes de virulência característicos de ExPEC (**Anexo A**).

No presente trabalho, nos casos em que simultaneamente foram identificados genes de virulência característicos de IPEC e ExPEC, a classificação para esses isolados foi definida como *E. coli* patogénica intestinal.

Tabela 4.2. Patotipos de *E. coli* identificados nos isolados de amostras de carne e de fezes de suínos.

Patotipos		Carne de suínos (n=36)	Fezes de suínos (n=103)	Valor de <i>p</i>
PCR e/ou WGS	STEC N° (%)	0	2 (1,9%)	N/S
	EPEC N° (%)	0	0	NA
	ETEC N° (%)	0	4 (3,9%)	N/S
	EAEC N° (%)	0	0	NA
	EIEC N° (%)	0	0	NA
		Carne de suínos (n=14)	Fezes de suínos (n=47)	
WGS	ExPEC	14 (100%)	41 (87,2%)	N/S

PCR, Reação de polimerase em cadeia; WGS, Sequenciação completa do genoma; STEC, *E. coli* produtora de toxina *Shiga*; EPEC, *E. coli* enteropatogénica; EHEC, *E. coli* enterohemorrágica; ETEC, *E. coli* enterotoxigénica; EAEC, *E. coli* enteroagregativa; EIEC, *E. coli* enteroinvasiva; IPEC, *E. coli* patogénica intestinal; ExPEC, *E. coli* patogénica extraintestinal; N/S, não significativo ($p>0,05$); NA, não aplicável.

Com base na PCR, e nos fatores de patogenicidade testados, não foram identificadas IPEC nos isolados de carne de suínos (**Tabela 4.2.**).

No caso das estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de suínos, foi identificado o patotipo STEC, associado à presença do gene *stx2*, em duas amostras (SM 36, SM90(1)) (**Figura 4.4.**). A

análise dos dados de WGS confirmou a presença deste gene e permitiu a identificação do sub-tipo *stx2e* em ambos os isolados (**Figura 4.6., ponto 4.3.2**). Não foi identificado o gene *eae*, associado ao gene *stx2e*, em nenhum dos isolados.

Com base nos resultados de WGS, em quatro amostras de fezes de suínos foi identificado o gene *estb*-STb1, que caracteriza o patotipo ETEC (**SM8(1), SM10, SM32, SM37(5)**). Este gene não estava incluído na PCR para detecção de fatores de patogenicidade de IPEC (**Figura 4.6., ponto 4.3.2**).

Para além dos patotipos intestinais já referidos, as restantes estirpes de *E. coli* isoladas de carne e de fezes de suínos sequenciadas, foram todas classificadas como ExPEC (90,2%; 55/61) (**Tabela 4.2.**).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na prevalência de STEC, ETEC e ExPEC isoladas de amostras de carne e de fezes de suínos ($p>0,05$).

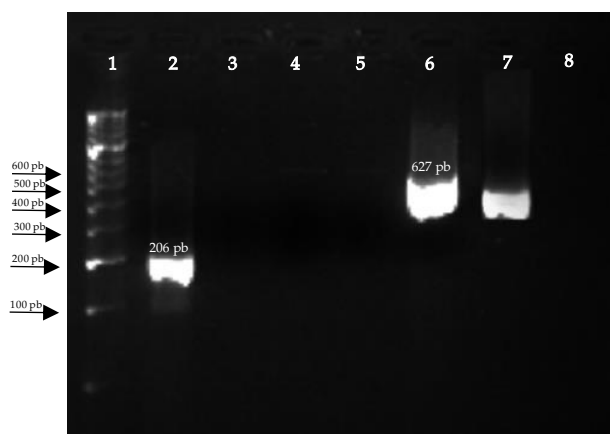


Figura 4.4. Imagem do gel eletroforese resultante da PCR para os genes *stx1* e *stx2*.

1, marcador de pesos moleculares; 2, controle positivo para a amplificação do gene *stx1*; 3, 4, e 5, amostras de DNA sem amplificação para os genes *stx1* e *stx2*; 6, controle positivo para a amplificação do gene *stx2*; 7, amostra de DNA com amplificação para o gene *stx2*; 8, controle negativo.

4.3.2 Identificação dos genes de virulência de *E. coli* e *Salmonella* spp.

Os genes de virulência identificados, após sequenciação completa do genoma das estirpes de *E. coli* isoladas de carne e fezes de suínos, encontram-se descritos nas **Figuras 4.5. e 4.6.**, respetivamente.

Neste estudo, foi identificada uma ampla diversidade de genes de virulência associados aos isolados de *E. coli*, em ambos os grupos de estudo. No total, foram encontrados 73 genes distintos (**Figuras 4.5. e 4.6.**).

De entre as amostras de carnes de suínos, o isolado **CC47**, classificado como ExPEC, apresentou o maior número de genes de virulência identificados, 39 genes. Nas amostras de fezes de suínos, o isolado **SM91**, também classificado como ExPEC, exibiu o maior número de genes de virulência, somando um total de 36 genes.

Em todos os isolados de *E. coli* sequenciados foram identificados genes de virulência de *E. coli* patogénica extraintestinal. Os fatores de virulência de ExPEC associados às adesinas, nomeadamente os codificados pelos genes *csgA* e *fimH*, foram identificados em 100% (14/14) e 92,9% (13/14) dos isolados de carne, respetivamente, e 97,9% (46/47) dos isolados de fezes de suínos. Os fatores de virulência de ExPEC associados a protetinas, *trtA* e *iss*, foram identificados em, respetivamente, 78,6% (11/14) e 64,3% (9/14) das estirpes de *E. coli* isoladas de carne, e 59,6% (28/47) e 53,2% (25/47) das estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de suínos.

Além dos genes que caracterizam os patótipos IPEC e ExPEC, foi possível identificar outros fatores de virulência associados a fímbrias e a proteínas de resistência a metais (como os genes *nlpI*, *terC*, *yehA*, *B*, *C* e *D*) em mais de 92,0% dos isolados de carne e de fezes suínos. Em particular o gene *terC* foi identificado em 100% dos isolados de carne e de fezes de suínos. Os genes *fdeC* (associado a uma adesina semelhante à intimina) e *hlyE* (gene da hemolisina E) foram identificados em, respetivamente, 100% (14/14) e 78,6% (11/14) das estirpes de *E. coli* isoladas de carne de suínos, e em 89,4% (42/47) e 97,9% (46/47) das estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de suínos. O gene *gad*, que codifica a enzima descarboxilase do ácido glutâmico foi identificado em 71,4% (10/14) dos isolados de carne e 89,4% (42/47) dos isolados de fezes de suínos. O gene *astA*, que codifica a enterotoxina termoestável EAST-1, foi identificado em 14,3% (2/14) dos isolados de carne e 23,4% (11/47) dos isolados de fezes de suínos.

No caso de *Salmonella* spp. isoladas de carnes de suíno, foi também possível identificar uma grande variedade de genes (n=95), pertencentes a 10 classes diferentes de fatores de virulência: 79 genes no isolado **CC10** (*S. London*), 78 genes no isolado **CC26** (*S. Typhimurium* monofásica) e 75 no isolado **CC47** (*S. Typhimurium*) (**Anexo B**). Destes, 60 (63,2%) foram comuns a todos os isolados, incluindo os genes *invA* e *hlyA*. O gene de invasão *ibeB* foi identificado apenas no isolado **CC26** e o gene *spvB*, que codifica a exotoxina SpvB, apenas no isolado **CC47**. Os genes *spvC*, *spvR*, *stn* e *fimA* não foram identificados em nenhum isolado.

4.3.3 Identificação *in silico* dos filogrupos de *E. coli*

No presente estudo, 42,9% das estirpes de *E. coli* isoladas de carne de suínos pertenciam ao filogrupo A (42,9%), seguido do filogrupo B1 (21,5%) e filogrupo C (14,3%), enquanto nos isolados de fezes suínos, os filogrupos mais prevalentes foram o B1 (51,0%) e o A (36,1%) (Tabela 4.3.; Figura 4.7. e Figura 4.8., ponto 4.3.6).

Tabela 4.3. Filogrupos das estirpes de *E. coli* isoladas de carne e de fezes de suínos.

Amostras	Filogrupos							
	A	B1	B2	C	D	E	F	G
Carne de suínos (n=14)	6 (42,9%)	3 (21,5%)	1 (7,1%)	2 (14,3%)	1 (7,1%)	0	1 (7,1%)	0
Fezes de suínos (n=47)	17 (36,1%)	24 (51,0%)	0	2 (4,3%)	0	2 (4,3%)	0	2 (4,3%)

4.3.4 Identificação dos serotipos de *Salmonella* spp.

No caso de *Salmonella* spp., foram identificados 3 serotipos distintos, nas carnes de suínos analisadas: *S. London* (CC10), *S. Typhimurium* (CC47) e *S. Typhimurium* monofásica (1,4,[5],12:i:-) (CC26). Os resultados da serotipagem foram confirmados pela identificação *in silico* da WGS.

4.3.5 Identificação *in silico* dos serotipos de *E. coli*

A análise *in silico* dos isolados de *E. coli* estudados por WGS, permitiu identificar o serogrupo O8 como o mais frequente, tanto nas amostras de carne (14,3%; 2/14), como nas amostras de fezes de suínos (14,9%; 7/47). Foi possível identificar uma grande diversidade de serotipos de *E. coli* em ambos os grupos de estudo (Figura 4.7. e Figura 4.8., ponto 4.3.6). No entanto, é importante destacar que não foi possível identificar o serotipo em 50,0% (7/14) dos isolados de carne e 29,8% (14/47) dos isolados de fezes de suínos, uma vez que em nenhuma das plataformas utilizadas foram identificados os antígenos somáticos. No total, foram identificados sete serotipos distintos nos isolados de carne, enquanto nas fezes de suínos foram identificados 24 serotipos. O serotipo O8:H9 foi o mais frequente nas amostras de fezes de suínos, tendo sido observado em 8,5% (4/47) dos isolados. Este serotipo, foi também identificado num dos isolados classificado como STEC (SM36). Nas amostras de carne, em nenhuma das estirpes de *E. coli* isoladas foi identificado o mesmo serotipo.

4.3.6 Identificação *in silico* da sequência tipo

Neste estudo, foram identificados 30 STs diferentes nas 47 *E. coli* isoladas de fezes de suínos. O ST101 correspondeu ao perfil mais frequente (17,0%, 8/47). Em relação aos 14 isolados alimentares, foram identificados 13 STs distintos, incluindo três novos STs, obtidos após submissão à plataforma *Enterobase*, designados como ST14764 (CC9), ST14765 (CC13) e ST14766 (CC44) (Figura 4.7. e Figura 4.8.).

Foram encontrados 3 STs comuns nas estirpes de *E. coli* isoladas de carne e de fezes de suínos: ST10, ST88, ST101.

Os três isolados de *Salmonella* spp., pertenciam ao ST155 (*S. London*), ST34 (*S. Typhimurium* monofásica) e ST19 (*S. Typhimurium*).

Amostra	Filogrupo	Serotipo	ST	CH type
CC8	A	OND:H27	3489	7-23
CC9	C	OND:H19	14764	4-54
CC10	A	OND:H2	10	11-24
CC13	A	O8:H20	14765	7-54
CC15	C	O8:H4	88	4-39
CC22	A	O5:H4	93	11-ND
CC24	D	O146:H20	5876	260-31
CC27	A	OND:H40	1115	196-86
CC28	A	O102:H40	1115	196-86
CC34	F	O83:H42	1485	231-58
CC44	B1	OND:H14	14766	6-31
CC46	B1	OND:H8	101	41-35
CC47	B2	OND:H4	131	40-161
CC48	B1	O45:H10	877	175-1767

Figura 4.7. Filogrupo, serotipo, sequência tipo e CH type (*fumC/fimH*) das estirpes de *E. coli* isoladas de carne de suínos.

CC, Carne crua; ST, Sequência tipo; O, Antígeno somático; H, Antígeno flagelar; ND, Não definido.

Amostra	Filogrupo	Serotipo	ST	CH type
SM1	B1	OND:H16	6186	29-38
SM3	A	OND:H40	542	11-398
SM5	A	O162:H10	34	11-54
SM6	A	OND:H11	10526	11-54
SM8 (1)	B1	O157:H19	763	4-31
SM8 (3)	A	O180:H51	165	27-30
SM10	B1	O137:H10	641	6-289
SM11	B1	O109:H45	542	11-398
SM12	A	O80:H26	189	27-54
SM13	A	OND:H45	1436	27-23
SM15	B1	OND:H21	101	41-86
SM16	A	OND:H4	10	11-24
SM17	A	OND:H26	206	7-ND
SM19	B1	O8:H23	5409	29-38
SM23	A	O8:H9	1139	7-54
SM26	A	O9:H4	46	7-34
SM28	B1	O86:H25	58	4-32
SM29	B1	OND:H21	101	41-1252
SM31	B1	OND:H11	295	4-1131
SM32	B1	OND:H8	101	41-86
SM36	C	O8:H9	88	4-54
SM37 (2)	B1	O8:H16	4417	6-33
SM37 (5)	B1	O45:H10	641	6-289
SM38	A	O8:H9	1139	7-54
SM39	A	OND:H37	7588	7-1067
SM50	E	O1:H28	6745	53-370
SM51	E	O1:H28	6745	53-370
SM54	B1	OND:H2	2599	6-32
SM55	A	OND:H9	11861	11-54
SM56	A	O8:H9	1139	7-54
SM65	G	OND:H4	117	45-151
SM67	A	O2:H32	10	11-23
SM68	A	OND:H11	7538	7-25
SM71	B1	O109:H40	101	41-86
SM72	B1	O109:H40	101	41-86
SM73	B1	O88:H21	101	41-86
SM74	B1	O109:H40	101	41-86
SM76	B1	O110:H2	187	69-86
SM78	B1	O166:H49	1246	4-87
SM79	B1	O29:H10	1720	270-54
SM80	B1	OND:H4	642	23-31
SM90 (1)	C	O8: H19	88	4-27
SM90 (3)	A	OND:H30	542	11-1080
SM91	B1	OND:H10	101	41-86
SM92	B1	OND:H25	11165	4-25
SM96	B1	OND:H16	6186	29-38
SM99	G	OND:H4	117	45-151

Figura 4.8. Filogrupo, serotipo, sequência tipo e CH type (*fumC/fimH*) das estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de suínos.

SM, Suínos Matadouro; ST, Sequência tipo; O, Antígeno somático; H, Antígeno flagelar; ND, Não definido.

4.3.7 Previsão *in silico* da patogenicidade para o Homem

Através da ferramenta *PathogenFinder*, foi possível obter para todos os isolados de *E. coli* uma previsão *in silico* da sua patogenicidade para o Homem. Todos os isolados em estudo apresentaram uma probabilidade superior a 92,5% (92,5%-94,5%) de serem patogênicos para o ser humano.

No caso dos três isolados de *Salmonella* spp., esta ferramenta não foi utilizada, uma vez que esta bactéria é sempre patogénica para o Homem.

4.3.8 Identificação fenotípica de resistência a antibióticos

A análise dos resultados obtidos nos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados nos isolados de *E. coli*, permitiu constatar que 75,0% (27/36) dos isolados de carne e 71,8% (74/103) dos isolados de fezes de suínos foram resistentes aos antibióticos testados, dos quais 40,7% (11/27) e 51,4% (38/74), respetivamente, foram multirresistentes.

A resistência à tetraciclina (41,7% nos isolados de carne e 55,3% nos isolados de fezes de suínos), ampicilina (38,9% nos isolados de carne e 48,5% nos isolados de fezes de suínos) e sulfametoxazol (41,7% nos isolados de carne e 35,9% nos isolados de fezes de suínos) foram as mais frequentes, de acordo com o gráfico apresentado na **Figura 4.9**. A resistência às cefalosporinas de 3^a e 4^a geração (cefotaxima e cefepima) e à azitromicina foi baixa (entre 0,0-2,9%) em ambos os grupos de estudo. A resistência às fluoroquinolonas (ácido nalidíxico e ciprofloxacina) variou entre 3,9% nos isolados de carne e 16,7% nos isolados de fezes. Todos os isolados de *E. coli* foram suscetíveis à ceftazidima, meropenem e tigeciclina.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na resistência a nenhum dos antibióticos testados entre as estirpes de *E. coli* isoladas de amostras de carne e de amostras de fezes de suínos ($p>0,05$).

Os vários padrões de multirresistência observados para os isolados de *E. coli*, encontram-se apresentados na **Tabela 4.4**. Nos isolados de carne de suínos, foram identificados sete perfis de multirresistência, sendo os mais frequentes: AMP-TET-SMX (27,2%), AMP-TET-SMX-TMP (18,2%) e AMC-AMP-TET-CHL-SMX-TMP (18,2%). Os restantes padrões de multirresistência, observados em isolados de carne, foram identificados em apenas uma estirpe cada. Nos isolados de fezes de suínos, foram identificados 20 perfis de multirresistência, sendo os mais frequentes: AMP-TET-SMX-TMP (15,8%), AMP-TET-SMX (7,9%), AMP-TET-CHL-SMX (7,9%) e AMP-AZM-NAL-SMX-TMP (7,9%).

No caso de *Salmonella* spp., foram observadas resistências em duas (66,7%; 2/3) das estirpes analisadas, as quais apresentaram um perfil de multirresistência. O isolado **CC10**, *S. London*, foi completamente suscetível, enquanto o isolado **CC26**, *S. Typhimurium* monofásica,

foi resistente à ampicilina, tetraciclina e sulfametoxazol e o isolado **CC47**, *S. Typhimurium*, foi resistente à ampicilina, cloranfenicol, sulfametoxazol e trimetoprim.

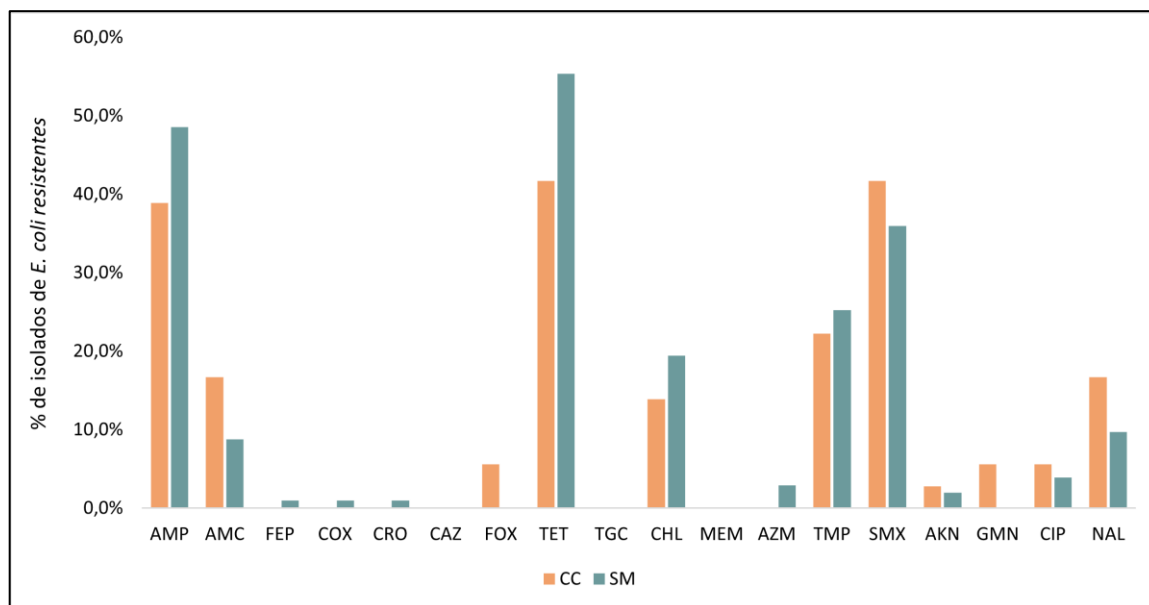


Figura 4.9. Perfil de resistência aos antibióticos testados nas estirpes de *E. coli* isoladas de carne (n=36) e de fezes de suínos (n=103).

SM, Suínos Matadouro; CC, Carne Crua; AMP, Ampicilina; AMC, Amoxicilina-Ácido clavulânico; FEP, Cefepima; COX, Cefotaxima; CRO, Ceftriaxona; CAZ, Ceftazidima; FOX, Cefoxitina; TET, Tetraciclina; TGC, Tigeciclina; CHL, Cloranfenicol; MEM, Meropenem; AZM, Azitromicina; TMP, Trimetoprim; SMX, Sulfametoxazol; AKN, Amicacina; GMN, Gentamicina; CIP, Ciprofloxacina; NAL, Ácido nalidíxico.

Tabela 4.4. Perfis de multirresistência observados nas estirpes de *E. coli* isoladas de carne e de fezes de suínos.

	Carne de suínos (n=11)	Fezes de suínos (n=38)
Perfis de multirresistência	Nº isolados (%)	Nº isolados (%)
AMP-TET-SMX	3 (27,2%)	3 (7,9%)
AMP-TET-SMX-TMP	2 (18,2%)	6 (15,8%)
AMC-AMP-TET-CHL-SMX-TMP	2 (18,2%)	2 (5,3%)
AMP-TET-CHL-SMX-TMP	1 (9,1%)	2 (5,3%)
AMP-TET-CIP-NAL-SMX-TMP	1 (9,1%)	1 (2,6%)
TET-CHL-NAL-SMX	1 (9,1%)	0
AMP-TET-CHL-NAL-SMX-TMP	1 (9,1%)	0
AMP-AZM-NAL-SMX-TMP	0	3 (7,9%)
AMP-TET-CHL-SMX	0	3 (7,9%)
AMC-AMP-TET-SMX-TMP	0	2 (5,3%)
AMP-TET-CHL-TMP	0	2 (5,3%)
TET-CHL-SMX-TMP	0	2 (5,3%)
AMP-TET-NAL-SMX	0	2 (5,3%)
AMP-TET-CHL	0	2 (5,3%)
AMP-COX-CRO-FEP-SMX-TMP	0	1 (2,6%)
AMP-TET-CHL-CIP-SMX-TMP	0	1 (2,6%)
AMP-TET-CIP-NAL-SMX	0	1 (2,6%)
AMP-TET-NAL-SMX-TMP	0	1 (2,6%)
AMC-AMP-TET-CHL	0	1 (2,6%)
CHL-CIP-NAL-SMX	0	1 (2,6%)
AMP-CHL-SMX	0	1 (2,6%)
AMP-TET-TMP	0	1 (2,6%)

Os perfis de resistência que se encontram realçados com uma cor cinzenta representam os perfis comuns aos isolados de carne e de fezes de suínos. AMP, Ampicilina; FOX, Cefoxitina; COX, Cefotaxima; CRO, Ceftriaxona; FEP, Cefepima; TET, Tetraciclina; CHL, Cloranfenicol; AZM, Azitromicina; CIP, Ciprofloxacina; NAL, Ácido nalidíxico; SMX, Sulfametoxazol; TMP, Trimetoprim.

4.3.9 Identificação de genes de resistência e relação com o perfil de resistência fenotípica

Os genes de resistência identificados nos isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp. que foram sequenciados estão apresentados nas Figuras 4.10. a 4.12.

No que se refere aos isolados de *E. coli*, associado à resistência preditiva para os antibióticos da classe das penicilinas, nomeadamente para a ampicilina, o gene mais prevalente foi o *bla*_{TEM-1B}, identificado em 57,1% (8/14) dos isolados de carne e em 63,8% (30/47) dos isolados de fezes de suínos. Para a tetraciclina, o gene *tet*(A) foi identificado em 92,9% (13/14) dos isolados de carne e em 53,2% (25/47) dos isolados de fezes de suínos. Quanto à resistência preditiva para o sulfametoxazol, o gene *sul3* foi identificado em 42,9% (6/14) dos isolados de carne e em 38,3% (18/47) dos isolados de fezes de suínos, enquanto o gene *sul2* foi encontrado em 35,7% (5/14) dos isolados de carne e em 36,2% (17/47) dos isolados de fezes de suínos. Para o trimetoprim, foram identificados os genes *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA8*, *dfrA12*, *dfrA14* e *dfrA17*. A maior proporção foi associada ao gene *dfrA1*, identificado em 35,7% (5/14) dos isolados de carne e em 17,0% (8/47) dos isolados de fezes de suínos, e ao gene *dfrA12*, identificado em 14,3% (2/14) dos isolados de carne e em 19,1% (9/47) dos isolados de fezes de suínos.

Associado à classe das fluoro(quinolonas), o gene plasmídico *qnr* foi identificado em 14,3% (2/14) dos isolados de carne e em 17,0% (8/47) dos isolados de fezes de suínos. Relativamente às mutações pontuais, elas foram identificadas no gene *gyrA* em 28,6% (4/14) dos isolados de carne e em 21,3% (10/47) dos isolados de fezes de suínos, no gene *parC* em 14,3% (2/14) dos isolados de carne e em 4,3% (2/47) dos isolados de fezes de suínos, e no gene *parE* em 7,1% (1/14) dos isolados de fezes de suínos. Associado à resistência preditiva aos macrólidos, foram identificados os genes *mef*(B) e *mef*(C) em 8,5% (4/47) dos isolados de fezes de suínos, o gene *mph*(G) em 6,4% (3/47) dos isolados de fezes de suínos e o gene *mph*(B) em 7,1% (1/14) dos isolados de carne.

Nenhum dos isolados de *E. coli* ou *Salmonella* spp. em estudo apresentou genes de resistência à colistina, tal como previamente observado após PCR.

É importante salientar que foram identificados genes de resistência à classe dos aminoglicosídeos: *aadA1*, *addA2*, *addA2b*, *aadA5*, *aadA12*, *aac*(6')-Iaa, *aph*(3'')-Ib e *aph*(6)-Id e dos fenicóis: *catA2*, *cml*, *cmlA1*, *floR*.

Foram igualmente identificados os genes *qacE* e *qacL*, que conferem resistência a compostos de amónio quaternário (antissépticos), o *Inu*(F), associado à resistência às lincosamidas, o *erm*(42) que confere resistência às estreptograminas, o *fosA7*, que confere resistência às fosfomicinas, e o *sitABCD*, que confere resistência aos peróxidos.

De entre os diversos genes *bla* identificados, e que codificam a produção de β-lactamases (encontrados 14 genes diferentes), é de salientar a presença de genes associados a ESBLs em

E. coli e *Salmonella* spp. isoladas de carne e fezes de suínos (realçados a negrito nas Tabelas 4.5., 4.6. e 4.7.). Nas amostras de carne, foi identificado um isolado de *E. coli* com os genes *bla*_{TEM-207} e *bla*_{TEM-230} (CC9) e um isolado de *Salmonella* spp. com os genes ESBL *bla*_{TEM-106} e *bla*_{TEM-126} (CC47). Nas amostras de fezes de suínos foi identificado o gene *bla*_{CTX-M-1} (SM76). Na amostra CC9 foi também identificado o gene *bla*_{TEM-30}, associado à produção de β-lactamases resistentes aos inibidores.

Todos os perfis de resistência a antibióticos observados nos TSA, previamente realizados, foram apoiados pela análise genômica dos isolados sequenciados (Tabela 4.5., 4.6. e 4.7.).

Amostra	Perfil fenotípico			Genes de resistência																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
				Aminoglicosídeos						β-lactâmicos						Fluoro(Quinolonas)		Macrólidos	Fenicolis	Tetraciclinas	Antagonistas de via do folato			Compostos de amônio quaternário	Peróxidos																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	Suscetível	Resistente	Multiresistente	<i>aadA1</i> <i>aadA2</i> <i>aadA2b</i> <i>aadA12</i> <i>aph(3'')-Ib</i> <i>aph(6)-Id</i>	<i>bla</i> TEM-1A <i>bla</i> TEM-1B <i>bla</i> TEM-1C <i>bla</i> TEM-30 <i>bla</i> TEM-104 <i>bla</i> TEM-176 <i>bla</i> TEM-198 <i>bla</i> TEM-207 <i>bla</i> TEM-217 <i>bla</i> TEM-230 <i>bla</i> TEM-234	<i>gyrA</i> (p.S83L) <i>gyrA</i> (p.D87N) <i>parC</i> (p.S80I) <i>parE</i> (p.I529L) <i>qnrS1</i>	<i>mph(B)</i>	<i>cml</i> <i>cmlA1</i> <i>floR</i>	<i>tet(A)</i> <i>dfrA1</i> <i>dfrA8</i> <i>dfrA12</i> <i>dfrA14</i> <i>sul1</i> <i>sul2</i> <i>sul3</i>	<i>qacL</i>	<i>strABCD</i>																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
CC8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												

Figura 4.10. Genes de resistência a antimicrobianos e mutações pontuais identificados nas estirpes de *E. coli* isoladas de carne de suínos.

Quadrados cor-de-laranja indicam a presença do gene de resistência ou mutações pontuais preditivas da resistência antimicrobiana. CC, Carne Crua.

Amostra	Perfil fenotípico			Genes de resistência													
				Aminoglicosídeos	β-lactâmicos	Fluro(Quinolonas)	Fenicóis	Tetraciclínas	Antagonistas da via do folato								
	Suscetível	Resistente	Multiresistente														
	<i>aac(6')-Iaa</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>aph(6)-Id</i>							<i>aadA1</i>	<i>aadA2</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>bla</i> _{TEM-106}	<i>bla</i> _{TEM-126}	<i>bla</i> _{TEM-135}	<i>bla</i> _{TEM-220}	<i>parC</i> (p.T57S)
CC10																	
CC26																	
CC47																	
Nº de vezes que os genes surgem nos isolados				0	1	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Figura 4.11. Genes de resistência a antimicrobianos e mutações pontuais identificados nas estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de carne de suínos.

Quadrados cor-de-laranja indicam a presença do gene de resistência ou mutações pontuais preditivas da resistência antimicrobiana. CC, Carne Crua.

Tabela 4.5. Perfil de resistência (fenotípico *versus* genotípico) das estirpes de *E. coli* isoladas de carne de suínos.

Amostra	Patotipo	Resistência fenotípica (TSA)	Genes de resistência (WGS)
CC8	ExPEC	CIP-NAL-SMX	<i>gyrA</i> (p.S83L), <i>gyrA</i> (p.D87N), <i>parC</i> (p.S80I), <i>sul3</i>
CC9		AMC-AMP-TET-CHL-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM} -1B, <i>bla</i> _{TEM} -30, <i>bla</i> _{TEM} -176, <i>bla</i> _{TEM} -104, <i>bla</i> _{TEM} -198, <i>bla</i>_{TEM}-207 , <i>bla</i> _{TEM} -217, <i>bla</i>_{TEM}-230 , <i>bla</i> _{TEM} -234, <i>tet(A)</i> , <i>cmlA1</i> , <i>floR</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA8</i>
CC10		AMC-AMP-TET-CHL-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM} -1B, <i>tet(A)</i> , <i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
CC13		AMP-TET-SMX	<i>bla</i> _{TEM} -1B, <i>tet(A)</i> , <i>sul3</i>
CC15		AMC-AMP-TET	<i>bla</i> _{TEM} -1C, <i>tet(A)</i>
CC22		AMP-TET-SMX	<i>bla</i> _{TEM} -1B, <i>tet(A)</i> , <i>sul1</i>
CC24		TET-CHL-NAL-SMX	<i>tet(A)</i> , <i>cmlA1</i> , <i>gyrA</i> (p.S83L), <i>sul3</i>
CC27		AMP-TET-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM} -1B, <i>tet(A)</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrA1</i>
CC28		AMP-TET-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM} -1B, <i>tet(A)</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrA1</i>
CC34		AMP-TET-CIP-NAL-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM} -1B, <i>tet(A)</i> , <i>gyrA</i> (p.S83L), <i>gyrA</i> (p.D87N), <i>parC</i> (p.S80I), <i>sul2</i> , <i>dfrA14</i>
CC44		TET-SMX-TMP	<i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA14</i>
CC46		AMP-TET-SMX	<i>bla</i> _{TEM} -1B, <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i>
CC47		AMP-TET-NAL-CHL-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM} -1C, <i>tet(A)</i> , <i>gyrA</i> (p.S83L), <i>parE</i> (p.I529L), <i>cmlA1</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA12</i>
CC48		AMP-TET-CHL-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM} -1A, <i>tet(A)</i> , <i>cml</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA1</i>

Genes ESBL encontram-se realçados a negrito. CC, Carne crua; TSA, Teste de suscetibilidade a antibióticos; WGS, Sequenciação completa do genoma; ExPEC, *E. coli* patogénica extraintestinal; AMP, Ampicilina; TET, Tetraciclina; CHL, Cloranfenicol; CIP, Ciprofloxacina; NAL, Ácido nalidíxico; SMX, Sulfametoxazol; TMP, Trimetoprim.

Tabela 4.6. Perfil de resistência (fenotípico *versus* genotípico) das estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de suínos.

Amostra	Patotipo	Resistência fenotípica (TSA)	Genes de resistência (WGS)
SM1	ExPEC	AMC-AMP-TET-CHL-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{TEM-1C} , <i>tet(A)</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA14</i>
SM3	ExPEC	AMP-TET-CHL-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>cmlA1</i> , <i>floR</i> , <i>dfrA12</i>
SM5	ExPEC	AMP-TET-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA1</i>
SM6	ExPEC	AMP-TET-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA1</i>
SM8 (1)	ETEC	Suscetível	Sem genes
SM8 (3)	ExPEC	TET-CHL-SMX-TMP	<i>tet(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>cmlA1</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA12</i>
SM10	ETEC	TET	<i>tet(A)</i>
SM11	ExPEC	AMP-TET-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA1</i>
SM12	ExPEC	TET-CHL-SMX-TMP	<i>tet(A)</i> , <i>cmlA1</i> , <i>floR</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA12</i>
SM13	ExPEC	AMP-TET-SMX	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(B)</i> , <i>sul3</i>
SM15	ExPEC	AMP-TET-CHL	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(B)</i> , <i>floR</i>
SM16	ExPEC	AMP-TET-CHL-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>tet (M)</i> , <i>cmlA1</i> , <i>floR</i> , <i>dfrA12</i>
SM17	ExPEC	AMC-AMP-TET-CHL	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(B)</i> , <i>floR</i>
SM19	ExPEC	AMC-AMP-TET-CHL-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>cmlA1</i> , <i>floR</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA12</i>
SM23	ExPEC	AMP-TET-CIP-NAL-SMX	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(B)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>gyrA</i> (p.S83A), <i>sul3</i>
SM26	ExPEC	AMC-AMP-TET-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1A} , <i>tet(A)</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA1</i>
SM28	ExPEC	TET	<i>tet(B)</i>
SM29	ExPEC	AMP-TET-NAL-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>gyrA</i> (p.D87Y), <i>sul2</i> , <i>dfrA14</i> , <i>dfrA17</i>
SM31	ExPEC	AMP-CHL-SMX	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>floR</i> , <i>sul2</i>
SM32	ETEC	TET	<i>tet(A)</i>
SM36	STEC	Suscetível	Sem genes
SM37 (2)	ExPEC	AMC-AMP-TET-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(B)</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrA1</i>
SM37 (5)	ETEC	TET	<i>tet(A)</i>
SM38	ExPEC	AMP-TET-NAL-SMX	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>gyrA</i> (p.S83A), <i>sul3</i>
SM39	ExPEC	AMP-TET-CHL-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(B)</i> , <i>cmlA1</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA12</i>

SM, Suínos Matadouro; TSA, Teste de suscetibilidade a antibióticos; WGS, Sequenciação completa do genoma; STEC, *E. coli* produtora de toxina Shiga; ETEC, *E. coli* enterotoxigénica; ExPEC, *E. coli* patogénica extraintestinal; AMP, Ampicilina; FOX, Cefoxitina; COX, Cefotaxima; CRO, Ceftriaxona; FEP, Cefepima; TET, Tetraciclina; CHL, Cloranfenicol; AZM, Azitromicina; CIP, Ciprofloxacina; NAL, Ácido nalidíxico; SMX, Sulfametoxazol; TMP, Trimetoprim.

Tabela 4.6. Perfil de resistência (fenotípico *versus* genotípico) das estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de suínos (continuação).

Amostra	Patotipo	Resistência fenotípica (TSA)	Genes de resistência (WGS)
SM50	ExPEC	AMP-TET-CHL-SMX	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>cmlA1</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>
SM51	ExPEC	AMP-TET-CHL-SMX	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i>
SM54	ExPEC	AMP-TET-CIP-NAL-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>gyrA</i> (p.S83L), <i>gyrA</i> (p.D87N), <i>parC</i> (p.S80I), <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA17</i>
SM55	ExPEC	AMP-TET-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1A} , <i>tet(B)</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA1</i>
SM56	ExPEC	AMP-TET-NAL-SMX	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(B)</i> , <i>gyrA</i> (p.S83A), <i>sul3</i>
SM65	ExPEC	AMP-TET-SMX	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>sul1</i>
SM67	ExPEC	AMP-TET-CHL-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>catA2</i> , <i>cmlA1</i> , <i>floR</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA12</i>
SM68	ExPEC	AMP-TET-CHL-CIP-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>cmlA1</i> , <i>qnrS1</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA12</i>
SM71	ExPEC	AMP-AZM-NAL-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>mef(C)</i> , <i>mph(G)</i> , <i>gyrA</i> (p.S83L), <i>sul2</i> , <i>dfrA5</i>
SM72	ExPEC	AMP-AZM-NAL-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>mef(C)</i> , <i>mph(G)</i> , <i>gyrA</i> (p.S83L), <i>sul2</i> , <i>dfrA5</i>
SM73	ExPEC	AMP-TET-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1A} , <i>tet(B)</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA5</i>
SM74	ExPEC	AMP-AZM-NAL-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>mef(C)</i> , <i>mph(A)</i> , <i>mph(G)</i> , <i>gyrA</i> (p.S83L), <i>sul2</i> , <i>dfrA5</i>
SM76	ExPEC	AMP-COX-CRO-FEP-SMX-TMP	<i>bla</i>_{CTX-M-1} , <i>sul2</i> , <i>dfrA17</i>
SM78	ExPEC	AMP-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>sul2</i> , <i>dfrA5</i>
SM79	ExPEC	AMP-TET-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1A} , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA8</i>
SM80	ExPEC	AMP-TET-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA14</i>
SM90 (1)	STEC	AMP-TET-CHL	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(A)</i> , <i>floR</i>
SM90 (3)	ExPEC	AMP-TET-SMX	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(B)</i> , <i>sul3</i>
SM91	ExPEC	CHL-CIP-NAL-SMX	<i>floR</i> , <i>qnrS1</i> , <i>gyrA</i> (p.S83L), <i>sul2</i>
SM92	ExPEC	CHL-SMX	<i>floR</i> , <i>sul2</i>
SM96	ExPEC	AMP-TET-CHL-SMX	<i>bla</i> _{TEM-1C} , <i>tet(A)</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i>
SM99	ExPEC	NAL-SMX-TMP	<i>gyrA</i> (p.S83L), <i>sul3</i> , <i>dfrA1</i>

Genes ESBL encontram-se realçados a negrito. SM, Suínos Matadouro; TSA, Teste de suscetibilidade a antibióticos; WGS, Sequenciação completa do genoma; STEC, *E. coli* produtora de toxina Shiga; ETEC, *E. coli* enterotoxigénica; ExPEC, *E. coli* patogénica extraintestinal; AMP, Ampicilina; FOX, Cefoxitina; COX, Cefotaxima; CRO, Ceftriaxona; FEP, Cefepima; TET, Tetraciclina; CHL, Cloranfenicol; AZM, Azitromicina; CIP, Ciprofloxacina; NAL, Ácido nalidíxico; SMX, Sulfametoxazol; TMP, Trimetoprim.

Tabela 4.7. Perfil de resistência (fenotípico *versus* genotípico) das estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de carne de suínos.

Amostra	Serotipo	Resistência fenotípica (TSA)	Genes de resistência (WGS)
CC10	London	Suscetível	<i>parC</i> (p.T57S)
CC26	<i>S. Typhimurium</i> monofásica	AMP-TET-SMX	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(B)</i> , <i>sul2</i>
CC47	Typhimurium	AMP-CHL-SMX-TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i>_{TEM-106} , <i>bla</i>_{TEM-126} , <i>bla</i>_{TEM-135} , <i>cmlA1</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA12</i>

Genes ESBL encontram-se realçados a negrito. CC, Carne crua; TSA, Teste de suscetibilidade a antibióticos; WGS, Sequenciação completa do genoma; AMP, Ampicilina; TET, Tetraciclina; CHL, Cloranfenicol; NAL, Ácido nalidíxico; PEF, Pefloxacina; SMX, Sulfametoxazol; TMP, Trimetoprim.

4.3.10 Identificação de plasmídeos

Nas estirpes de *E. coli* isoladas de carne e fezes de suínos foram identificados plasmídeos pertencentes aos grupos de incompatibilidade I (IncI), F (IncF), B/O/K/Z (IncB/O/K/Z), X (IncX) e do grupo Col (Col, ColE10, Col156) (**Figura 4.13.**). Os plasmídeos mais frequentes foram o IncFIB (57,1% dos isolados de carne e 59,6% dos isolados de fezes de suínos), o IncFII (50,0% dos isolados de carne e 46,8% dos isolados de fezes de suínos), e o IncX1 (21,4% dos isolados de carne e 34,0% dos isolados de fezes de suínos).

No caso de *Salmonella* spp. isoladas de carne de suínos, foram identificados os plasmídeos IncQ1 e p0111 no isolado **CC26** (*S. Typhimurium* monofásica), e os plasmídeos IncFII(S) e IncX1 no isolado **CC47** (*S. Typhimurium*). Não foram identificados plasmídeos no isolado **CC10** (*S. London*).

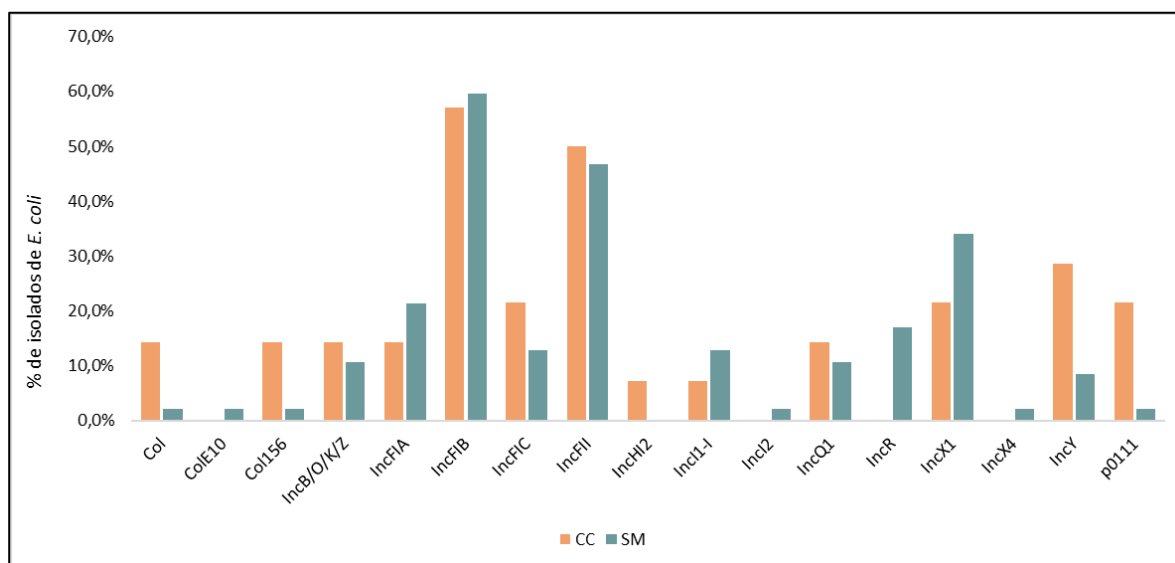


Figura 4.13. Plasmídeos identificados nas estirpes de *E. coli* isoladas de carne e de fezes de suínos.

CC, Carne crua; SM, Suínos Matadouro.

4.4 Análise Filogenética

De modo a avaliar a relação genética entre as estirpes de *E. coli* isoladas de matrizes alimentares (carne de suínos) e matrizes animais (fezes de suínos), realizou-se uma *minimum spanning tree* baseada no cgMLST de todos os isolados (**Figura 4.14.**). A análise do cgMLST dos 14 isolados de carne de suínos e 47 isolados de fezes de suínos, considerando um *threshold* de 0,28% diferenças alélicas (sete diferenças alélicas em 2513 *loci*), revelou a presença de quatro *clusters*, abrangendo nove ExPEC, de quatro STs diferentes. O *cluster* 1 integrou dois isolados de carne, enquanto os *clusters* 2, 3 e 4 integraram apenas isolados de fezes de suínos. Na **Figura 4.15.** estão agregadas algumas informações sobre os isolados ExPEC incluídos nos diferentes *clusters*. Foi observada concordância no que se refere ao filogruppo, ST, serotipo, genes de virulência e genes de resistência entre as estirpes de *E. coli* de cada *cluster*. Os *clusters* 1, 2 e 4 integraram isolados de amostras que pertenciam ao mesmo produtor de carne ou exploração de suínos. Por outro lado, o *cluster* 3 integrou dois isolados de fezes de suínos provenientes de explorações diferentes.

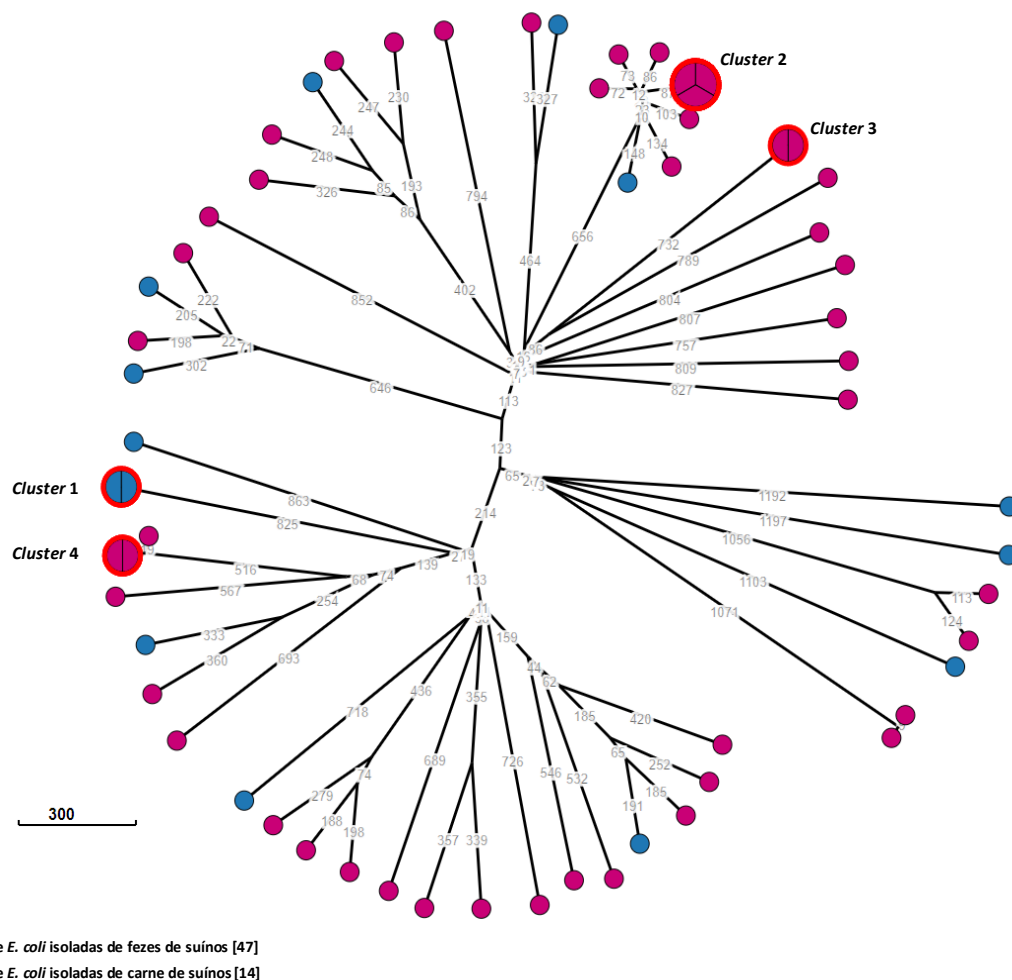


Figura 4.14. Análise filogenética (*minimum spanning tree*) de *E. coli*, baseada no cgMLST dos 14 isolados de carne e 47 isolados de fezes de suínos, utilizando o esquema *cgMLST V1 + HierCC V1* com 2513 *loci*, disponível na plataforma *Enterobase*.

Os números apresentados nos ramos representam diferenças alélicas entre os isolados. Os *clusters*, formados com ≤ 7 diferenças alélicas entre os isolados, encontram-se realçados a vermelho. O tamanho dos *clusters* é proporcional ao número de isolados neles integrados.

No que se refere aos isolados de *Salmonella* spp. das amostras de carne, com o intuito de comparar e correlacionar os resultados obtidos com os perfis de *Salmonella* spp. (clínicos, alimentares e animais) identificados a nível nacional e internacional e disponíveis na plataforma *Enterobase*, gerou-se uma árvore filogenética baseada no cgMLST de *S. London* isoladas no ano de 2023, considerando um *threshold* de 0,23% diferenças alélicas (sete diferenças alélicas em 3002 *loci*) (Figura 4.16.). No total foram identificados 28 isolados de *S. London*: 16 isolados de França e sete isolados dos Estados Unidos de fonte desconhecida, três isolados de Portugal (um isolado clínico, um isolado de fonte desconhecida e o isolado do presente trabalho) e dois isolados clínicos do Canadá. A análise do cgMLST das *S. London* revelou a presença de dois *clusters* integrando cinco isolados de França. O isolado em estudo não integrou nenhum *cluster*.

A par disso, foi gerada uma árvore filogenética com isolados internacionais clínicos, alimentares e animais de *S. Typhimurium* e *S. Typhimurium* monofásica isoladas no ano de 2023. No entanto, devido ao elevado número de isolados disponíveis na plataforma *Enterobase* (n=879), as relações filogenéticas entre as mesmas ficaram impercetíveis. Houve também uma tentativa de efetuar uma análise filogenética apenas com isolados clínicos de *S. Typhimurium* e *S. Typhimurium* monofásica de Portugal em 2023, mas no *Enterobase* não estavam disponíveis sequências para proceder à comparação.

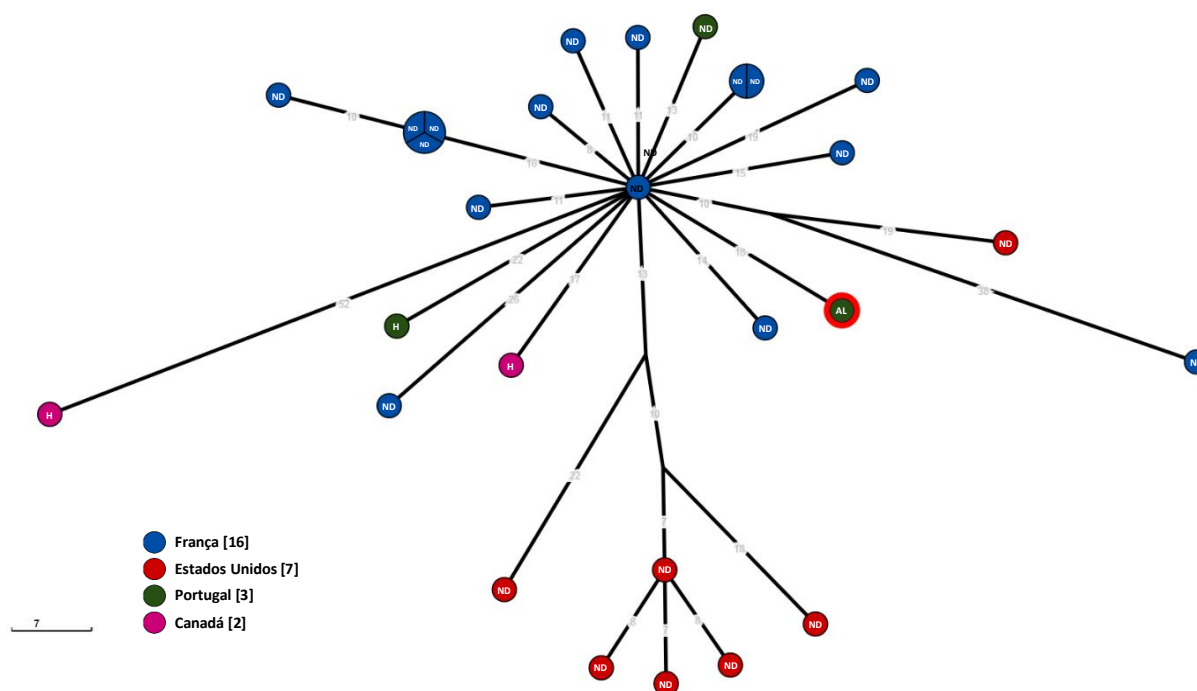


Figura 4.16. Análise filogenética (*minimum spanning tree*) de *Salmonella* London, baseada no cgMLST de 28 isolados de França, Estados Unidos, Portugal e Canadá, utilizando o esquema *cgMLST V2 + HierCC V1*, com 3002 *loci*, disponível na plataforma *Enterobase*.

Os números apresentados nos ramos representam diferenças alélicas entre os isolados. Os *clusters* são formados com ≤ 7 diferenças alélicas entre os isolados. O tamanho dos *clusters* é proporcional ao número de isolados neles integrados. A estirpe de *Salmonella* London isolada de carne de suínos no presente estudo encontra-se realçada a vermelho.

DISCUSSÃO DE RESULTADOS

As doenças de origem alimentar constituem um grave problema de saúde pública a nível mundial. Os animais produtores de alimentos são considerados uma das principais fontes dessas doenças, devido à contaminação de produtos alimentares, como a carne, por bactérias patogénicas e resistentes a antimicrobianos, nomeadamente por *E. coli* e *Salmonella* spp.

No presente trabalho, foram analisadas 100 amostras de fezes de suínos, produzidos para consumo humano, colhidas em diferentes matadouros, e 52 amostras de carne de porco crua de origem portuguesa, um dos produtos alimentares mais consumidos em Portugal, adquiridas em diversas superfícies comerciais. As estirpes de *E. coli* e *Salmonella* spp. isoladas foram posteriormente caracterizadas do ponto de vista fenotípico e genotípico. Paralelamente, foi avaliada a qualidade microbiológica das amostras de carne crua para consumo, para as duas bactérias em estudo.

De acordo com os parâmetros de qualidade microbiológica definidos neste estudo, 7,7% das amostras (correspondente a quatro amostras) foram classificadas como insatisfatórias no que diz respeito à contagem de *E. coli* (ufc/g) e 5,8% (correspondente a três amostras) no referente à pesquisa de *Salmonella* spp. Destas sete amostras, 57,1% tinham origem na região de Lisboa e Vale do Tejo, enquanto nas restantes três amostras não foi possível identificar a origem. No que respeita à avaliação da qualidade microbiológica de carne de porco crua relativamente à presença de *E. coli* e *Salmonella* spp., os estudos são escassos. Ainda assim, num estudo realizado na região Norte de Portugal, referente à avaliação da qualidade microbiológica de carne embalada em aproximação do fim do prazo de validade, todas as amostras de carne de porco crua e produtos à base de carne de porco analisadas apresentaram qualidade microbiológica satisfatória relativamente à presença destas bactérias (Maio *et al.*, 2020). De igual modo, num estudo realizado na Alemanha, em que foram analisadas amostras de carne de porco crua adquiridas em 2014 em superfícies comerciais de diversos países, a contagem

de *E. coli* demonstrou estar dentro dos parâmetros satisfatórios para todas as amostras (Schill *et al.*, 2017).

No presente estudo foram isoladas *E. coli* e *Salmonella* spp. em, respetivamente, 69,2% e 5,8% amostras de carne de suíno analisadas. A proporção de *E. coli* isoladas foi semelhante à referida por Kanokudom *et al.* (2021) na Tailândia (68,0%) e Bantawa *et al.* (2018) no Nepal (60,0%), e ligeiramente superior à referida por Martínez-Vázquez *et al.* (2018) no México (57,7%). No que se refere à proporção de *Salmonella* spp., esta foi substancialmente inferior ao encontrado por Zhang *et al.*, 2018 (73,1%), num estudo realizado em carne de suíno e produtos derivados na China. Outros estudos têm referido prevalências de *Salmonella* spp. mais baixas, que variam entre 22,6% na Roménia (Tîrziu *et al.*, 2020), 6,3% no Brasil (Gomes *et al.*, 2022) e 5,7% em Itália (Gambino *et al.*, 2022), esta última muito próxima da frequência detetada no presente estudo.

A proporção de *E. coli* e *Salmonella* spp. encontrada nas amostras em estudo sugere uma gestão sanitária de baixa qualidade, que poderá estar associada ao incumprimento das boas práticas de higiene no fabrico, distribuição e comercialização da carne (Martínez-Vázquez *et al.*, 2018). Em particular, o processo de preparação (corte) da carne crua disponível nas diversas superfícies comerciais pode constituir uma fonte de contaminação e consequentemente da sua menor qualidade microbiológica (Manyi-Loh & Lues, 2023). A presença de amostras de carne crua de qualidade microbiológica não satisfatória neste trabalho constitui um alerta, não só para os operadores do setor alimentar, como também para os consumidores. Embora se considere que o tratamento térmico da carne destrói as bactérias *Salmonella* spp. e *E. coli* patogénicas que possam estar presentes, a confeção inadequada da carne, a falta de higiene por parte dos manipuladores e a contaminação cruzada entre alimentos crus e cozinhados, bem como entre superfícies ou utensílios que entram em contacto com a carne crua, podem aumentar a propagação destas bactérias (Dang-Xuan *et al.*, 2018; Martínez-Vázquez *et al.*, 2018).

De salientar que existem várias medidas que visam prevenir e minimizar o surgimento de contaminações ao longo da cadeia alimentar, como o plano de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP). A implementação e atualização deste plano é obrigatória nas empresas do setor alimentar em toda a Europa, incluindo Portugal (Regulamento (CE) n.º 853/2004, 2004).

Relativamente às amostras fecais de suínos produzidos para consumo humano, à semelhança do identificado na Tailândia em 2021 por Kanokudom *et al.*, foi possível isolar *E. coli* em todas as amostras analisadas. Estes dados estão de acordo com o esperado, já que a bactéria *E. coli* faz parte da flora intestinal deste animal. Apesar de diversos estudos reportarem a presença de *Salmonella* spp. em fezes de suínos produzidos para consumo (47,5% na Tailândia, Chonsin *et al.*, 2021; 52,4% em Espanha, Marín *et al.*, 2020) e em carcaças de suínos colhidas

em ambiente de matadouro (21,0%, Costa *et al.*, 2023 e 7,3%, Moura-Alves *et al.*, 2022, ambos em Portugal; 11,5% na Irlanda, Deane *et al.*, 2022), neste estudo não foi isolada *Salmonella* spp. em nenhuma amostra. Embora em Portugal estejam implementados programas nacionais de controlo de *Salmonella* spp. em bandos de reprodução, bandos de galinhas poedeiras, bandos de perus e em frangos (DGAV, 2021b), até à data não estão implementados programas de controlo com o objetivo de reduzir a prevalência de *Salmonella* spp. nas explorações suínas. Não obstante, a nível do matadouro e para carcaças de suínos, o Regulamento (CE) n.º 1441/2007 da Comissão, de 5 de dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005, estipula que a deteção de *Salmonella* spp. deve ser utilizada como critério de higiene de processos. Assim, segundo este regulamento, a deteção de *Salmonella* spp. nas carcaças de suínos implica a aplicação de medidas corretivas por parte dos operadores das empresas do setor alimentar. Estas incluem não só a melhoria das práticas de higiene durante o abate, como também a revisão dos controlos dos processos e das medidas de biossegurança nas explorações de origem (Regulamento (CE) n.º 2073/2005, 2005; Regulamento (CE) n.º 1441/2007, 2007), o que poderá explicar a baixa prevalência de *Salmonella* spp., nas fezes de suínos colhidas em matadouro do presente estudo.

Neste estudo, a identificação de *E. coli* patogénicas foi efetuada com base nos resultados obtidos por PCR e/ou por WGS. Apesar de não terem sido submetidas a WGS todas as *E. coli* isoladas, para efeitos deste estudo foram consideradas como não patogénicas as que obtiveram PCR negativo e que não foram sequenciadas.

Enquanto nos isolados de carne de suínos não foram identificadas IPEC, nas amostras de fezes de suínos foram identificados os patótipos STEC e ETEC, respetivamente em 1,9% e 3,9% dos isolados.

Foram identificados dois isolados STEC nas amostras de fezes de suínos, que continham o gene *stx2*, mas não o gene *eae*. Esta combinação de genes correspondeu a uma das mais reportadas (20,1%) entre os casos de infeção por STEC na UE em 2021 (ECDC, 2022a). Nos dois isolados foi identificado o subtipo *stx2e*, gene associado à doença dos edemas em suínos (Hu *et al.*, 2023). Importa salientar que os suínos em estudo não apresentavam sinais clínicos de doença, uma vez que foram aceites em matadouro, mas poderiam ser portadores assintomáticos de STEC. Esta variante de toxina *Shiga* foi detetada em diversos estudos, não só em suínos produzidos para consumo humano (Baranzoni *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2023; Remfry *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021), como também em produtos derivados (carne e produtos cárneos de suínos) (Serrano *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2022a; Yang *et al.*, 2021). Ambos os isolados deste estudo pertenciam ao serogrupo O8, o qual não está entre os principais serogrupos da vigilância epidemiológica na Europa (O26, O45, O103, O111, O121, O145, O157) (EFSA&ECDC, 2022). No presente estudo, este serogrupo foi o mais frequente, tanto em *E. coli* isoladas de carne (14,3%)

como em *E. coli* isoladas de fezes de suínos (14,9%), tendo sido associado aos patotipos STEC e ExPEC, o que reforça o conceito de que o serogrupo isoladamente não é relevante para a avaliação do grau de patogenicidade de *E. coli* (EFSA, 2020). Um patotipo pode estar associado a diversos serogrupos, e um serogrupo pode estar associado a diversos patotipos, ou até mesmo a *E. coli* não patogênicas (Nataro & Kaper, 1998). Apenas com uma análise mais abrangente, que inclua, nomeadamente, o ST e os genes de virulência, é possível ter uma ideia mais precisa do potencial patogénico de *E. coli*.

No que se refere aos isolados ETEC identificados nas amostras de fezes de suínos, o gene *stb*, que codifica uma enterotoxina termoestável frequentemente identificada nas ETEC de origem suína (Ogundare *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2022), foi detetado nos quatro isolados deste patotipo. Simultaneamente, foi também detetado o gene *astA*, que codifica a enterotoxina termoestável EAST-1, a qual aumenta a virulência das ETEC (von Mentzer *et al.*, 2021).

Apesar de no presente estudo não ter sido identificado nenhum patotipo intestinal de *E. coli* nas amostras de carne de suínos analisadas, é importante salientar que a presença destas bactérias no ambiente de matadouro pode constituir uma fonte de contaminação dos produtos de origem animal, nomeadamente da carne, especialmente quando não são mantidas as condições de higiene adequadas. Ao longo da linha de abate, as bactérias presentes no conteúdo intestinal dos animais podem ser transferidas para as carcaças, levando à contaminação do produto alimentar final (Abebe *et al.*, 2020).

O potencial patogénico de *E. coli* está associado à presença e expressão de genes de virulência (Kudva, 2020; Pakbin *et al.*, 2021a). Neste trabalho, em todos os isolados de *E. coli* sequenciados (14 isolados de carnes e 47 isolados de fezes) foram identificados genes de virulência associados a ExPEC. Estes genes foram igualmente identificados em todos os isolados classificados como IPEC.

Os fatores de virulência ExPEC pertencentes à classe das adesinas, codificados pelos genes *csgA* (100% dos isolados de carne e 97,9% dos isolados de fezes de suínos) e *fimH* (92,9% dos isolados de carne e 97,9% dos isolados de fezes de suínos) foram os mais frequentes. Estes resultados estão em conformidade com o obtido noutros estudos sobre caracterização de *E. coli* isoladas de suínos (Bernreiter-Hofer *et al.*, 2021; Bok *et al.*, 2020; Massella *et al.*, 2021; Reid *et al.*, 2019) e produtos derivados (Scheinberg *et al.*, 2017), onde estes genes estiveram entre os mais prevalentes.

Outros genes de virulência, frequentemente identificados em *E. coli* isoladas neste estudo incluem, entre outros, o *trtA* (78,6% nos isolados de carne e 59,6% nos isolados de fezes de suínos) e o *iss* (64,3% nos isolados de carne e 53,2% nos isolados de fezes de suínos), associados a protetinas; o *gad* (71,4% nos isolados de carne e 89,4% nos isolados de fezes de suínos), que codifica a enzima descarboxilase do ácido glutâmico; e o *terC* (100% nos isolados de carne

e de fezes de suínos), que codifica a proteína de resistência aos iões de telúrio. Estes genes foram igualmente reportados como frequentes por diversos estudos realizados em *E. coli* isoladas de suínos (Bernreiter-Hofer *et al.*, 2021; Bok *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2018; Massella *et al.*, 2021; Reid *et al.*, 2019).

O elevado número de estirpes com genes de virulência associados a ExPEC, é particularmente relevante. De notar que neste estudo, 90,2% das estirpes de *E. coli* isoladas de carne e de fezes de suínos submetidas a WGS foram classificadas como ExPEC. Estes resultados permitem levantar a hipótese, já colocada por outros (Bok *et al.*, 2020; Köhler & Dobrindt, 2011; Massella *et al.*, 2021; Sarowska *et al.*, 2019; Sora *et al.*, 2021), de que ExPEC poderão ser consideradas como microrganismos oportunistas, uma vez que fazem parte da flora intestinal do Homem e dos animais, e que apenas evidenciam o seu potencial de virulência quando colonizam os tecidos extraintestinais. Não obstante, para uma compreensão mais aprofundada dos fatores de virulência de *E. coli* comensais e do seu papel nas infeções extraintestinais, são necessários estudos adicionais.

Relativamente à classificação dos filogrupos, e de acordo com a classificação de Clermont (Clermont *et al.*, 2013), as 61 estirpes de *E. coli* sequenciadas foram incluídas em oito filogrupos (A, B1, B2, C, D, E, F e G). Apesar da diversidade observada, a maioria das estirpes analisadas pertenciam ao filogrupo A (42,9% dos isolados de carnes e 36,1% dos isolados de fezes) e B1 (51,0% dos isolados de fezes 21,5% dos isolados de carnes). Estes filogrupos estão maioritariamente associados a *E. coli* comensais, apesar de também poderem estar relacionados com IPEC (Beghain *et al.*, 2018; Bok *et al.*, 2020). Foram igualmente identificados isolados pertencentes aos filogrupos B2, D, F e G, os quais estão associados a infeções extraintestinais, nomeadamente no Homem (Bok *et al.*, 2020; Clermont *et al.*, 2019; Pakbin *et al.*, 2021b). No entanto, estudos mais recentes têm revelado que a associação entre o filogrupo e a patogenicidade de *E. coli* é cada vez mais difícil de estabelecer, muito devido à ubiquidade desta bactéria (Bailey *et al.*, 2010; Higgins *et al.*, 2007; Stoppe *et al.*, 2017).

No presente estudo foram identificados três serotipos distintos de *Salmonella* spp., nas carnes de suínos analisadas: *S. London*, *S. Typhimurium* e *S. Typhimurium* monofásica. Outros estudos também reportaram o isolamento dos serotipos mencionados em carne de suínos em Itália (Gambino *et al.*, 2022), no Brasil (Gomes *et al.*, 2022) e na Roménia (Tîrziu *et al.*, 2020). Os serotipos *S. Typhimurium* e *S. Typhimurium* monofásica estão entre os três mais relevantes na Europa, nomeadamente em suínos e carne de suínos (EFSA&ECDC, 2022). Apesar de *S. London* ser menos prevalente nos casos de salmonelose em humanos na Europa, este serotipo tem sido bastante reportado na China, associado a carne de suínos (Shen *et al.*, 2022b). Os três

serotipos identificados no presente estudo, foram anteriormente identificados no ambiente de matadouro de suínos em Portugal (Costa *et al.*, 2023; Gomes-Neves *et al.*, 2014).

Diversos trabalhos têm demonstrado que a patogenicidade de *Salmonella* não tifóides está associada ao número e à presença de determinados genes, nomeadamente dos genes *invA*, *stn*, *hilA*, *spvABCD* e *spvR*, importantes na interação com a célula hospedeira, na produção de enterotoxinas e no processo de invasão (Ammar *et al.*, 2016; Bahramianfard *et al.*, 2021; Diab *et al.*, 2023). No presente trabalho, o gene *hilA* foi identificado nas três *Salmonella* spp. isoladas de carne de suíno, enquanto o gene *spvB* foi identificado apenas no isolado de *S. Typhimurium* (CC47) e os genes *spvC*, *spvR*, *stn* e *fimA* não foram identificados em nenhum dos casos. O gene *invA*, considerado como marcador genético da maioria dos serotipos de *Salmonella* spp. (Sabry *et al.*, 2020), foi observado nos três isolados analisados. Apesar de o número de isolados de *Salmonella* spp. ter sido baixo neste estudo, os dados obtidos estão de acordo com evidências da literatura e realçam a importância da avaliação deste parâmetro genómico nas estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de matrizes alimentares, tendo em consideração o seu potencial zoonótico (Chaudhary *et al.*, 2015; Nikiema *et al.*, 2021).

Relativamente aos STs, neste estudo foram identificados 43 STs diferentes entre os isolados de *E. coli*, dos quais 13 STs nos isolados de carne e 30 STs nos isolados de fezes de suínos, e 3 STs distintos nos isolados de *Salmonella* spp.

Em particular, numa estirpe de *E. coli* isolada de carne (CC47) foi identificado o ST131 (associado ao serotipo ND:H4 e ao filogruppo B2), o qual apresenta particular relevância epidemiológica no âmbito do grupo ExPEC. O grupo clonal ST131 representa uma linhagem emergente a nível global, devido à sua virulência e elevada adaptabilidade a diferentes hospedeiros, tendo sido identificado em *E. coli* isoladas de amostras clínicas humanas, de animais de produção, de animais selvagens e de companhia, e de carne de retalho (Adefioye *et al.*, 2021; Bernreiter-Hofer *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2018; Massella *et al.*, 2021; Schink *et al.*, 2013). Este ST está associado a vários determinantes de resistência, que incluem a produção de ESBL e a resistência às fluoroquinolonas (Ramos *et al.*, 2020). No isolado em estudo, CC47, além da resistência fenotípica a diversos antibióticos (ampicilina, tetraciclina, ácido nalidíxico, cloranfenicol, trimetoprim e sulfametoxazol), apoiada pela análise genómica do isolado, foram identificados determinantes de resistência para as fluoroquinolonas.

Foram encontrados três STs comuns entre as estirpes de *E. coli* isoladas de carne e de fezes de suínos: ST10, ST88 e ST101. Alguns estudos demonstraram que os ST10 e ST88 se encontram globalmente distribuídos em animais, nomeadamente em suínos, e nos seres humanos (Day *et al.*, 2016; Do *et al.*, 2022; Seo *et al.*, 2023; Wasinski, 2019). Num estudo realizado por Day *et al.* (2016), estes dois ST foram identificados em isolados de *E. coli* humanos, animais

(bovinos, perus) e alimentares (carne de bovino e peru), sugerindo a possibilidade destes ST poderem estar a circular entre os animais e o Homem, através do consumo de alimentos de origem animal contaminados. Contudo, seria necessário realizar uma caracterização das estirpes de *E. coli* mais discriminatória e abrangente, nomeadamente através da WGS, de modo a confirmar essa possibilidade.

No que se refere aos isolados de *Salmonella* spp., estes pertenciam ao ST155 (*S. London*), ST34 (*S. Typhimurium* monofásica) e ST19 (*S. Typhimurium*). Estes STs são os mais prevalentes nos serotipos identificados e têm sido associados a diversos surtos de origem alimentar. A título de exemplo, refere-se o surto de *S. Typhimurium* monofásica ST34 que ocorreu em 2020 em França, associado ao consumo de chouriço (Pardos de la Gandara *et al.*, 2023), e ao surto que ocorreu na Dinamarca em 2017, associado ao consumo de salame de porco fatiado contaminado com *S. Typhimurium* ST19, produzido em Espanha (RASFF, 2017).

A resistência antimicrobiana representa uma ameaça à saúde humana em todo o mundo (EClinicalMedicine, 2021). Neste estudo, foi testada fenotipicamente a resistência a antibióticos nas três *Salmonella* spp., em 36 *E. coli* isoladas de carne e 103 *E. coli* isoladas de fezes de suínos.

Relativamente ao perfil de resistência a antibióticos, 75,0% (27/36) das estirpes de *E. coli* e 66,7% (2/3) das estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de carne, e 71,8% (74/103) das estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de suínos foram fenotipicamente resistentes. Estes resultados estão de acordo com o descrito num estudo realizado em Portugal em carne de suínos (Costa *et al.*, 2022b), onde a proporção de *Salmonella* spp. e de *E. coli* resistentes a antibióticos também foi elevada, 78,5% e 100%, respetivamente.

Nos isolados de *E. coli*, as resistências à tetraciclina (41,7% nos isolados de carne e 55,3% nos isolados de fezes de suínos), ampicilina (38,9% nos isolados de carne e 48,5% nos isolados de fezes de suínos) e sulfametoxazol (41,7% nos isolados de carne e 35,9% nos isolados de fezes de suínos) foram as mais frequentes. A resistência às cefalosporinas de 3^a e 4^a geração (cefotaxima e cefepima) foi baixa (entre 0,0-1,0%) em ambos os grupos de estudo. Já no que se refere aos isolados de *Salmonella* spp., as resistências à ampicilina (duas das três estirpes isoladas) e ao sulfametoxazol (duas das três estirpes isoladas) foram as mais frequentes. Estes resultados estão em conformidade com os dados do último relatório anual de vigilância da resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas na UE (EFSA&ECDC, 2023). No entanto, convém salientar que estas comparações devem ser sempre efetuadas com precaução, uma vez que o tipo de testes e os critérios de interpretação utilizados, bem como a origem dos dados em análise (programas de vigilância nacionais, estudos em quintas ou matadouros), podem conduzir a alguns vieses.

Todos os isolados de *E. coli* foram suscetíveis à ceftazidima, meropenem e tigeciclina. Estes resultados foram semelhantes aos de um estudo realizado em Itália (Rega *et al.*, 2023),

que avaliou a transmissão de *E. coli* resistentes a antimicrobianos ao longo da cadeia de produção suína (incluindo amostras de fezes e de carne de suínos), em que nenhum dos isolados de carne e de fezes de suínos foram resistentes à ceftazidima ou à tigeciclina. O mesmo tem sido observado em outros estudos realizados na China, em que *E. coli* isoladas de suínos apresentam suscetibilidade ao meropenem e à tigeciclina (Ma *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2020).

No presente estudo, de entre as estirpes resistentes, 40,7% *E. coli* isoladas de carne e 51,4% *E. coli* isoladas de fezes de suínos foram multirresistentes aos antibióticos testados. A frequência de isolados multirresistentes encontrada é superior à referida no relatório da EFSA & ECDC (2023), que reporta valores de resistência de 34,2% para *E. coli* isoladas de suínos produzidos para consumo humano. Os isolados de *E. coli* analisados exibiram um perfil de multirresistência semelhante ao da maioria dos animais produtores de alimentos da UE, sendo o perfil AMP-TET-SMX-TMP o mais frequente (EFSA & ECDC, 2023).

Diversos fatores poderão contribuir para a ocorrência de uma percentagem tão elevada de *E. coli* e *Salmonella* spp. resistentes a estas classes de antibióticos, entre as quais a utilização inadequada e abusiva de antibióticos na produção animal (WHO, 2021). Hipoteticamente, os suínos em estudo poderão ter sido criados em condições semelhantes e expostos aos mesmos antibióticos que outros animais da UE, embora tal seja meramente especulativo, uma vez que a informação acerca da exposição a antibióticos dos animais incluídos neste estudo não foi facultada ao laboratório.

Importa salientar que em Portugal, à semelhança da maioria dos países da UE, em 2021 estas foram as classes de antibióticos com maior volume de vendas (tetraciclina com 34,1%, penicilinas com 31,2%, e sulfonamidas com 9,9%), totalizando 66,9% das vendas de produtos veterinários medicamentosos (EMA, 2022). Para além disso, estas classes de antibióticos são frequentemente utilizadas, muitas vezes de forma indevida, na produção de suínos (EMA, 2019; Holmer *et al.*, 2019; O'Neill *et al.*, 2023). Os resultados obtidos após sequenciação dos isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp. evidenciaram a presença de determinantes de resistência a estas classes de antibióticos. No caso dos putativos marcadores de resistência às penicilinas, destacam-se os genes *bla*_{TEM}, os quais aparecem com frequência em *E. coli* isoladas de carne e de fezes de suínos (Ramos *et al.*, 2020). Neste trabalho, o gene mais prevalente foi o *bla*_{TEM-1}, apesar de a TEM-1 não ser considerada uma ESBL. Numa estirpe de *E. coli* isolada de carne foi identificada a presença do gene *bla*_{TEM-30}, que explica a resistência fenotípica deste isolado à amoxicilina-ácido clavulânico. Esta enzima, TEM-30, foi identificada pela primeira vez em Portugal, numa *E. coli* isolada numa urocultura em 1999 (Caniça *et al.*, 2002). A resistência às tetraciclina é geralmente explicada pela presença dos genes *tet*(A, B, D, M, e outras variantes), ou pelas alterações ao nível das bombas de efluxo a eles associadas (Jahantigh *et al.*, 2020). O gene *tet*(A), o mais frequente neste trabalho, está entre os mais identificados em *E. coli* (Abbassi *et al.*, 2021; Møller *et al.*, 2016). Relativamente à resistência ao trimetoprim, foram

identificados os genes *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA8*, *dfrA12*, *dfrA14* e *dfrA17* (maior proporção de isolados foi associada aos genes *dfrA1* e *dfrA12*), enquanto a resistência ao sulfametoxazol foi associada à presença dos genes *sul1*, 2 e 3 (Ray *et al.*, 2017). O gene *sul3*, o mais identificado em estirpes de *E. coli* isoladas de carne (42,9%) e de fezes de suínos (38,3%), é frequentemente encontrado em *E. coli* isoladas de suínos (Reid *et al.*, 2019).

Adicionalmente, foram identificados genes que conferem resistência preditiva às classes dos aminoglicosídeos (*aadA1*, *addA2*, *addA2b*, *aadA5*, *aadA12*, *aac(6')-Iaa*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*) e dos fenicóis (*catA2*, *cml*, *cmlA1*, *floR*), tal como referido em outros estudos (Peterson & Kaur, 2018; Ray *et al.*, 2017; Yaqoob *et al.*, 2018).

Particularmente relevante, é a presença de genes determinantes de resistência às classes de antibióticos consideradas de importância crítica para a saúde humana e animal, nomeadamente às fluoro(quinolonas), aos macrólidos e às cefalosporinas. Foram identificadas mutações na região codificante das enzimas DNA girase e DNA topoisomerase IV (genes *gyrA*, *parC*, e *parE*, respetivamente), bem como identificados genes plasmídicos *qnr* (*qnrS1*), associados à resistência preditiva às fluoro(quinolonas) (Aldred *et al.*, 2014). Mutações nos genes *gyrA* e *parC* foram descritas anteriormente em *E. coli* isoladas de suínos e outros animais de produção (Kompes *et al.*, 2023; Redgrave *et al.*, 2014; Seo *et al.*, 2022). Associado à resistência preditiva aos macrólidos, foram identificados os genes *mef(B)*, *mef(C)* que codificam bombas de efluxo, e os genes *mph(A)*, *mph(B)*, *mph(G)* que codificam fosfotransferases (Dinos, 2017; Ray *et al.*, 2017).

Uma das estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de suínos (SM76) apresentou resistência fenotípica às cefalosporinas (cefotaxima e ceftriaxona - 3^a geração, e cefepima - 4^a geração), tendo sido identificado o gene *blaCTX-M-1*, responsável pela expressão de ESBL (Ramos *et al.*, 2020). Este gene está associado à produção de uma das CTX-M mais frequentemente detetadas em animais produtores de alimentos na Europa, especialmente em suínos (EFSA & ECDC, 2023; Kompes *et al.*, 2023; Poirel *et al.*, 2018).

Foram também identificados concomitantemente outros genes que codificam ESBLs em *E. coli* (*blaTEM-207*, *blaTEM-230*) e *Salmonella* spp. (*blaTEM-106*, *blaTEM-126*) isoladas de carne, apesar de nos TSA não se ter observado manifestação fenotípica.

Em Portugal já foi reportada a presença de *E. coli* produtoras de ESBL em diversos animais produtores de alimentos (suínos - 49%; bovinos - 7%; perus - 4%) e em carne disponível em superfícies comerciais (carne de porco - 10,5%) (Clemente *et al.*, 2021; Ramos *et al.*, 2020).

Neste trabalho, não foram detetados genes de resistência à colistina. Não obstante, vários estudos, nomeadamente em Portugal, têm demonstrado a presença de genes *mcr*, por vezes associados a suscetibilidade reduzida à colistina, em *E. coli* e *Salmonella* spp. isoladas de ani-

mais produtores de alimentos, incluindo de suínos, e de vários produtos alimentares, predominantemente de carne de suíno, bovino, frango e peru (Amaro *et al.*, 2023; Clemente *et al.*, 2019; ECDC, 2016; Figueiredo *et al.*, 2016; Kieffer *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2022).

Os animais produtores de alimentos, nomeadamente os suínos que não apresentam sinais clínicos de qualquer doença, podem ser importantes reservatórios de *E. coli* e *Salmonella* spp. portadoras de genes de resistência, que podem ser transmitidos ao Homem por contacto direto ou através da cadeia alimentar, se não forem seguidas as práticas de higiene adequadas (Adzitey *et al.*, 2021; Bergšpica *et al.*, 2020). Um estudo realizado por Schill *et al.* (2017) demonstrou que a carne de suínos pode ser uma fonte de ESBL, mesmo quando os parâmetros de qualidade microbiológica (contagem de *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, e microrganismos aeróbios mesófilos) estão dentro dos limites satisfatórios.

Neste trabalho, e de acordo com a metodologia utilizada, foram identificados diversos genes *bla* da mesma família (TEM) no mesmo isolado, como é o caso do CC9 (*E. coli*) e do CC47 (*Salmonella* spp.), o que não é compatível com o *fitness* das bactérias (capacidade de adaptação metabólica da bactéria para sobreviver e se multiplicar em diferentes ambientes). Nestes casos, seria importante adotar uma abordagem diferente para identificar os genes de resistência e as mutuações pontuais preditivas da resistência antimicrobiana, a qual poderia por incluir, por exemplo, a submissão dos *raw reads* à plataforma *Resfinder* disponível no CGE. Nas versões mais antigas do *ResFinder*, apenas era possível realizar a submissão de *assemblies* em formato fastq. Atualmente, é possível também submeter os *raw reads* nesta plataforma (Florensa *et al.*, 2022). A título de exemplo, fazendo a submissão dos *raw reads* dos isolados anteriormente referidos (CC9, de *E. coli*, e CC47, de *Salmonella* spp.) foi possível identificar um número muito menor de genes *bla*_{TEM}. Uma análise futura deverá ter em consideração este aspeto da identificação dos genes de resistência, aquando da submissão de *raw reads versus assemblies* às plataformas de análise genómica disponíveis.

Os plasmídeos mais frequentemente identificados neste estudo pertencem aos grupos IncF e IncX. Estes elementos genéticos móveis podem ser transmitidos entre bactérias e de bactérias presentes em animais para bactérias presentes em humanos, transferindo vários fatores de virulência e de resistência (Bernreiter-Hofer *et al.*, 2021; Rozwandowicz *et al.*, 2018).

Os plasmídeos IncF, estão entre os mais disseminados na Europa, tendo sido identificados em *E. coli* isoladas de humanos, de animais e do meio ambiente (Rozwandowicz *et al.*, 2018). Este grupo de plasmídeos está associado a genes de resistência de várias classes de antibióticos, como as penicilinas, os carbapenemes, os aminoglicosídeos, as quinolonas, as sulfonamidas e as tetraciclinas (Rozwandowicz *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2015). Os plasmídeos IncX são principalmente identificados em *Salmonella* spp. e *E. coli* isoladas de fontes humanas e

animais. Estes plasmídeos contêm, principalmente, determinantes de resistência às quinolonas, às tetraciclinas e ao trimetoprim (Rozwandowicz *et al.*, 2018).

O gene blaCTX-M-1 é frequentemente descrito em plasmídeos do grupo IncI1-l (Bernreiter-Hofer *et al.*, 2021; Day *et al.*, 2016; Kompes *et al.*, 2023, Rozwandowicz *et al.*, 2018). Neste estudo identificou-se o plasmídeo IncI1-l numa estirpe de *E. coli* portadora do gene blaCTX-M-1.

Os isolados de *Salmonella* spp. deste estudo não integraram nenhum *cluster*, quando comparados com as sequências clínicas, alimentares e animais, nacionais e internacionais, disponíveis na plataforma *Enterobase*. O número limitado de sequências disponíveis na plataforma *Enterobase*, dificultou a comparação genética dos isolados em estudo.

A análise filogenética com base no cgMLST dos isolados de *E. coli* estudados permitiu identificar quatro *clusters*. O *cluster* 1 integrou dois isolados de carne, enquanto os *clusters* 2, 3 e 4 integraram apenas isolados de fezes de suínos. Foi observada concordância no que se refere ao filogrupo, ST, serotipo, genes de virulência e genes de resistência entre as estirpes de *E. coli* de cada *cluster*. O *cluster* 1 integrou isolados de amostras que pertenciam à mesma marca, ao mesmo produtor de carne, associado à mesma exploração de suínos, sugerindo que a contaminação destas amostras de carne por *E. coli* poderá ter ocorrido ao nível da produção primária. Na produção primária, a contaminação pode ocorrer durante a fase de alimentação dos animais ou via o meio ambiente onde estes se encontram inseridos (Machado-Moreira *et al.*, 2019). Por outro lado, durante o processo de abate, a fase de evisceração pode constituir outra fonte de contaminação, como já referido anteriormente (Abebe *et al.*, 2020; Adzitey *et al.*, 2021). Os *clusters* 2 e 4 integraram isolados de amostras que pertenciam à mesma exploração de suínos. Por outro lado, o *cluster* 3 integrou dois isolados de fezes de suínos provenientes de explorações diferentes, colhidas com um intervalo de, aproximadamente, quatro meses. A falta de informação sobre as possíveis relações entre estas duas explorações, nomeadamente no que diz respeito à proximidade geográfica, ao tipo de produção (intensiva, semi-intensiva) e ao tipo de alimentação dos animais, entre outras, não permite tirar qualquer relação acerca da relação filogenómica entre estes isolados de *E. coli*.

Foi possível observar que algumas estirpes de *E. coli* pertencentes ao mesmo ST não apresentavam proximidade genética, demonstrando o elevado poder discriminatório do esquema de análise baseado no cgMLST, quando comparado com o esquema de MLST baseado na análise de 7 alelos (esquema Achtman).

CONCLUSÃO

A prevenção e o controlo de doenças infecciosas estão entre os principais objetivos da saúde pública. De acordo com os últimos dados da OMS, é estimado que anualmente existam 600 milhões de casos de doenças provocadas pela ingestão de alimentos contaminados a nível mundial, dos quais 420.000 resultam em morte (FAO & WHO, 2023). A maioria dos microrganismos patogénicos associados a doenças de origem alimentar tem uma origem zoonótica, sendo os animais produtores de alimentos os principais reservatórios, e os alimentos de origem animal, como a carne, as principais fontes de transmissão (Abebe *et al.*, 2020). Entre as principais bactérias patogénicas associadas a surtos de origem alimentar, destacam-se a *E. coli* e a *Salmonella* spp. (EFSA&ECDC, 2022). Paralelamente, a resistência a antibióticos, associada a muitas destas bactérias, agrava o risco para a saúde humana e animal (Rajaei *et al.*, 2021).

Neste estudo foram caracterizadas estirpes de *E. coli* e *Salmonella* spp. isoladas de fezes de suínos, produzidos para consumo humano, e de carne de porco crua, um dos produtos alimentares mais consumidos em Portugal. De acordo com o inicialmente definido, e com os resultados que foram obtidos, pode-se considerar que os objetivos foram alcançados com êxito.

Foram identificados isolados de *E. coli* patogénicos intestinais (STEC e ETEC) e extraintestinais nas matrizes animais, e isolados de *E. coli* patogénicos extraintestinais e *Salmonella* spp. nas matrizes alimentares analisadas, ainda que a maioria das amostras de carne de suínos, adquiridas em diversas superfícies comerciais, tivesse apresentado qualidade microbiológica satisfatória. Estes dados evidenciam a importância de definir critérios microbiológicos de segurança específicos e mais abrangentes (para além dos referidos na legislação vigente) para a pesquisa destas bactérias em fezes e carne de suíno no geral (para além de preparados de carne). Apesar de a carne de porco não ser um alimento pronto a comer, as contaminações cruzadas que podem ocorrer durante a fase de confeção de um alimento contaminado, podem constituir um risco para a saúde dos consumidores.

A elevada frequência de *E. coli* e *Salmonella* spp. resistentes ou com genes de resistência a antibióticos, principalmente nas amostras de carne, é de particular preocupação para a saúde

pública (O'Neill *et al.*, 2023). Embora o tratamento das infeções gastrointestinais não pressuponha antibioterapia, os genes de resistência presentes nestas bactérias podem ser transmitidos para outras bactérias, podendo limitar o tratamento de outras infeções mais graves (Gambino *et al.*, 2022; Shane *et al.*, 2017). Em suma, a presença de *E. coli* patogénicas e *Salmonella* spp., por vezes resistentes a antibióticos, em suínos produzidos para consumo humano, evidencia a necessidade do rigoroso cumprimento das boas práticas de higiene ao longo de toda a cadeia alimentar, desde a produção primária, a transformação, a distribuição e a preparação, até ao momento em que existe consumo do alimento. Neste contexto, é essencial que as estratégias e sistemas de monitorização e controlo sejam implementados através de uma abordagem *One Health*. A promoção de estudos "do prado ao prato" e a compreensão de como as bactérias zoonóticas persistem no reservatório animal ou entram na cadeia alimentar, são passos cruciais para a implementação destas estratégias. Promover o uso de medidas de biossegurança e investir na investigação e desenvolvimento de vacinas, constituem abordagens adicionais que podem contribuir para enfrentar este desafio. Por outro lado, a estratégia de segurança alimentar deverá também passar pela educação e sensibilização dos consumidores, para as regras de higiene na manipulação de alimentos perecíveis e suscetíveis à contaminação microbiana. De salientar, que menos de metade dos consumidores europeus identifica o consumo de carne como uma potencial via de transmissão de bactérias resistentes a antibióticos de animais para humanos (EFSA, 2017; Ritter *et al.*, 2019).

No presente trabalho, a caracterização genómica dos isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp. demonstrou ser uma mais-valia, pois permitiu a identificação de estirpes patogénicas, de genes de resistência a antimicrobianos e de plasmídeos, dando uma visão mais abrangente sobre o potencial patogénico dos mesmos. De realçar que esta abordagem permitiu identificar uma grande percentagem de estirpes de *E. coli* patogénicas extraintestinais. Estas bactérias, podem ser consideradas como bactérias oportunistas, uma vez que poderão evidenciar o seu potencial de virulência quando colonizam os tecidos extraintestinais.

Neste estudo, a sequenciação completa do genoma apenas foi realizada num subgrupo de isolados, de acordo com o racional previamente definido. Num estudo posterior, seria relevante a realização da WGS de todas as estirpes de *E. coli* isoladas, de modo a compreender a relevância dos fatores de virulência presentes nas "*E. coli* comensais" e o seu papel nas infeções extraintestinais. A crescente disponibilidade e acessibilidade da WGS provavelmente fornecerá novas perspetivas sobre este tema.

Em investigações futuras seria relevante a realização de um estudo prospetivo, com coelheitas em diferentes pontos da cadeia de produção de suínos (exploração, transporte, abate, processamento). A par disso, seria pertinente ter informações mais detalhadas sobre a origem dos suínos e das carnes em estudo, uma vez que esta informação poderá ser fundamental para

tirar mais elações acerca das relações filogenéticas dos isolados e, eventualmente, sobre o papel dos suínos enquanto potencial fonte de transmissão destas bactérias ao Homem.

Em suma, este estudo permitiu aprofundar o conhecimento sobre a qualidade microbiológica de carne de suínos e o papel que as bactérias zoonóticas, *E. coli* e *Salmonella* spp., podem desempenhar na cadeia alimentar, e o potencial perigo que podem representar para a saúde pública.

BIBLIOGRAFIA

- Abbassi, M. S., Kilani, H., Abid, I., Sáenz, Y., Hynds, P., Lengliz, S., Ben Chehida, N., & Boutiba-Ben Boubaker, I. (2021). Genetic Background of Antimicrobial Resistance in Multiantimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Feces of Healthy Broiler Chickens in Tunisia. *BioMed Research International*, 2021, 1269849. <https://doi.org/10.1155/2021/1269849>
- Abdalla, S. E., Abia, A. L. K., Amoako, D. G., Perrett, K., Bester, L. A., & Essack, S. Y. (2022). Food animals as reservoirs and potential sources of multidrug-resistant diarrheagenic *E. coli* pathotypes: Focus on intensive pig farming in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 89(1), e1–e13. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v89i1.1963>
- Abebe, E., Gugsu, G., & Ahmed, M. (2020). Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens. *Journal of Tropical Medicine*, 2020, 4674235. <https://doi.org/10.1155/2020/4674235>
- Achtman, M., Zhou, Z., Alikhan, N. F., Tyne, W., Parkhill, J., Cormican, M., Chiou, C. S., Torpdahl, M., Litrup, E., Prendergast, D. M., Moore, J. E., Strain, S., Kornschöber, C., Meinersmann, R., Uesbeck, A., Weill, F. X., Coffey, A., Andrews-Polymenis, H., Curtiss, R., & Fanning, S. (2020). Genomic diversity of *Salmonella enterica* -The UoWUCC 10K genomes project. *Wellcome Open Research*, 5, 223. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16291.1>
- Adefioye, O. J., Weinreich, J., Rödiger, S., Schierack, P., & Olowe, O. A. (2021). Phylogenetic Characterization and Multilocus Sequence Typing of Extended-Spectrum Beta Lactamase-Producing *Escherichia coli* from Food-Producing Animals, Beef, and Humans in Southwest Nigeria. *Microbial Drug Resistance*, 27(1), pp. 111-120. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0397>
- Adzitey, F., Huda, N., & Shariff, A. H. M. (2021). Phenotypic Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* from Raw Meats, Ready-to-Eat Meats, and Their Related Samples in One Health Context. *Microorganisms*, 9(2), 326. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020326>
- Akbar, A., & Anal, A. K. (2011). Food Safety Concerns and Food-borne Pathogens, *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Campylobacter*. *FUUAST Journal of Biology*, 1(1), pp. 5-17.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osherooff, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*, 53(10), pp. 1565-1574. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M., & Dillio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), pp. 6235-6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>

Amaro, A., Correia, I., & Clemente, L. (2020, Agosto 5). Resistência aos antibióticos em bactérias com origem em animais da cadeia alimentar. *Veterinária Atual*. <https://www.veterinaria-atual.pt/destaques/resistencia-aos-antibioticos-em-bacterias-com-origem-em-animais-da-cadeia-alimentar/>

Amaro, A., Leão, C., Guerra, V., Albuquerque, T., & Clemente, L. (2023). Plasmid-Mediated Colistin Resistance Genes *mcr-1* and *mcr-4* in Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from a Healthy Pig in Portugal. *Microbial Drug Resistance*, 29(3), pp. 78-84. <https://doi.org/10.1089/mdr.2022.0228>

Ammar, A. M., Mohamed, A. A., Abd El-Hamid, M. I., & El-Azzouny, M. M. (2016). Virulence genotypes of clinical Salmonella Serovars from broilers in Egypt. *Journal of Infection in Developing Countries*, 10(4), pp. 337-346. <https://doi.org/10.3855/jidc.7437>

Andino, A., & Hanning, I. (2015). *Salmonella enterica*: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. *The Scientific World Journal*, 2015, 520179. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>

Anjum, M. F. (2015). Screening methods for the detection of antimicrobial resistance genes present in bacterial isolates and the microbiota. *Future Microbiology*, 10(3), pp. 317-320. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.2>

Arancia, S., Iurescia, M., Lorenzetti, S., Stravino, F., Buccella, C., Caprioli, A., Franco, A., Battisti, A., Morabito, S., & Tozzoli, R. (2019). Detection and isolation of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in caecal samples from pigs at slaughter in Italy. *Veterinary Medicine and Science*, 5(3), pp. 462-469. <https://doi.org/10.1002/vms3.175>

Aryal, S. (2022a, janeiro 12). *E. coli Pathotypes-ETEC, EPEC, EHEC, EAEC, EIEC, DAEC*. Microbe notes. <https://microbenotes.com/e-coli-pathotypes-etec-epec-ehc-eaec-eiec-daec/>

Aryal, S. (2022b, setembro 2). *Polymerase Chain Reaction (PCR)-Principle, Steps, Applications*. Microbe notes. <https://microbenotes.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-steps-applications/>

Aryal, S. (2022c, Agosto 10). *Biochemical Test and Identification of E. coli*. MicrobiologyInfo. <https://microbiologyinfo.com/biochemical-test-and-identification-of-e-coli/>

ASAE. (2023). *Perigos de Origem Alimentar*. ASAE. <https://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/area-tecnico-cientifica/perigos-de-origem-alimentar.aspx>

Bahramianfard, H., Derakhshandeh, A., Naziri, Z., & Khaltabadi Farahani, R. (2021). Prevalence, virulence factor and antimicrobial resistance analysis of *Salmonella* Enteritidis from poultry and egg samples in Iran. *BMC veterinary research*, 17, 196. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02900-2>

Bailey, J. K., Pinyon, J. L., Anantham, S., & Hall, R. M. (2010). Distribution of human commensal *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), pp. 3455-3456. <https://doi.org/10.1128/JCM.00760-10>

Bantawa, K., Rai, K., Subba Limbu, D., & Khanal, H. (2018). Food-borne bacterial pathogens in marketed raw meat of Dharan, eastern Nepal. *BMC Research Notes*, 11, 618. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3722-x>

Baranzoni, G. M., Fratamico, P. M., Gangiredla, J., Patel, I., Bagi, L. K., Delannoy, S., Fach, P., Boccia, F., Anastasio, A., & Pepe, T. (2016). Characterization of Shiga Toxin Subtypes and Virulence Genes in Porcine Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 7, 574. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00574>

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

Bergšpica, I., Kaprou, G., Alexa, E. A., Prieto, M., & Alvarez-Ordóñez, A. (2020). Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* in Pigs and Pork Meat in the European Union. *Antibiotics*, 9(10), 678. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100678>

Bernreiter-Hofer, T., Schwarz, L., Müller, E., Cabal-Rosel, A., Korus, M., Misic, D., Frankendorf, K., Abraham, K., Grünzweil, O., Weiss, A., Feßler, A. T., Allerberger, F., Schwarz, S., Szostak, M. P., Ruppitsch, W., Ladinig, A., Spergser, J., Braun, S. D., Monecke, S., Ehrlich, R., & Lončarić, I. (2021). The Pheno- and Genotypic Characterization of Porcine *Escherichia coli* Isolates. *Microorganisms*, 9(8), 1676. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081676>

Bertelloni, F., Cagnoli, G., Turchi, B., & Ebani, V. V. (2022). Low Level of Colistin Resistance and *mcr* Genes Presence in *Salmonella* spp.: Evaluation of Isolates Collected between 2000 and 2020 from Animals and Environment. *Antibiotics*, 11(2), 272. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020272>

bioMérieux. (2022a). *Contagem automática de indicadores de qualidade: TEMPO®*. bioMérieux. <https://www.biomerieux.com.br/alimentos/contagem-automatica-de-indicadores-de-qualidade-tempo>

bioMérieux. (2022b). *Soluções VIDAS® para Salmonella*. bioMérieux. <https://www.biomerieux.com.br/recursos/solucoes-vidasr-para-salmonella>

bioMérieux. (2022c). *VITEK® 2 Compact*. bioMérieux. <https://www.biomerieux.pt/produto/vitekr-2-compact>

bioMérieux. (2022d). *VITEK® MS*. bioMérieux. <https://www.biomerieux.pt/produto/vitekr-ms-0>

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

Boisen, N., Scheut, F., Rasko, D. A., Redman, J. C., Persson, S., Simon, J., Kotloff, K. L., Levine, M. M., Sow, S., Tamboura, B., Toure, A., Malle, D., Panchalingam, S., Krogfelt, K. A.,

& Nataro, J. P. (2012). Genomic Characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* From Children in Mali. *Journal of Infectious Diseases*, 205(3), pp. 431-444. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir757>

Bok, E., Końska, A., Mazurek-Popczyk, J., Wojciech, M., & Baldy-Chudzik, K. (2020). Extended Phylogeny and Extraintestinal Virulence Potential of Commensal *Escherichia coli* from Piglets and Sows. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(1), 366. <https://doi.org/10.3390/ijerph17010366>

Bonifield, H. R., & Hughes, K. T. (2003). Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. *Journal of bacteriology*, 185(12), pp. 3567-3574. <https://doi.org/10.1128/JB.185.12.3567-3574.2003>

Borowiak, M., Baumann, B., Fischer, J., Thomas, K., Deneke, C., Hammerl, J. A., Szabo, I., & Malorny, B. (2020). Development of a Novel *mcr-6* to *mcr-9* Multiplex PCR and Assessment of *mcr-1* to *mcr-9* Occurrence in Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Isolates From Environment, Feed, Animals and Food (2011-2018) in Germany. *Frontiers in microbiology*, 11, 80. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00080>

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

Campos, J., Mourão, J., Peixe, L., & Antunes, P. (2019). Non-typhoidal *Salmonella* in the Pig Production Chain: A Comprehensive Analysis of Its Impact on Human Health. *Pathogens*, 8(1), 19. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010019>

Caníça, M., Ferreira, M., Ferreira, E., & Cabral, L. (2002). Phenotype and molecular characterization of the first inhibitor-resistant TEM-derived beta-lactamase identified in Portugal. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(11), pp. 3688-3689. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3688-3689.2002>

Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 3(3), dlab092. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>

CDC. (2022a). *Serotypes and the Importance of Serotyping Salmonella*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/salmonella/reportspubs/salmonella-atlas/serotyping-importance.html>

CDC. (2022b). *How Food Gets Contaminated – The Food Production Chain*. Centers for Disease Control and Prevention. https://www.cdc.gov/foodsafety/production-chain.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Ffoodsafety%2Foutbreaks%2Finvestigating-outbreaks%2Fproduction-chain.html

CDC. (2022c). How Antimicrobial Resistance Happens. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html>

Chan, K. G. (2016). Whole-genome sequencing in the prediction of antimicrobial resistance. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 14(7), pp. 617-619. <https://doi.org/10.1080/14787210.2016.1193005>

Chaudhary, J. H., Nayak, J. B., Brahmhatt, M. N., & Makwana, P. P. (2015). Virulence genes detection of *Salmonella* serovars isolated from pork and slaughterhouse environment in Ahmedabad, Gujarat. *Veterinary world*, 8(1), pp. 121-124. <https://doi.org/10.14202/vet-world.2015.121-124>

Chen, L., Wang, L., Yassin, A. K., Zhang, J., Gong, J., Qi, K., Ganta, R. R., Zhang, Y., Yang, Y., Han, X., & Wang, C. (2018). Genetic characterization of extraintestinal *Escherichia coli* isolates from chicken, cow and swine. *AMB Express*, 8, 117. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0646-8>

Chonsin, K., Changkwanyeeun, R., Siriphap, A., Intarapuk, A., Prapasawat, W., Changkaew, K., Pulsrikarn, C., Isoda, N., Nakajima, C., Suzuki, Y., & Suthienkul, O. (2021). Prevalence and Multidrug Resistance of *Salmonella* in Swine Production Chain in a Central Province, Thailand. *Journal of Food Protection*, 84(12), pp. 2174–2184. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-003>

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

Clemente, L., Leão, C., Moura, L., Albuquerque, T., & Amaro, A. (2021). Prevalence and Characterization of ESBL/ AmpC Producing *Escherichia coli* from Fresh Meat in Portugal. *Antibiotics*, 10(11), 1333. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111333>

Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), pp. 58-65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>

Clermont, O., Dixit, O. V. A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., & Gordon, D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental Microbiology*, 21(8), pp. 3107-3117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>

Colello, R., Cáceres, M. E., Ruiz, M. J., Sanz, M., Etcheverría, A. I., & Padola, N. L. (2016). From Farm to Table: Follow-Up of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Throughout the

Pork Production Chain in Argentina. *Frontiers in Microbiology*, 7, 93. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00093>

Coleman, W. B., & Tsongalis, G. J. (2006). The Polymerase Chain Reaction. In: Coleman, W. B., Tsongalis, G. J. (eds.). *Molecular Diagnostics*. Humana Press, pp. 47-55. <https://doi.org/10.1385/1-59259-928-1:047>

Correia, C. B., Cunha, I. C., Coelho, A., Maia, C., Pena, C., Bonito, C. C., Flores, C., Moura, I. B., Sousa, I., Barreira, M. J., Toscano, M. M., Furtado, R., Marcos, S., Santos, S., Lopes, T. T., Saraiva, M., & Castanheira, I. (2019). Investigação laboratorial de surtos de toxinfecção alimentar: dados referentes a 2017. *Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*, 25, pp. 13-25.

Corry, J. E. L., Curtis, G. D. W., & Baird, R. M. (2003a). Hektoen enteric (HE) agar. In: Corry, J. E. L., Curtis, G. D. W., & Baird, R. M. (eds.). *Progress in Industrial Microbiology*. Elsevier, pp. 481-483. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(03\)80056-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(03)80056-5)

Corry, J. E. L., Curtis, G. D. W., & Baird, R. M. (2003b). Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar. In: Corry, J. E. L., Curtis, G. D. W., & Baird, R. M. (eds.). *Progress in Industrial Microbiology*. Elsevier, pp. 632-634. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(03\)80105-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(03)80105-4)

Costa, A., & Silva, G. J. (2018). Resistência à colistina e sua disseminação: implicações em saúde pública. *Revista Portuguesa De Farmacoterapia*, 10(1), pp. 47-52. <https://doi.org/10.25756/rpf.v10i1.162>

Costa, M., Cardo, M., Cara d'Anjo, M., & Leite, A. (2022a). Assessing antimicrobial resistance occurrence in the Portuguese food system: Poultry, pigs and derived food, 2014–2018. *Zoonoses and Public Health*, 69(4), pp. 312-324. <https://doi.org/10.1111/zph.12920>

Costa, M. M., Cardo, M., Soares, P., Cara d'Anjo, M., & Leite, A. (2022b). Multi-Drug and β -Lactam Resistance in *Escherichia coli* and Food-Borne Pathogens from Animals and Food in Portugal, 2014–2019. *Antibiotics*, 11(1), 90. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010090>

Costa, R. D., Silva, V., Leite, A., Saraiva, M., Lopes, T. T., Themudo, P., Campos, J., & Vieira-Pinto, M. (2023). *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* Control at a Pig Abattoir: Are We Missing Lairage Time Effect, Pig Skin, and Internal Carcass Surface Contamination? *Foods*, 12(15), 2910. <https://doi.org/10.3390/foods12152910>

Dang-Xuan, S., Nguyen-Viet, H., Pham-Duc, P., Grace, D., Unger, F., Nguyen-Hai, N., Nguyen-Tien, T., & Makita, K. (2018). Simulating Cross-Contamination of Cooked Pork with *Salmonella enterica* from Raw Pork through Home Kitchen Preparation in Vietnam. *International journal of environmental research and public health*, 15(10), 2324. <https://doi.org/10.3390/ijerph15102324>

Day, M. J., Rodríguez, I., van Essen-Zandbergen, A., Dierikx, C., Kadlec, K., Schink, A.-K., Wu, G., Chattaway, M. A., DoNascimento, V., Wain, J., Helmuth, R., Guerra, B., Schwarz, S., Threlfall, J., Woodward, M. J., Coldham, N., Mevius, D., & Woodford, N. (2016). Diversity of STs, plasmids and ESBL genes among *Escherichia coli* from humans, animals and food in

Germany, the Netherlands and the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(5), pp. 1178-1182. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv485>

Deane, A., Murphy, D., Leonard, F. C., Byrne, W., Clegg, T., Madigan, G., Griffin, M., Egan, J., & Prendergast, D. M. (2022). Prevalence of *Salmonella* spp. in slaughter pigs and carcasses in Irish abattoirs and their antimicrobial resistance. *Irish veterinary journal*, 75(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13620-022-00211-y>

DGAV. (2020). *A Segurança dos Alimentos depende de todos! Dia Mundial da Segurança dos Alimentos*. Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2021/10/brochura_DMSA20.pdf

DGAV. (2021a). *Codex Alimentarius*. Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. <https://www.dgav.pt/alimentos/conteudo/codex-alimentarius/#Como-funciona?>

DGAV. (2021b). *Programas Nacionais de Controlo das Salmonelas (PNCS)*. Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. <https://www.dgav.pt/animais/conteudo/animais-de-producao/aves-de-capoeira/saude-animal/doencas-das-aves/salmonelose-2/programas-nacionais-de-controlo-das-salmonelas-pncs/>

Diab, M. S., Thabet, A. S., Elsalam, M. A., Ewida, R. M., & Sotohy, S. A. (2023). Detection of Virulence and β -lactamase resistance genes of non-typhoidal *Salmonella* isolates from human and animal origin in Egypt "one health concern". *Gut pathogens*, 15, 16. <https://doi.org/10.1186/s13099-023-00542-3>

Dieckmann, R., & Malorny, B. (2011). Rapid Screening of Epidemiologically Important *Salmonella* enterica subsp. enterica Serovars by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), pp. 4136-4146. <https://doi.org/10.1128/AEM.02418-10>

Dinos, G. P. (2017). The macrolide antibiotic renaissance. *British Journal of Pharmacology*, 174(18), pp. 2967-2983. <https://doi.org/10.1111/bph.13936>

Direção-Geral da Saúde. (2019). *Plano Nacional de Combate à Resistência aos Antimicrobianos 2019-2023. Âmbito do conceito "Uma só saúde"*. Lisboa: DGS.

Do, K. H., Seo, K., & Lee, W. K. (2022). Antimicrobial resistance, virulence genes, and phylogenetic characteristics of pathogenic *Escherichia coli* isolated from patients and swine suffering from diarrhea. *BMC microbiology*, 22(1), 199. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02604-z>

Douglas, W. (2021). *The Polymerase Chain Reaction*. CK-12. https://www.ck12.org/c/biology/pcr/lesson/user:df8e5e0a9497/The-Polymerase-Chain-Reaction/?referrer=concept_details

E&O Laboratories. (2018). *Primary Chromogenic Coliform Agar (CCA)*. E&O Laboratories. <https://www.eolabs.com/product/pp6051-chromogenic-coliform-agar-cca/>

ECDC. (2016). *Rapid Risk Assessment: Plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae*. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/enterobacteriaceae-risk-assessment-diseases-caused-by-antimicrobial-resistant-microorganisms-europe-june-2016.pdf>

ECDC. (2022a). *STEC infection - Annual Epidemiological Report for 2021*. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/stec-infection-annual-epidemiological-report-2021>

ECDC. (2022b). *Salmonellosis - Annual Epidemiological Report for 2021*. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/salmonellosis-annual-epidemiological-report-2021>

ECDC. (2022c). *Assessing the health burden of infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU/EEA, 2016-2020*. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/health-burden-infections-antibiotic-resistant-bacteria-2016-2020>

EClinicalMedicine. (2021). Antimicrobial resistance: a top ten global public health threat. *eClinicalMedicine*, 41, 101221. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101221>

EFSA, & ECDC. (2021a). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(2), 6406. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>

EFSA, & ECDC. (2021b). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(12), 6971. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>

EFSA, & ECDC. (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 20(12), 7666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>

EFSA, & ECDC. (2023). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. *EFSA Journal*, 21(3), 7867. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7867>

EFSA. (2013). Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA Journal*, 11(4), 3138. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3138>

EFSA. (2014). *EFSA explains zoonotic diseases: Food-borne zoonotic diseases*. European Food Safety Authority. <https://www.efsa.europa.eu/en/corporate/pub/factsheetfood-bornezoonoses2014>

EFSA. (2017). EU Insights—Perceptions on the human health impact of antimicrobial resistance (AMR) and antibiotics use in animals across the EU. EFSA Supporting Publication. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1183>

EFSA. (2020). Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA Journal*, 18(1), e5967. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5967>

EFSA. (2022). *Story map on Salmonella*. European Food Safety Authority. <https://storymaps.arcgis.com/stories/13979918ca8948399180651d3b7ce3e1>

Ehuwa, O., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). *Salmonella*, Food Safety and Food Handling Practices. *Foods*, 10(5), 907. <https://doi.org/10.3390/foods10050907>

EMA. (2019). European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC). European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/overview/antimicrobial-resistance/european-surveillance-veterinary-antimicrobial-consumption-esvac>

EMA. (2020). *Categorisation of antibiotics used in animals promotes responsible use to protect public and animal health*. European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/news/categorisation-antibiotics-used-animals-promotes-responsible-use-protect-public-animal-health>

EMA. (2022). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2021*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.

EnteroBase. (2023). *The internal structure of EnteroBase*. EnteroBase. <https://enterobase.readthedocs.io/en/latest/pipelines/enterobase-pipelines.html>

Escherich, T. (1885). Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschritte der Medizin*, 3, pp. 515-522.

EUCAST. (2022). *Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. EUCAST. Version 12.0*. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents

EUCAST. (2023). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1*. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.1_Breakpoint_Tables.pdf

FAO, & WHO. (2022). Control measures for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) associated with meat and dairy products – Meeting report. *Microbiological Risk Assessment Series*, 39. <https://doi.org/10.4060/cc2402en>

FAO, & WHO. (2023). A guide to World Food Safety Day 2023: food standards save lives. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/world-food-safety-day/en/>

Fernandes, V., Cunha, E., Nunes, T., Silva, E., Tavares, L., Mateus, L., & Oliveira, M. (2022). Antimicrobial Resistance of Clinical and Commensal *Escherichia coli* Canine Isolates: Profile Characterization and Comparison of Antimicrobial Susceptibility Results According to Different Guidelines. *Veterinary Sciences*, 9, 284. <https://doi.org/10.3390/vetsci9060284>

Figueiredo, R., Card, R. M., Nunez, J., Pomba, C., Mendonça, N., Anjum, M. F., & Da Silva, G. J. (2016). Detection of an *mcr-1* -encoding plasmid mediating colistin resistance in

Salmonella enterica from retail meat in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(8), pp. 2338-2340. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw240>

Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2020). Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. *Protein Science*, 29(3), pp. 629-646. <https://doi.org/10.1002/pro.3737>

Florensa, A. F., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Aytan-Aktug, D., & Aarestrup, F. M. (2022). ResFinder - an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial genomics*, 8(1), 000748. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000748>

Food and Drug Administration. (2012). *Bad Bug Book, Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins* (2^a ed.). FDA.

Fujioka, M., Otomo, Y., & Ahsan, C. R. (2013). A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. *Journal of microbiological methods*, 92(3), pp. 289-292. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.12.010>

Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral (2022). *Atividade Suinícola - Diagnóstico do setor e propostas de medidas de promoção da sustentabilidade da atividade suinícola*. Lisboa: GPP.

Gambino, D., Gargano, V., Butera, G., Sciortino, S., Pizzo, M., Oliveri, G., Cardamone, C., Piraino, C., Cassata, G., Vicari, D., & Costa, A. (2022). Food Is Reservoir of MDR *Salmonella*: Prevalence of ESBLs Profiles and Resistance Genes in Strains Isolated from Food. *Microorganisms*, 10, 780. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040780>

Geurtsen, J., de Been, M., Weerdenburg, E., Zomer, A., McNally, A., & Poolman, J. (2022). Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(6), fuac031. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac031>

Ghafir, Y., China, B., Dierick, K., De Zutter, L., & Daube, G. (2008). Hygiene Indicator Microorganisms for Selected Pathogens on Beef, Pork, and Poultry Meats in Belgium. *Journal of Food Protection*, 71(1), pp. 35-45. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.1.35>

Giufre, M., Mazzolini, E., Cerquetti, M., Brusaferro, S., & CCM2015 One-Health ESBL-producing *Escherichia coli* Study Group. (2021). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from extraintestinal infections in humans and from food-producing animals in Italy: a 'One Health' study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 58(5), 106433. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106433>

Gomes-Neves, E., Antunes, P., Manageiro, V., Gärtner, F., Caniça, M., da Costa, J. M. C., & Peixe, L. (2014). Clinically relevant multidrug resistant *Salmonella enterica* in swine and meat handlers at the abattoir. *Veterinary Microbiology*, 168(1), pp. 229-233. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.10.017>

Gomes, V. T. M., Moreno, L. Z., Silva, A. P. S., Thakur, S., La Ragione, R. M., Mather, A. E., & Moreno, A. M. (2022). Characterization of *Salmonella enterica* Contamination in Pork

and Poultry Meat from São Paulo/Brazil: Serotypes, Genotypes and Antimicrobial Resistance Profiles. *Pathogens*, 11(3), 358. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030358>

González, R. D., Tamagnini, L. M., Olmos, P. D., & de Sousa, G. B. (2003). Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods. *Food Microbiology*, 20(5), pp. 601–604. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00178-8](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00178-8)

Graziani, C., Losasso, C., Luzzi, I., Ricci, A., Scavia, G., & Pasquali, P. (2017). *Salmonella*. In: Dodd, C. E. R., Aldsworth, T., Stein, R. A., Cliver, D. O., & Riemann, H. P. (eds.). *Foodborne Diseases*. Elsevier, pp.133-169. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00005-X>

Grimont, P. A. D., & Weill, F. X. (2007). *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars* (9^a ed.). Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institute Pasteur.

Hames, D., & Hooper, N. (2005). *Biochemistry* (3^a ed.). New York: Taylor & Francis Group.

Health Emergency Preparedness and Response Authority. (2022). *HERA factsheet - HEALTH UNION: Identifying top 3 priority health threats*. European Commission. https://health.ec.europa.eu/publications/hera-factsheet-health-union-identifying-top-3-priority-health-threats_en

Healthmatch. (2022, Agosto 31). *Is Antimicrobial Resistance The Next Health Crisis?* Healthmatch. <https://healthmatch.io/blog/antimicrobial-resistance-next-health-crisis>

Hemalata, V. B., & Virupakshaiah, D. B. M. (2016). Isolation and Identification of food borne pathogens from Spoiled food samples. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(6), pp. 1017-1025. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.108>

Higgins, J., Hohn, C., Hornor, S., Frana, M., Denver, M., & Joerger, R. (2007). Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. *Journal of Microbiological Methods*, 70(2), pp. 227-235. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.04.009>

Holmer, I., Salomonsen, C. M., Jorsal, S. E., Astrup, L. B., Jensen, V. F., Høg, B. B., & Pedersen, K. (2019). Antibiotic resistance in porcine pathogenic bacteria and relation to antibiotic usage. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 449, pp. 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2162-8>

Honish, L., Punja, N., Nunn, S., Nelson, D., Hislop, N., Gosselin, G., Stashko, N., & Dittich, D. (2017). *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Contaminated Pork Products — Alberta, Canada, July–October 2014. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(52), pp. 1477-1481. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6552a5>

Hu, J., Li, J., Huang, X., Xia, J., Cui, M., Huang, Y., Wen, Y., Xie, Y., Zhao, Q., Cao, S., Zou, L., & Han, X. (2023). Genomic traits of multidrug resistant enterotoxigenic *Escherichia*

coli isolates from diarrheic pigs. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1244026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1244026>

Hudzicki, J. (2010, Novembre 1). Hektoen Enteric Agar Protocol. *American Society for Microbiology*. <https://asm.org/protocols/hektoen-enteric-agar-protocol>

Ibrahim, G. M., & Morin, P. M. (2018). *Salmonella* Serotyping Using Whole Genome Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2993. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02993>

ICMSF. (1996). *Microorganisms in Foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens*. London: Blackie Academic & Professional.

Instituto Superiore di Sanità. (2013). *Detection of Enteroinvasive Escherichia coli in food by Real Time PCR amplification of the ipaH gene*. Instituto Superiore di Sanità. https://www.iss.it/documents/20126/0/EURL-VTEC_Method_07_Rev+0.pdf/c4da4642-00ab-d350-d942-8d4469225ede?t=1644309249941

International Organization for Standardization. (2001). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli. Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide* (ISO Standard No. 16649-2:2001). <https://www.iso.org/standard/29824.html>

International Organization for Standardization. (2007). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations* (ISO Standard No. 7218:2007). <https://www.iso.org/standard/36534.html>

International Organization for Standardization. (2017). *Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella. Part 1: Detection of Salmonella spp.* (ISO Standard No. 6579-1:2017). <https://www.iso.org/standard/56712.html>

Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., Nair, S., Fields, P. I., & Weill, F.-X. (2014). Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 165(7), pp. 526-530. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>

Jahantigh, M., Samadi, K., Dizaji, R. E., & Salari, S. (2020). Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 267. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02488-z>

Jajere, S. M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multi-drug resistance. *Veterinary World*, 12(4), pp. 504-521. <https://doi.org/10.14202/vet-world.2019.504-521>

- Jensen, H. B., Olsen, K. E., Struve, C., Krogfelt, K. A., & Petersen, A. M. (2014). Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 27(3), pp. 614-630. <https://doi.org/10.1128/CMR.00112-13>
- Joseph, A., Cointe, A., Mariani Kurkdjian, P., Rafat, C., & Hertig, A. (2020). Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review. *Toxins*, 12(2), 67. <https://doi.org/10.3390/toxins12020067>
- Kanokudom, S., Assawakongkarat, T., Aveda, Y., Ratthawongjirakul, P., Chuanchuen, R., & Chaichanawongsaroj, N. (2021). Rapid detection of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from fresh pork meat and pig cecum samples using multiplex recombinase polymerase amplification and lateral flow strip analysis. *PLoS ONE*, 16(3), e0248536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248536>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), pp. 123-140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Karimi, F. (2022). Safety of Food throughout the Supply Chain. In: Chelladurai, S. J. S., Mayilswamy, S., Gnanasekaran, S., Thirumalaisamy, R. (eds.). *Logistics Engineering*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.105670>
- Kauffmann, F. (1947). The serology of the coli group. *Journal of immunology*, 57(1), pp. 71-100.
- Kieffer, N., Aires-de-Sousa, M., Nordmann, P., & Poirel, L. (2017). High Rate of MCR-1–Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among Pigs, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 23(12), pp. 2023-2029. <https://doi.org/10.3201/eid2312.170883>
- Köhler, C. D., & Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*?. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(8), pp. 642-647. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.006>
- Kompes, G., Duvnjak, S., Reil, I., Hendriksen, R. S., Sørensen, L. H., Zdelar-Tuk, M., Habrun, B., Cvetni, L., Bagari, A., & Špišić, S. (2023). First Report and Characterization of the *mcr-1* Positive Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strain Isolated from Pigs in Croatia. *Microorganisms*, 11(10), 2442. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102442>
- Kudva, I. T., Cornick, N. A., Plummer, P. J., Zhang, Q., Nicholson, T. L., Bannantine, J. P., & Bellaire, B. H. (2020). *Virulence mechanisms of bacterial pathogens* (5^a ed.). Washington, DC: ASM Press.
- Lamas, A., Miranda, J. M., Regal, P., Vázquez, B., Franco, C. M., & Cepeda, A. (2018). A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiological Research*, 206, pp. 60-73. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.010>
- Lauteri, C., Festino, A. R., Conter, M., & Vergara, A. (2022). Prevalence and antimicrobial resistance profile in *Salmonella* spp. isolates from swine food chain. *Italian journal of food safety*, 11(2), 9980. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2022.9980>

Leão, C., Clemente, L., Moura, L., Seyfarth, A. M., Hansen, I. M., Hendriksen, R. S., Amaro, A. (2021). Emergence and clonal spread of CTX-M-65-Producing *Escherichia coli* from retail meat in Portugal. *Frontiers in Microbiology*, 12, 653595. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.653595>

Lee, M. S., Yoon, J. W., & Tesh, V. L. (2020). Editorial: Recent Advances in Understanding the Pathogenesis of Shiga Toxin-Producing *Shigella* and *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 620703. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.620703>

Lima, T., Fernandes, L., Matias, M., Mateus, A., Silveira, E., Domingues, S., Pomba, C., & Da Silva, G. J. (2022). Longitudinal Study Detects the Co-Carriage of ESBL and *mcr-1* and -4 Genes in *Escherichia coli* Strains in a Portuguese Farrow-to-Finish Swine Herd. *Animals*, 12(17), 2209. <https://doi.org/10.3390/ani12172209>

Lindsey, R. L., Prasad, A., Feldgarden, M., Gonzalez-Escalona, N., Kapsak, C., Klimke, W., Melton-Celsa, A., Smith, P., Souvorov, A., Truong, J., & Scheutz, F. (2023). Identification and Characterization of ten *Escherichia coli* Strains Encoding Novel Shiga Toxin 2 Subtypes, Stx2n as Well as Stx2j, Stx2m, and Stx2o, in the United States. *Microorganisms*, 11(10), 2561. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102561>

Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H., & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), pp. 161-168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)

Liu, C. M., Stegger, M., Aziz, M., Johnson, T. J., Waits, K., Nordstrom, L., Gauld, L., Weaver, B., Rolland, D., Statham, S., Horwinski, J., Sariya, S., Davis, G. S., Sokurenko, E., Keim, P., Johnson, J. R., & Price, L. B. (2018). *Escherichia coli* ST131-H22 as a Foodborne Uropathogen. *mBio*, 9(4), e00470-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00470-18>

Lugsomya, K., Yindee, J., Niyomtham, W., Tribuddharat, C., Tummaruk, P., Hampson, D. J., & Prapasarakul, N. (2018). Antimicrobial Resistance in Commensal *Escherichia coli* Isolated from Pigs and Pork Derived from Farms Either Routinely Using or Not Using In-Feed Antimicrobials. *Microbial Drug Resistance*, 24(7), pp. 1054–1066. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0154>

Lupindu, A. M. (2017). Isolation and Characterization of *Escherichia coli* from Animals, Humans, and Environment. In: Samie, A. (ed.). *Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/67390>

Ma, S., Lei, C., Kong, L., Jiang, W., Liu, B., Men, S., Yang, Y., Cheng, G., Chen, Y., & Wang, H. (2017). Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Relatedness of *Salmonella* Isolated

from Chickens and Pigs on Farms, Abattoirs, and Markets in Sichuan Province, China. *Food-borne pathogens and disease*, 14(11), pp. 667-677. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2264>

Ma, J., Zhou, W., Wu, J., Liu, X., Lin, J., Ji, X., Lin, H., Wang, J., Jiang, H., Zhou, Q., Zhao, G., Yang, H., & Tang, B. (2022). Large-Scale Studies on Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of *Escherichia coli* from Food Animals in Developed Areas of Eastern China. *Microbiology spectrum*, 10(4), e0201522. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02015-22>

Machado-Moreira, B., Richards, K., Brennan, F., Abram, F., & Burgess, C. M. (2019). Microbial Contamination of Fresh Produce: What, Where, and How?. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 18(6), pp. 1727-1750. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12487>

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), pp. 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

Maio, R., García-Díez, J., & Saraiva, C. (2020). Microbiological Quality of Foodstuffs Sold on Expiry Date at Retail in Portugal: A Preliminary Study. *Foods*, 9(7), 919, pp. 1-12. <https://doi.org/10.3390/foods9070919>

Manyi-Loh, C. E., & Lues, R. (2023). A South African Perspective on the Microbiological and Chemical Quality of Meat: Plausible Public Health Implications. *Microorganisms*, 11(10), 2484. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102484>

Marín, C., Chinillac, M. C., Cerdà-Cuellar, M., Montoro-Dasi, L., Sevilla-Navarro, S., & Ayats, T. (2020). Contamination of pig carcass with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant 1,4[5],12:i:- originates mainly in live animals. *The Science of the Total Environment*, 703, 134609. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134609>

Martelli, F., Oastler, C., Barker, A., Jackson, G., Smith, R. P., & Davies, R. (2021). Abattoir-based study of *Salmonella* prevalence in pigs at slaughter in Great Britain. *Epidemiology and Infection*, 149, e218. <https://doi.org/10.1017/S0950268821001631>

Martínez-Vázquez, A. V., Rivera-Sánchez, G., Lira-Méndez, K., Reyes-López, M. Á., & Bocanegra-García, V. (2018). Prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from retail meat in Tamaulipas, Mexico. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 14, pp. 266-272. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.02.016>

Massella, E., Giacometti, F., Bonilauri, P., Reid, C. J., Djordjevic, S. P., Meriardi, G., Bacci, C., Fiorentini, L., Massi, P., Bardasi, L., Rubini, S., Savini, F., Serraino, A., & Piva, S. (2021). Antimicrobial Resistance Profile and ExPEC Virulence Potential in Commensal *Escherichia coli* of Multiple Sources. *Antibiotics*, 10(4), 351. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040351>

Matuschek, E., Brown, D. F. J., & Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), pp. 255-266. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12373>

Meena, P. R., Priyanka, P., & Singh, A. P. (2022). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) reservoirs, and antibiotics resistance trends: a one-health surveillance for risk analysis from “farm-to-fork”. *Letters in Applied Microbiology*, 76(1), ovac016. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovac016>

Meng, J., Doyle, M. P., Zhao, T., & Zhao, S. (2007). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Doyle, M. P. e Beuchat, L. R. *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers* (eds.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 249-271.

Meridian. (2023). *ISOLATE II Genomic DNA Kit*. bioline. <https://www.bioline.com/isolate-ii-genomic-dna-kit.html>

Meyer, M., & Kircher, M. (2010). Illumina Sequencing Library Preparation for Highly Multiplexed Target Capture and Sequencing. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb.prot5448. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5448>

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

Moura-Alves, M., Carvalho, M., Baggio Ribeiro, D. H., Barbosa, J., Silveira, L., Pista, Â., Pinto, H. P., Saraiva, C., Teixeira, P., & Esteves, A. (2022). Hygiene Indicators and Salmonellae on Surfaces of Swine Carcasses from Two Slaughterhouses in Northern Portugal. *Journal of food protection*, 85(11), pp. 1566-1575. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-312>

Mullis, K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262 (4), pp. 56-61.

Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), pp. 142-201. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.142>

Nguyen, T. V., Le Van, P., Le Huy, C., Gia, K. N., & Weintraub, A. (2005). Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), pp. 755-760. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.755-760.2005>

Nikiema, M. E. M., Kakou-Ngazona, S., Ky/Ba, A., Sylla, A., Bako, E., Addablah, A. Y. A., Ouoba, J. B., Sampo, E., Gnada, K., Zongo, O., Traoré, K. A., Sanou, A., Bonkoungou, I. J. O., Ouédraogo, R., Barro, N., & Sangaré, L. (2021). Characterization of virulence factors of *Salmonella* isolated from human stools and street food in urban areas of Burkina Faso. *BMC microbiology*, 21(1), 338. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02398-6>

O'Neill J. (2016). *Review on Antimicrobial Resistance: Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations*. London: HM Government & Wellcome Trust

O'Neill L, Manzanilla EG, Ekhlas D, Leonard FC. (2023). Antimicrobial Resistance in Commensal *Escherichia coli* of the Porcine Gastrointestinal Tract. *Antibiotics*, 12(11), 1616. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111616>

Ogundare, S. T., Fasanmi, O. G., & Fasina, F. O. (2018). Risk Factors for Prevalence of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in Diarrheic and Non-diarrheic Neonatal and Weaner Pigs, South Africa. *Biomedical and environmental sciences: BES*, 31(2), pp. 149-154. <https://doi.org/10.3967/bes2018.018>

OIE. (2021). *OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance*. World Organisation for Animal Health. <https://www.woah.org/app/uploads/2021/06/a-oie-list-antimicrobials-june2021.pdf>

Pakbin, B., Brück, W. M., & Rossen, J. W. A. (2021a). Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9922. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>

Pakbin, B., Allahyari, S., Amani, Z., Brück, W. M., Mahmoudi, R., & Peymani, A. (2021b). Prevalence, Phylogroups and Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* Isolates from Food Products. *Antibiotics*, 10(11), 1291. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111291>

Pardos de la Gandara, M., Fournet, N., Bonifait, L., Lefèvre, S., Chemaly, M., Grastilleur, C., Cadel-Six, S., Fach, P., Pignault, A., Brisabois, A., Jourdan-Da Silva, N., & Weill, F. X. (2023). Countrywide multi-serotype outbreak of *Salmonella* Bovismorbificans ST142 and monophasic *Salmonella* Typhimurium ST34 associated with dried pork sausages in France, September 2020* to January 2021. *Euro surveillance: European communicable disease bulletin*, 28(2), 2200123. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.2.2200123>

Parija, S. C. (2012). *Textbook of Microbiology & Immunology* (2^a ed.). Elsevier.

Passadouro, R. (2021, Novembro 18). *Resistência aos antibióticos - Um problema de Saúde Pública?* ANMSP. <https://www.anmsp.pt/post/resistencia-aos-antibioticos-um-problema-de-saude-publica>

Perry, L., Heard, P., Kane, M., Kim, H., Savikhin, S., Domínguez, W., & Applegate, B. (2007). Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 15(2), pp. 176-198. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2007.00083.x>

Persson, S., Olsen, K. E., Scheutz, F., Krogfelt, K. A., & Gerner-Smidt, P. (2007). A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13(5), pp. 516-524. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01692.x>

Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2928. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>

Pławinska-Czarnak, J., Wódz, K., Kizerwetter-wida, M., Bogdan, J., Kwieciński, P., Nowak, T., Strzałkowska, Z., & Anusz, K. (2022). Multi-Drug Resistance to *Salmonella* spp. When Isolated from Raw Meat Products. *Antibiotics*, 11(7), 876. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070876>

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

Poli, G., Cocilovo, A., Dell'Ara, P. E., Martino, P. A., & Ponti, W. (2005). *Microbiologia e immunologia veterinaria*. Torino: UTET Scienze Mediche.

Qamar, M. U., Aatika, Chughtai, M. I., Ejaz, H., Mazhari, B. B. Z., Maqbool, U., Alanazi, A., Alruwaili, Y., & Junaid, K. (2023). Antibiotic-Resistant Bacteria, Antimicrobial Resistance Genes, and Antibiotic Residue in Food from Animal Sources: One Health Food Safety Concern. *Microorganisms*, 11(1), 161. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010161>

Rajaei, M., Moosavy, M.-H., Gharajalar, S. N., & Khatibi, S. A. (2021). Antibiotic resistance in the pathogenic foodborne bacteria isolated from raw kebab and hamburger: phenotypic and genotypic study. *BMC Microbiology*, 21, 272. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02326-8>

Ramos, S., Silva, V., Dapkevicius, M. de L. E., Caniça, M., Tejedor-Junco, M. T., Igrejas, G., & Poeta, P. (2020). *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Production. *Animals*, 10(12), 2239. <https://doi.org/10.3390/ani10122239>

RASFF. (2017). Rapid Alert System for Food and Feed. https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en

Ray, S., Das, S., & Suar, M. (2017). Molecular Mechanism of Drug Resistance. In: Arora G., Sajid, A., Kalia, V. C. (eds.). *Drug Resistance in Bacteria, Fungi, Malaria, and Cancer* (pp. 47-110). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48683-3_3

Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S. A., De Frutos Escobar, C., Malhotra-Kumar, S., Villa, L., Carattoli, A., & Hendriksen, R. S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveil-

lance purposes. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 23(6), 17-00672. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>

Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends In Microbiology*, 22(8), pp. 438-445. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>

Rega, M., Andriani, L., Cavallo, S., Bonilauri, P., Bonardi, S., Conter, M., Carmosino, I., & Bacci, C. (2022). Antimicrobial Resistant *E. coli* in Pork and Wild Boar Meat: A Risk to Consumers. *Foods*, 11(22), 3662. <https://doi.org/10.3390/foods11223662>

Rega, M., Andriani, L., Poeta, A., Bonardi, S., Conter, M., & Bacci, C. (2023). The Pork Food Chain as a Route of Transmission of Antimicrobial Resistant *Escherichia coli*: A Farm-to-Fork Perspective. *Antibiotics*, 12(2), 376. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020376>

Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão, de 15 de novembro de 2005. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 338, pp. 9-17

Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 139, pp. 1-23

Regulamento (CE) n.º 1441/2007 da Comissão, de 5 de dezembro de 2007. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 322, pp. 15-22

Regulamento (UE) n.º 2019/6 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 11 de dezembro de 2018. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 4, pp. 104-105

Reid, C. J., DeMaere, M. Z., & Djordjevic, S. P. (2019). Australian porcine clonal complex 10 (CC10) *Escherichia coli* belong to multiple sublineages of a highly diverse global CC10 phylogeny. *Microbial Genomics*, 5(3), e000225. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000225>

Remfry, S. E., Amachawadi, R. G., Shi, X., Bai, J., Tokach, M. D., Dritz, S. S., Goodband, R. D., Derouchey, J. M., Woodworth, J. C., & Nagaraja, T. G. (2021). Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* in Feces of Finisher Pigs: Isolation, Identification, and Public Health Implications of Major and Minor Serogroups. *Journal of Food Protection*, 84(1), pp. 169-180. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-329>

Renaudeau, D., & Dourmad, J. Y. (2022). Review: Future consequences of climate change for European Union pig production. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 16, 100372. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100372>

Ritter, G. D., Acuff, G. R., Bergeron, G., Bourassa, M. W., Chapman, B. J., Dickson, J. S., Opengart, K., Salois, M. J., Singer, R. S., & Storrs, C. (2019). Antimicrobial-resistant bacterial infections from foods of animal origin: understanding and effectively communicating to consumers. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1441(1), pp. 40-49. <https://doi.org/10.1111/nyas.14091>

Roasto, M., Bonardi, S., Mäesaar, M., Alban, L., Gomes-Neves, E., Vieira-Pinto, M., Vågsholm, I., Elias, T., Lindegaard, L. L., & Blagojevic, B. (2023). *Salmonella enterica* prevalence, serotype diversity, antimicrobial resistance and control in the European pork production chain. *Trends in Food Science & Technology*, 131, pp. 210-219. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.12.007>

Roberts, M. C., & Schwarz, S. (2016). Tetracycline and Phenicol Resistance Genes and Mechanisms: Importance for Agriculture, the Environment, and Humans. *Journal of environmental quality*, 45(2), pp. 576-592. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.04.0207>

Robertson, J., Yoshida, C., Kruczkiewicz, P., Nadon, C., Nichani, A., Taboada, E. N., & Nash, J. H. E. (2018). Comprehensive assessment of the quality of *Salmonella* whole genome sequence data available in public sequence databases using the *Salmonella in silico* Typing Resource (SISTR). *Microbial Genomics*, 4(2), e000151. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000151>

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

Sabat, G., Rose, P., Hickey, W. J., & Harkin, J. M. (2000). Selective and Sensitive Method for PCR Amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA Genes in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), pp. 844-849. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.844-849.2000>

Sabry, M. A., Abdel-Moein, K. A., Abdel-Kader, F., & Hamza, E. (2020). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella* serovars among healthy and diseased chickens and their public health implication. *Journal of global antimicrobial resistance*, 22, pp. 742-748. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.019>

Sagar, P., Aseem, A., Banjara, S. K., & Veleri, S. (2023). The role of food chain in antimicrobial resistance spread and One Health approach to reduce risks. *International Journal of Food Microbiology*, 391-393, 110148. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110148>

Saiki, R. K. (1989). The Design and Optimization of the PCR. In: Erlich, H. A. (ed.). *PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification* (1^a ed.). United Kingdom: Palgrave Macmillan. <https://doi.org/10.1007/978-1-349-20235-5>

Salmon, D. E. (1884). The discovery of the germ of swine-plague. *Science*, 3(53), pp. 155-158. <https://doi.org/10.1126/science.ns-3.53.155>

Samtiya, M., Matthews, K. R., Dhewa, T., & Puniya, A. K. (2022). Antimicrobial Resistance in the Food Chain: Trends, Mechanisms, Pathways, and Possible Regulation Strategies. *Foods*, 11(19), 2966. <https://doi.org/10.3390/foods11192966>

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), pp. 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., BuglaPloskonska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence, and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens*, 11, 10. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>

Scheinberg, J. A., Dudley, E. G., Campbell, J., Roberts, B., DiMarzio, M., DebRoy, C., & Cutter, C. N. (2017). Prevalence and Phylogenetic Characterization of *Escherichia coli* and Hygiene Indicator Bacteria Isolated from Leafy Green Produce, Beef, and Pork Obtained from Farmers' Markets in Pennsylvania. *Journal of food protection*, 80(2), pp. 237-244. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-282>

Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N. A., Melton-Celsa, A. R., Sanchez, M., Persson, S., & O'Brien, A. D. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), pp. 2951-2963. <https://doi.org/10.1128/JCM.00860-12>

Schill, F., Abdulmawjood, A., Klein, G., & Reich, F. (2017). Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in fresh pork meat at processing level in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 257, pp. 58-66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.010>

Schink, A. K., Kadlec, K., Kaspar, H., Mankertz, J., & Schwarz, S. (2013). Analysis of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates collected in the GERM-Vet monitoring programme. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(8), pp. 1741-1749. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt123>

Seo, K., Do, K. H., & Lee, W. K. (2022). Molecular characteristics of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from suckling piglets with colibacillosis. *BMC microbiology*, 22, 216. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02632-9>

Seo, K. W., Do, K. H., Shin, M. K., Lee, W. K., & Lee, W. K. (2023). Comparative genetic characterization of CMY-2-type beta-lactamase producing pathogenic *Escherichia coli* isolated from humans and pigs suffering from diarrhea in Korea. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 22, 7. <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00559-1>

Serrano, N. S., Zweifel, C., Corti, S., & Stephan, R. (2018). Microbiological quality and presence of foodborne pathogens in raw milk cheeses and raw meat products marketed at farm level in Switzerland. *Italian Journal of Food Safety*, 7(2), 7337. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.7337>

Shane, A. L., Mody, R. K., Crump, J. A., Tarr, P. I., Steiner, T. S., Kotloff, K., Langley, J. M., Wanke, C., Warren, C. A., Cheng, A. C., Cantey, J., & Pickering, L. K. (2017). 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management

of Infectious Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*, 65(12), e45–e80. <https://doi.org/10.1093/cid/cix669>

Shen, J., Zhi, S., Guo, D., Jiang, Y., Xu, X., Zhao, L., & Lv, J. (2022a). Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Whole Genome Sequencing Analysis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) and Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Imported Foods in China during 2015–2021. *Toxins*, 14(2), 68. <https://doi.org/10.3390/toxins14020068>

Shen, W., Chen, H., Geng, J., Wu, R. A., Wang, X., & Ding, T. (2022b). Prevalence, serovar distribution, and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. isolated from pork in China: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 361, 109473. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109473>

Singh, Y., Saxena, A., Kumar, R., & Saxena, M. K. (2018). Virulence System of *Salmonella* with Special Reference to *Salmonella enterica*. In: Mascellino, M., T. (ed.). *Salmonella - A Re-emerging Pathogen*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77210>

Solabia Group. (2016a). *Chromogenic Coliform Agar (CCA)*. Solabia Group. https://www.solabia.com/Produto_283,9/BIOKAR-Diagnostics/CHROMOGENIC-COLI-FORM-AGAR-CCA.html?lang=WW

Solabia Group. (2016b). *Iris Salmonella®*. Solabia Group. https://www.solabia.com/br/Produto_121,9/Meios-De-Cultura/IRIS-SALMONELLA.html

Sora, V. M., Meroni, G., Martino, P. A., Soggiu, A., Bonizzi, L., & Zecconi, A. (2021). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. *Pathogens*, 10(11), 1355. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111355>

Statens Serum Institut. (2013). *Salmonella Antisera*. Statens Serum Institut. <https://www.oxfordbiosystems.com/Portals/0/PDF/SSI-Salmonella-antisera.pdf>

Stoppe, N. C., Silva, J. S., Carlos, C., Sato, M. I. Z., Saraiva, A. M., Ottoboni, L. M. M., & Torres, T. T. (2017). Worldwide Phylogenetic Group Patterns of *Escherichia coli* from Commensal Human and Wastewater Treatment Plant Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2512. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02512>

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

Talib, M. A. A., Radu, S., Kqueen, C. Y., & Ghazali, F. M. (2022). *Salmonella*: The Critical Enteric Foodborne Pathogen. In: Bhardwaj, S. B. (ed.). *Enterobacteria*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.103900>

Tamayo-Legorreta, E. M., García-Radilla, A., Moreno-Vázquez, E., Téllez-Figueroa, F., & Alpuche-Aranda, C. M. (2020). Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes isolated from a swine farm in a region of Morelos state, Mexico. *Salud Pública de México*, 63(1), pp. 34-41. <https://doi.org/10.21149/11268>

Thakur, N., Jain, S., Changotra, H., Shrivastava, R., Kumar, Y., Grover, N., & Vashist, J. (2018). Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes: Association of virulent genes, serogroups, and antibiotic resistance among moderate-to-severe diarrhea patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(5), e22388. <https://doi.org/10.1002/jcla.22388>

Tîrziu, E., Barbalan, G., Morar, A., Herman, V., Cristina, R. T., & Imre, K. (2020). Occurrence and Antimicrobial Susceptibility Profile of *Salmonella* spp. in Raw and Ready-To-Eat Foods and *Campylobacter* spp. in Retail Raw Chicken Meat in Transylvania, Romania. *Food-borne Pathogens and Disease*, 17(8), pp. 479-484. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2738>

Tseng, M., Fratamico, P. M., Bagi, L., Manzinger, D., & Funk, J. A. (2015). Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in swine: prevalence over the finishing period and characteristics of the STEC isolates. *Epidemiology and Infection*, 143(3), pp. 505-514. <https://doi.org/10.1017/S0950268814001095>

Urban-Chmiel, R., Marek, A., St pie -Py niak, D., Wieczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A., & Osek, J. (2022). Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review. *Antibiotics*, 11(8), 1079. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081079>

Uzairue, L. I., & Shittu, O. B. (2023). *Salmonella* enterica Transmission and Antimicrobial Resistance Dynamics across One-Health Sector. In: Huang, H., & Naushad, S. (eds.). *Salmonella - Past, Present and Future*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.109229>

van Bambeke, F., Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., & Tulkens, P. M. (2017). Mechanisms of Action. In: Cohen, J., Powderly, W. G., & Opal, S. M. (eds.). *Infectious Diseases*. Elsevier, pp. 1162-1180. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00137-4>

van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyzyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics:TIG*, 30(9), pp. 418-426. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>

Verraes, C., Van Boxtael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaetzen, M.-A., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J., & Herman, L. (2013). Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(7), pp. 2643-2669. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>

von Mentzer, A., Blackwell, G. A., Pickard, D., Boinett, C. J., Joffré, E., Page, A. J., Svennerholm, A.-M., Dougan, G., & Sjöling, Å. (2021). Long-read-sequenced reference genomes of the seven major lineages of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) circulating in modern time. *Scientific Reports*, 11(1), 9256. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88316-2>

Wall, B. A., Mateus, A., Marshall, L., & Pfeiffer D. U. (2016). *Drivers, dynamics and epidemiology of antimicrobial resistance in animal production*. FAO. <https://www.fao.org/documents/card/fr/c/d5f6d40d-ef08-4fcc->

Wang, R. F., Cao, W. W., & Cerniglia, C. E. (1997). A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology*, 83(6), pp. 727-736. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00300.x>

Wang, L., Zhang, S., Zheng, D., Fujihara, S., Wakabayashi, A., Okahata, K., Suzuki, M., Saeki, A., Nakamura, H., Hara-Kudo, Y., Kage-Nakadai, E., & Nishikawa, Y. (2017). Prevalence of Diarrheagenic *Escherichia coli* in Foods and Fecal Specimens Obtained from Cattle, Pigs, Chickens, Asymptomatic Carriers, and Patients in Osaka and Hyogo, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 70(4), pp. 464-469. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2016.486>

Wang, Y., Xu, C., Zhang, R., Chen, Y., Shen, Y., Hu, F., Liu, D., Lu, J., Guo, Y., Xia, X., Jiang, J., Wang, X., Fu, Y., Yang, L., Wang, J., Li, J., Cai, C., Yin, D., Che, J., Fan, R., Wang, Y., Qing, Y., Li, Y., Liao, K., Chen, H., Zou, M., Liang, L., Tang, J., Shen, Z., Wang, S., Yang, X., Wu, C., Xu, S., Walsh, T. R., & Shen, J. (2020). Changes in colistin resistance and *mcr-1* abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. *The Lancet. Infectious diseases*, 20(10), pp. 1161-1171. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30149-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30149-3)

Wasinski, B. (2019). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* – threat connected with food-borne infections. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 26(4), pp. 532-537. <https://doi.org/10.26444/aaem/111724>

WHO. (2015). *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007-2015*. Geneva: World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565165>

WHO. (2018a). *E. coli*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>

WHO. (2018b). *Whole genome sequencing for foodborne disease surveillance: landscape paper*. Geneva: World Health Organization

WHO. (2019). *Critically important antimicrobials for human medicine : 6th revision*. Geneva: World Health Organization

WHO. (2021). *Antimicrobial resistance*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

WHO. (2022). *Food safety*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

Yang, Q. E., Sun, J., Li, L., Deng, H., Liu, B. T., Fang, L. X., Liao, X. P., & Liu, Y. H. (2015). IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains from animals in China. *Frontiers in Microbiology*, 6, 964. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00964>

Yang, X., Wu, Y., Liu, Q., Sun, H., Luo, M., Xiong, Y., Matussek, A., Hu, B., & Bai, X. (2021). Genomic Characteristics of Stx2e-Producing *Escherichia coli* Strains Derived from Humans, Animals, and Meats. *Pathogens*, 10(12), 1551. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121551>

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

Ying, L., Zhu, H., Shoji, S., & Fredrick, K. (2019). Roles of specific aminoglycoside-ribosome interactions in the inhibition of translation. *RNA*, 25(2), pp. 247-254. <https://doi.org/10.1261/rna.068460.118>

Zhang, L., Fu, Y., Xiong, Z., Ma, Y., Wei, Y., Qu, X., Zhang, H., Zhang, J., & Liao, M. (2018). Highly Prevalent Multidrug-Resistant *Salmonella* From Chicken and Pork Meat at Retail Markets in Guangdong, China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2140. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02104>

Zhang, S., Abbas, M., Rehman, M. U., Huang, Y., Zhou, R., Gong, S., Yang, H., Chen, S., Wang, M., & Cheng, A. (2020). Dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) via integrons in *Escherichia coli*: A risk to human health. *Environmental Pollution*, 266, 115260. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115260>

Zhang, S., Abbas, M., Rehman, M. U., Wang, M., Jia, R., Chen, S., Liu, M., Zhu, D., Zhao, X., Gao, Q., Tian, B., & Cheng, A. (2021). Updates on the global dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli*: An emerging threat to public health. *Science of The Total Environment*, 799, 149280. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149280>

Zhang, Y., Tan, P., Zhao, Y., & Ma, X. (2022). Enterotoxigenic *Escherichia coli*: intestinal pathogenesis mechanisms and colonization resistance by gut microbiota. *Gut Microbes*, 14(1), e2055943. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2055943>

Zhou, Z., Alikhan, N. F., Sergeant, M. J., Luhmann N., Vaz C., Francisco A. P., Carrico J. A., Achtman, M. (2018). GrapeTree: Visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens, *Genome Research*, 28(9), pp. 1395-1404. <https://doi.org/10.1101/gr.232397.117>

Zhou, Z., Alikhan, N. F., Mohamed, K., Agama Study Group, Achtman, M. (2020). The Enterobase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny and *Escherichia* core genomic diversity, *Genome Research*, 2020(30), pp. 138-152. <https://doi.org/10.1101/gr.251678.119>

ANEXO: GENES DE VIRULÊNCIA UTILIZADOS NA CLASSIFICAÇÃO DE ExPEC

A **Figura A.1.** apresenta os genes de virulência utilizados no presente trabalho para a classificação dos isolados de *E. coli* como ExPEC.

Table 1 Virulence genes of ExPEC encoding adhesins, toxins and siderophores

Description	Virulence genes	Function	ExPEC pathotype
<i>Adhesins</i>			
Type 1 fimbriae	<i>fim</i>	Factor of colonization in extraintestinal infections, biofilm formation	UPEC, NMEC, SEPEC, APEC
Afimbrial adhesin	<i>afa</i>	The non-fibrous adhesin binds to the DAF receptor on the cell surface epithelium, hemagglutination capacity	UPEC
Dr fimbriae	<i>dra</i>	Binding to the DAF receptor on the surface epithelial cells and mediation of internalization bacteria to the host cells	UPEC
P fimbriae	<i>pap</i>	Stimulate the production of cytokines by T lymphocytes, colonization factor in extraintestinal infections	UPEC, SEPEC, APEC
S fimbriae	<i>sfa</i>	Adhesion to intestinal epithelial cells, kidney, lower urinary tract cells; facilitate the penetration of bacteria into the tissues	UPEC, NMEC
F1C fimbriae	<i>foc</i>	Adhesion to renal epithelial cells and endothelial cells of the bladder and kidneys	UPEC
Iha	<i>iha</i>	Iron-regulated-gene-homologue adhesion	UPEC
Mat	<i>mat</i>	Meningitis associated and temperature regulated fimbriae	NMEC
Curli fiber gene	<i>crl, csg</i>	Enable biofilm formation and promote pathogenicity	UPEC, SEPEC, APEC
Antigen43	<i>agn43(flu)</i>	Protein of autotransporter family, adhesion and biofilm development	UPEC
<i>Invasine</i>			
Ibe ABC	<i>ibeA,B,C</i>	Cell invasion into the host tissues	NMEC, SEPEC, APEC
<i>Iron uptake</i>			
Aerobactin	<i>iuc, aer</i>	Siderophore, acquisition of Fe ²⁺ + / 3 + in the host system	UPEC, APEC
Iron repressible protein	<i>irp</i>	Yersiniabactin synthesis	NMEC
Salmochelin	<i>iroN</i>	Siderophore receptor, use of Fe ions obtained from the body host	UPEC, NMEC, SEPEC, APEC
ChuA, Hma	<i>chu, hma</i>	Enable using of Fe from hemoglobin in the host system	UPEC, SEPEC
SitABC	<i>sitA,B,C</i>	Transportation of Fe, Mn	UPEC, APEC
<i>Protectins/serum resistance</i>			
Transfer protein	<i>traT</i>	Inhibition of the classical pathway of complement activity	NMEC, SEPEC, APEC
Capsula antigens	<i>KpsMI-neuA, KpsMII</i>	The protection factor against phagocytosis and the spreading factor	NMEC, SEPEC
Outer membrane protein	<i>omp</i>	Enable intracellular survival, evasion from the body's defense.	UPEC, NMEC
Increased serum survival	<i>iss</i>	The protection factor against phagocytosis	NMEC, SEPEC, APEC
ColV, CvaC	<i>colV, cvaC</i>	Factor facilitating colonization	NMEC, SEPEC, APEC
<i>Toxins</i>			
Serine protease autotransporter	<i>pic</i>	Degrades mucins, facilitates colonization epithelium, damages of the cell membrane	UPEC
Secreted autotransporter toxin	<i>sat</i>	Proteolytic toxin, effect cytotoxic—influences on cell vacuolization	UPEC
Vacuolating autotransporter toxin	<i>vat</i>	Proteolytic toxin, induces host cell vacuolization	UPEC, APEC
Hemolysin A	<i>hlyA</i>	Creating of pores in membranes of host cells (cell lysis)	UPEC
Cytotoxic necrotizing factor	<i>cnf</i>	Engaging in cell necrosis	UPEC, SEPEC
Cytolethal distending toxin	<i>cdt</i>	Cytolethal distending factor	SEPEC

Figura A.1. Genes de virulência utilizados na classificação de ExPEC (Sarowska *et al.*, 2019).

ANEXO: GENES DE VIRULÊNCIA DAS ESTIRPES DE *SALMONELLA* SPP. SUBMETIDAS A WGS

A **Figura B.1.** apresenta o mapa dos determinantes de virulência obtido após submissão dos *assemblies* de *Salmonella* spp. à plataforma *Virulence Factors of Pathogenic Bacteria*.

VFclass	Virulence factors	Related genes	CC10(Prediction)	CC28(Prediction)	CC47(Prediction)
			draft (draft)	draft (draft)	draft (draft)
Fimbrial adherence determinants	Agf/Csg	<i>csgG</i>	orf00183	orf01215	orf00673
	Bcf	<i>bcbB</i>	orf00007	orf02835	orf02090
		<i>bcbC</i>	orf00006	orf02836	orf02091
		<i>bcbD</i>	orf00005	orf02837	orf02092
	Fim	<i>fimC</i>		orf02589	orf01419
		<i>fimD</i>	orf00479	orf02588	orf01420
		<i>fimH</i>	orf00480	orf02587	orf01421
		<i>fimZ</i>	orf00481	orf02586	orf01422
	Lpf	<i>lpcC</i>	orf02885	orf01795	orf01772
		<i>lpcD</i>	orf02884	orf01796	orf01771
	Peg	<i>pegC</i>	orf00282		
		<i>pegD</i>	orf00283		
	Saf	<i>safB</i>	orf00719	orf00641	orf01247
		<i>safC</i>	orf00718	orf00642	orf01246
	Stb	<i>stbB</i>	orf00680		
		<i>stbC</i>	orf00681	orf00207	orf01293
		<i>stbD</i>	orf00682	orf00208	orf01292
	Stc	<i>stcC</i>		orf03245	orf02415
		<i>stcD</i>		orf03246	orf02414
	Std	<i>stdB</i>	orf03286	orf02876	orf00386
	Ste	<i>steF</i>	orf00718		
	Stf	<i>stfC</i>		orf01460	orf01170
		<i>stfD</i>		orf01459	orf01169
	Sth	<i>sthC</i>		orf02811	orf02075
		<i>sthD</i>	orf00680		
		<i>sthE</i>	orf00681	orf02809	orf02074
	Sti	<i>stiA</i>	orf00682		
		<i>stiC</i>		orf03313	orf00091
		<i>stiH</i>		orf03314	orf00090
	Stj	<i>stjB</i>	orf03286	orf02793	orf02093
Macrophage inducible genes	Mig-14	<i>mig-14</i>	orf00762	orf03044	orf02727
Magnesium uptake	Mig-5	<i>mig-5</i>			
	Mg2+ transport	<i>mgtB</i>	orf00831	orf01703	orf01852
Nonfimbrial adherence determinants		<i>mgtC</i>			
	MisL	<i>misL</i>	orf00835	orf01705	orf01850
	RatB	<i>ratB</i>	orf02083	orf03122	orf02814
	ShdA	<i>shdA</i>		orf03123, orf03124	orf02815, orf02816
Regulation	SinH	<i>sinH</i>	orf02086	orf03119	orf02811
	PhoPQ	<i>phoQ</i>	orf00116	orf01148	orf00727

Figura B.1. Mapa dos determinantes de virulência obtido após submissão dos *assemblies* à plataforma *Virulence Factors of Pathogenic Bacteria*.

VFclass	Virulence factors	Related genes	CC10(Prediction)	CC26(Prediction)	CC47(Prediction)
			draft (draft)	draft (draft)	draft (draft)
Secretion system	TTSS (SPI-1 encode)	hilA	orf01371	orf02982	orf02671
		hilC	orf01377	orf02985	orf02674
		hilD	orf01372	orf02983	orf02672
		invA	orf01357	orf02969	orf02660
		invC	orf01358	orf02970	orf02661
		invE	orf01356	orf02968	orf02659
		invG	orf01355	orf02967	orf02658
		invJ	orf01359	orf02971	orf02662
		prgH	orf01374	orf02984	orf02673
		sipD	orf01367	orf02979	orf02668
		spaO	orf01360	orf02972	orf02663
		spaP	orf01361		
		spaQ	orf01362	orf02974	
		spaR	orf01363	orf02975	orf02664
		spaS	orf01364	orf02976	orf02665
	TTSS (SPI-2 encode)	ssaC	orf00984	orf01030	orf00816
		ssaD	orf00985	orf01029	orf00817
		ssaG	orf00993		
		ssaH	orf00994	orf01024	
		ssaL	orf00997	orf01022	orf00820
		ssaN	orf00999	orf01020	orf00822
		ssaQ	orf01000	orf01018	orf00823
		ssaR		orf01017	
		ssaS	orf01002	orf01016	
		ssaT	orf01003		
		ssaU	orf01004	orf01014	orf00824
		ssaV	orf00998	orf01021	orf00821
		sseC	orf00988	orf01027	orf00818
		sseD	orf00989		
		sseE	orf00990		
	TTSS effectors translocated via both systems	ssrA	orf00983	orf01031	orf00815
		slrP	orf00374	orf01944	orf01079
	TTSS-1 translocated effectors	avrA	orf01378	orf02986	orf02675
		sipA	orf01368	orf02980	orf02669
		sipB	orf01365	orf02977	orf02666
		sipC	orf01366	orf02978	orf02667
		sopA	orf02771	orf02102	orf02349
		sopB/sigD	orf01415	orf01246	orf00648
		sopD	orf03349	orf02938	orf02637
	TTSS-2 translocated effectors	sptP	orf01370	orf02981	orf02670
		gogB		orf03067	orf02762
		pipB2	orf00760	orf03047	orf02729
		pipB	orf01417	orf01247	orf00647
		sifA	orf00122	orf01154	orf00721
		sifB	orf03144	orf00883	orf00912
		sseF	orf00991	orf01025	orf00819
		sseG	orf00992		
		ssel/srH		orf01269	orf00630
		sseJ	orf03121	orf00863	orf00929
		sseK1		orf01960	orf01620
		sseK2		orf03255	orf02406
		sseL	orf01704	orf00239	orf02500
		sspH2	orf02450		orf01886
		spvB			orf01608
Toxin	SpvB	spvB			
Invasion	Invasion of brain endothelial cells (Ibes)(Escherichia)	ibeB		orf00351	
Adherence	Afimbrial adhesin AFA-I(Escherichia)	afaB	orf03264		
		afaC	orf03263		
Autotransporter	EhaB	ehaB	orf01284		

Figura B.1. Mapa dos determinantes de virulência obtidos após submissão dos *assemblies* à plataforma *Virulence Factors of Pathogenic Bacteria* (continuação).



2023

CARLOTA GONÇALVES

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ESTIRPES DE *ESCHERICHIA COLI* E *SALMONELLA* SPP. ISOLADAS EM SUÍNOS
E CARNES CRUAS PARA CONSUMO, EM PORTUGAL