



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RISCOS DA ALIMENTAÇÃO DE VITELOS COM LEITE NÃO APROVEITADO PARA
CONSUMO HUMANO

INÊS BENTO REBELO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Pedro da Costa Cardoso e Lemos

Doutor George Thomas Stilwell

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

ORIENTADOR

Dr. José Caeiro Esteves

CO-ORIENTADOR

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

2014

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RISCO DA ALIMENTAÇÃO DE VITELÓS COM LEITE NÃO APROVEITADO PARA CONSUMO HUMANO

Inês Bento Rebelo

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Pedro da Costa Cardoso e Lemos

Doutor George Thomas Stilwell

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

ORIENTADOR

Dr. José Caeiro Esteves

CO-ORIENTADOR

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

2014

LISBOA

Aos “Tios” com grande saudade.

Agradecimentos

- Um especial e sincero agradecimento a toda a Direção da Proleite por me ter proporcionado a oportunidade única de estagiar nesta cooperativa que tanto me ensinou.
- Ao Dr. Pinheiro, Dr. Júlio, Dr. Vilela, Eng. Maria José e a todos os restantes membros da “equipa” Proleite por me receberem tão bem, integrarem no seu dia-a-dia e terem tanta paciência e disponibilidade para me ensinarem e aturarem dias a fio.
- À minha mãe e tia Dódó por todo o apoio na realização desta tese.
- Ao Gonçalo pela ajuda (mesmo que tantas vezes sobre chantagem).
- E por último, mas de todo o mais importante, ao Dr. Esteves e ao Dr. Ricardo Bexiga por me proporcionar esta oportunidade, pela constante disponibilidade, empenho e enorme apoio ao longo de todo o trabalho.

RESUMO

Risco da alimentação de vitelos com leite não aproveitado para consumo humano

Com este estudo pretendeu-se avaliar a suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli*, obtidos a partir de fezes de vitelos, e a sua relação com diferentes formas de manejo utilizadas nas explorações.

Fizeram parte deste trabalho 37 explorações bastante diferentes entre si, quer quanto à dimensão (desde 16 até 715 vacas em ordenha), quer em relação às práticas de manejo e alojamento dos vitelos, apresentando em média 160 animais em ordenha no dia da realização do questionário integrante deste estudo.

Os dados usados no trabalho foram obtidos através de um questionário elaborado para o efeito e de amostras de fezes de vitelos de raça Holstein-Frísia das diferentes explorações. O questionário era constituído por 21 perguntas de escolha múltipla ou resposta curta, de forma a caracterizar a exploração e as suas práticas habituais, tendo os dados obtidos sido processados em Excel®. As amostras foram obtidas por recolha direta a partir da ampola retal removendo-se deste modo uma pequena porção de fezes para a qual contribuíram 5 ± 1 vitelos para cada amostra. A partir destas obtiveram-se 162 isolados de *E.coli*, identificados presuntivamente através de galeria IMViC. Os testes de suscetibilidade foram efetuados através do método de difusão, por discos com os seguintes antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg), enrofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), sulfametoxazole/ trimetoprim (23,7/1,25 µg) e ceftiofur (30 µg). Os resultados foram interpretados de acordo com as normas M31-A3 (CLSI, 2008).

Os resultados obtidos mostraram que a resistência dos isolados de *E. coli* foi de 31,1% a amoxicilina/ácido clavulânico, 33,1% a enrofloxacina, 17,2% a gentamicina, 76,2%, a tetraciclina, 49,7% a sulfametoxazole/ trimetoprim e 57,6% a ceftiofur.

Dezasseis dos 151 isolados foram considerados suscetíveis (11%), 33 apresentaram-se com resistência simples (21,9%), 28 com resistência múltipla (18,5%) e 74 multirresistentes (49%).

Foi possível estabelecer uma relação entre a administração de leite de desperdício contendo resíduos de antimicrobianos, e o aparecimento de isolados multirresistentes. O mesmo foi verificado em relação à administração de aminosidina de forma profilática. Observou-se, também, que a presença na exploração de mais de 50 animais em ordenha estava relacionada com o aparecimento de multirresistências em *E. coli*.

Palavras-chave: *E. coli*, leite de desperdício, antimicrobianos, resistências, vitelos.

ABSTRACT

Risk of feeding calves with waste milk unfit for human consumption

The present study sought to assess the antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates obtained from calves' faeces and their relationship with different management practices used in dairy farms.

The study was based on 37 different farms that differed on size (from 16 to 715 milking cows), husbandry practices and housing of calves, representing an average of 160 lactating animals on the day the study questionnaire was performed.

The data used in this study was obtained from a questionnaire prepared for this purpose and from stool samples of Holstein–Friesian calves from the different farms. The questionnaire consisted of 21 multiple choice or short answer questions, in order to characterize the farming operation and its usual practices, and the acquired data processed in Excel®. Faecal samples were obtained by removing a small portion of faeces from the rectal ampulla, with 5 ± 1 calves contributing to each sample. From these samples, 162 *E. coli* isolates were obtained, presumptively identified through IMViC gallery. Susceptibility tests were performed by the disc diffusion method with the following antimicrobials: amoxicillin/clavulanic acid (20/10 µg), enrofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), tetracycline (30 µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (23,7/1,25 µg) and ceftiofur (30 µg). The results were interpreted according to guidelines M31 - A3 (CLSI, 2008).

The results obtained show that resistance of *E. coli* strains was: 31,1% to amoxicillin/clavulanic acid, 33,1% to enrofloxacin, 17,2% to gentamicin, 76,2% to oxytetracycline, 49,7% to sulfamethoxazole/trimethoprim and 57,6% to ceftiofur.

Sixteen of the 151 isolates were considered susceptible (11%), 33 presented single resistance (21,9%), 28 with multiple resistance (18,5%) and 74 were multiresistant (49%).

It was possible to establish a relationship between the administration of waste milk containing antimicrobial residues, and the presence of multiresistant isolates. The same was found in relation to the prophylactic administration of aminosidine. Also, it was observed that the existence of multiresistance in *E. coli* isolates, was linked to the presence of more than 50 lactating animals per farm.

Keywords: *E. coli*, waste milk, antimicrobials, resistance, calves.

ÍNDICE GERAL

1. Resumo das atividades desenvolvidas no período de estágio	1
2. Introdução	2
3. Risco da alimentação de vitelos com leite de desperdício	6
3.1. Leites não comercializáveis.....	6
3.2. <i>Escherichia coli</i>	8
3.2.1. Fatores de virulência	12
3.2.2. Epidemiologia	13
3.2.3. Fisiopatologia.....	15
3.2.4. Sinais clínicos	17
3.2.5. Métodos de diagnóstico	18
3.2.6. Tratamento	18
3.3. Utilização de antimicrobianos	20
3.3.1. Pressão seletiva	22
3.3.2. Resistências.....	24
4. Objetivos.....	29
5. Materiais e Métodos	30
5.1. Caracterização das explorações	30
5.2. Questionários.....	31
5.3. Recolha de amostras	31
5.4. Análises efetuadas	32
5.4.1. Isolamento de <i>Escherichia coli</i> comensal	32
5.4.2. Identificação de isolados de <i>Escherichia coli</i> comensal.....	32
5.4.3. Suscetibilidade aos antimicrobianos	33
5.5. Análise estatística.....	35
6. Resultados.....	35
6.1. Questionários.....	35
6.2. <i>Escherichia coli</i>	40
6.2.1. Isolamento e identificação de isolados de <i>Escherichia coli</i>	40
6.2.2. Suscetibilidade aos antimicrobianos	41
7. Discussão	46
8. Conclusão	52
9. Bibliografia.....	53
ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema simplificado de <i>E. coli</i> (Adaptado de: ECL- Université de Montréal).	9
Figura 2 – Representação esquemática de corte vertical de <i>E. coli</i> (Adaptado de: Journal of Endotoxin Research, Vol.7, Nº3, 2001).....	9
Figura 3 – Ciclo de transmissão de <i>E. coli</i> (Adaptado de: ECL- Université de Montréal).	11
Figura 4 – Distribuição de casos humanos de infecção por <i>E. coli</i> relatados pela EFSA (2011). ... Erro! Marcador não definido.	
Figura 5 – Aderência de ETEC ao epitélio do íleo e cólon (40x) (Fonte: Sandhu & Gyles, 2002).	15
Figura 6 – Formação de microcolônias (Giemsa, 100X) (Fonte: Sandhu & Gyles, 2002).	16
Figura 7 – Sequência de alterações histopatológicas induzidas por <i>E. coli</i> enterohemorrágica no intestino de vitelo (Fonte: Evelyn et al., 1997).	17
Figura 8 – Vitelo recebendo terapia endovenosa (Stilwell, 2013).	19
Figura 9 – Proporção de resistências de <i>E. coli</i> a Cefalosporinas de 3ª geração verificadas nos países participantes (Fonte: ESAC-Net, 2012).	24
Figura 10 – Exemplos de explorações estudadas (A e B).	30
Figura 11 – Viteleiros de diferentes explorações (A e B).	31
Figura 12 – Placas de Agar MacConkey após incubação.	32
Figura 13 – Padrão obtido por <i>E. coli</i> ao teste IMViC.	33
Figura 14 – Placa resultante do TSA.	34

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Contagens bacterianas (\log^{10} ufc/ml) de leites utilizados na alimentação de vitelos (Adaptado de Selim e Cullor, 1997).	6
Gráfico 2 – Consumo de Antimicrobianos de uso sistémico na Europa (Fonte: ESAC-Net 2011).	20
Gráfico 3 – Distribuição do consumo de antimicrobianos de uso sistémico em Portugal (Fonte: ESAC-Net, 2011)	21
Gráfico 4 – Proporção de estirpes de <i>E. coli</i> resistente a fluoroquinolonas nos países participantes (Fonte: ESAC-Net, 2012).	26
Gráfico 5 - Ocorrência de resistências em <i>E. coli</i> após administração profilática de um antimicrobiano (tetraciclina) por via do leite e da administração terapêutica de ceftiofur em vitelos (Adaptado de: Berge et al, 2006).	27
Gráfico 6 - Distribuição da frequência da administração de leite mastítico.	36
Gráfico 7 – Percentagem de explorações divididas pelo tempo decorrido após o parto até à administração do colostro.	37
Gráfico 8 - Tipo de medicação administrada em casos de diarreia.	38
Gráfico 9 - Distribuição das explorações que têm conhecimento de doenças infecciosas na exploração.	39
Gráfico 10 - Distribuição das bisnagas utilizadas para o tratamento de mastites (Princípios ativos correspondentes – Anexo II)	40
Gráfico 11- Suscetibilidade dos isolados de <i>E. coli</i> aos diferentes antimicrobianos classificados em sensível (S), intermédio (I) ou resistente (R) após TSA.	41
Gráfico 12- Distribuição do padrão de suscetibilidades verificado, considerando que um isolado sem resistências é um isolado suscetível, um isolado resistente a um antimicrobiano possui resistência simples, um isolado resistente a dois antimicrobianos - resistência múltipla e isolados resistentes a três ou mais - multirresistente. ...	42
Gráfico 13 – Padrão de resistências observadas nos isolados de <i>E. coli</i>	42
Gráfico 14 - Categorização dos isolados de acordo com as práticas realizadas em cada exploração de acordo com o número de antimicrobianos a que apresentavam resistências.	44

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1- Caracterização microbiológica dos leites não comercializáveis (adaptado de Jorgensen et al., 2005)...	7
Quadro 2 - Características nutricionais dos leites não comercializáveis (adaptado de Jorgensen et al., 2005)	7
Quadro 3 - Características nutricionais dos leites não comercializáveis (adaptado de Leadley, 2014). Erro! Marcador não definido.	
Quadro 4 - Características nutricionais dos leites não comercializáveis.	14
Quadro 5 - Níveis de resistência de <i>Escherichia coli</i> comensal aos 9 antimicrobianos estudados em bovinos, declarados por 8 Estados Membros no ano de 2007 (Adaptado de: EFSA, 2010).	28
Quadro 6 - Resultados de <i>E. coli</i> ao teste IMViC.	33

Quadro 7 - Critérios de avaliação dos antimicrobianos utilizados segundo o <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i> , 2008.....	34
Quadro 8 – Suscetibilidades verificadas nas explorações em estudo.	43

Lista de abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico
AIEC - <i>E. coli</i> aderente invasiva
AINES – Anti-inflamatórios não esteroides
AMC - Amoxicilina/ácido clavulânico
BVD – Diarreia viral bovina
CCS - Contagem células somáticas
CE - Comunidade Europeia
CECS - Contagem eletrónica de células somáticas
CLSI – “Clinical and Laboratory Standards Institute”
CMI - Concentração Mínima Inibitória
CN - Gentamicina
CNF - Fator necrosante citotóxico
CTX-M - Cefotaximases
DM - Matéria seca
<i>E. coli</i> – <i>Escherichia coli</i>
EAEC - <i>E. coli</i> enteroagregativa
ECDC - “European Center for Disease Prevention and Control”
EFSA - ”European Food Safety Authority”
EFT - Ceftiofur
EHEC - <i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC - <i>E. coli</i> enteroinvasiva
ENR - Enrofloxacina
EPEC - <i>E. coli</i> enteropatogénica
ESAC – “European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network”
ESBLs - β -lactamases largo espectro
ETEC - <i>E. coli</i> enterotoxigénica
EUA - Estados Unidos da América
ExPEC - <i>E. coli</i> patogénica extraintestinal
IBR – Rinotraqueite infecciosa bovina
IMViC – “Formethyl red test, Voges-Proskauer test and Citrate test”
InPEC - <i>E. coli</i> patogénica intestinal

LPS - Lipopolissacarideo
Me - Energia metabolizável
NHE3 - Transportador sódio-hidrogénio 3
NMEC - Estirpes ExPEC associadas a meningites
SEPEC - Estirpes ExPEC associadas a sepsis
ST - Enterotoxina termo-estável
STEC – *E.coli* produtora de toxina shiga
Staph. Sp.- *Staphylococcus sp.*
Strep. Sp.- *Streptococcus sp.*
SXT - Sulfametoxazole/ trimetoprim
TE- Tetraciclina
TSA - Testes de sensibilidade a antimicrobianos
UPEC - Estirpes ExPEC associadas a infeções do trato urinário
UV- Luz ultravioleta
VT - Verocitoxina
WHO – “World Health Organization”

1. Resumo das atividades desenvolvidas no período de estágio

O estágio curricular foi realizado na Proleite – Cooperativa de Produtores de Leite do Centro Litoral, na área de bovinos leiteiros, onde foram acompanhadas ao longo de cerca de 6 meses (10 de Setembro de 2013 a 1 de Janeiro de 2014) as atividades diárias que visavam a área de clínica, reprodução, sanidade, qualidade de leite e aconselhamento/acompanhamento de produção e gestão de explorações.

Durante este período foram realizados exames físicos de diagnóstico, administrações farmacológicas e intervenções cirúrgicas, recolha de amostras para exames complementares, exames ecográficos para controlo reprodutivo e visitas de aconselhamento/acompanhamento de produção.

Posteriormente (Fevereiro de 2014), foram acompanhados os trabalhos no laboratório de análises químicas e biológicas na mesma cooperativa (Proleite), desenvolvendo procedimentos de isolamento e/ou identificação de agentes presentes em amostras de leite, sangue, água e rações, realizando testes de resistência a antibióticos e análises da composição química de rações.

Por último (Março de 2014), foram realizados todos os procedimentos necessários ao desenvolvimento deste trabalho no laboratório de análises da FMV-UTL na área de microbiologia.

2. Introdução

O leite não destinado a consumo humano (leite de desperdício), pode ser definido como todo o leite não comercializável produzido numa exploração, como o colostro, leite de vacas com mastites clínicas, leite obtido durante o intervalo de segurança de tratamentos farmacológicos, leite com elevada contagem de células somáticas ou todo o leite que por qualquer razão o produtor não considere apto para ser consumido. Apesar de este leite representar aproximadamente 1 a 4% da produção total das explorações (Duse, 2013), não há regulamentação relativa ao destino e processamento destes resíduos. Na União Europeia, a eliminação dos resíduos animais é estabelecida pelo regulamento de *Animal-By-Products* (CE) n.º 1069/2009, mas o leite ou colostro que é usado e descartado nas explorações de origem não está coberto por este regulamento, estando disponível para utilização (Duse, 2013).

Este leite é, teoricamente, suficiente para alimentar todos os vitelos produzidos numa exploração (Schaeren, 2006; Statistisches Bundesamt, 2008) sendo, por isso, uma tentadora e disponível opção para os produtores.

Contudo, o uso deste leite na alimentação de vitelos é controverso, especialmente devido à sua contaminação com agentes patogénicos. Agentes como *Streptococcus* e *Staphylococcus spp.* podem colonizar as amígdalas dos vitelos, mas a possibilidade destes agentes provocarem futuras mastites é ainda pouco clara. Os primeiros estudos realizados entre 1970 e 1980 não relatam efeitos a longo prazo sobre a saúde, produção ou incidência de infeções por *Staphylococcus aureus* na primeira lactação de novilhas previamente alimentadas com leite de desperdício enquanto vitelas (Kesler, 1981; Barto et al., 1982). No entanto, é possível a transmissão de agentes patogénicos no colostro e leite, seja direta ou indiretamente, e que podem incluir agentes como *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Salmonella spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.*, *Mycobacterium bovis*, e *Escherichia coli* (Lovett et al., 1983; Farber et al., 1988; McEwen et al., 1988; Clark et al., 1989; Giles et al., 1989; Streeter et al., 1995; Grant et al., 1996; Steele et al., 1997; Walz et al., 1997).

Outro dos riscos da alimentação de vitelos com leite de desperdício é a sua contaminação com resíduos de antimicrobianos o que, segundo Schmoldt (1991), poderá aumentar o risco de resistências na flora intestinal.

Wray e colaboradores (1990) obtiveram resultados inconsistentes na comparação das resistências presentes em *Escherichia coli* (*E. coli*) de origem fecal de vitelos alimentados com leite de desperdício e dos alimentados com leite de substituição. No primeiro ensaio, foi

encontrado um significativo aumento da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de estreptomicina para *E. coli* isolada de vitelos alimentados com leite de desperdício comparado com vitelos alimentados com leite de substituição. Esta diferença significativa na CMI não foi encontrada em relação à ampicilina. No segundo ensaio não foi observada diferença entre a suscetibilidade de *E. coli* isolada de animais alimentados com leite de desperdício ou com leite de substituição.

Langford e colaboradores (2003) demonstraram uma relação dose-dependente entre a concentração de penicilina no leite administrado e os níveis de resistência ao antimicrobiano nas bactérias intestinais dos vitelos. Watson e colaboradores (2012) também sugerem que as resistências presentes em *E. coli* às cefalosporinas de largo espectro se devem à alimentação de vitelos com leite contendo antimicrobiano, o que leva à seleção de bactérias produtoras de β -Lactamases de largo espectro (ESBLs), como as cefotaximases (CTX-M), o que consequentemente torna estas bactérias resistentes a estes antimicrobianos.

Segundo Aust (2012), foi encontrada uma maior prevalência de *E. coli* resistente em vitelos alimentados com leite de desperdício não pasteurizado comparativamente com vitelos alimentados com leite pasteurizado, não tendo tal se verificado no entanto, em relação a *Enterococcus*.

O aparecimento destas resistências não é só preocupante no que concerne à saúde e dificuldade no combate de futuras infecções do animal, como também representa um elevado risco para o Homem (Hawkey & Jones, 2009).

No entanto, os produtores são confrontados com o desafio de criar vitelos saudáveis, prestando atenção aos custos de recria e à obtenção de lucro. Como tal, é necessário pesar todas as alternativas e suas vantagens e desvantagens de forma a escolher as alternativas mais equilibradas para cada exploração (Godden, 2003).

Hoje em dia, a alta qualidade dos leites de substituição proporciona muitos benefícios ao produtor como a constante disponibilidade do produto, facilidade e flexibilidade de armazenamento, bom controlo de doenças e bom desempenho de crescimento (Davis & Drackley, 1998). Por outro lado, o seu preço relativamente elevado funciona como entrave à sua utilização.

Apesar destas vantagens na alimentação com substitutos do leite, pode haver, segundo Davis e Drackley (1998), um melhor desempenho nos vitelos alimentados com leite natural. Segundo estes autores, um vitelo com 45 kg alimentado com 10% do seu peso em leite (a que corresponde 562g de Matéria Seca- MS) consome aproximadamente 2,97 Mcal de Energia Metabolizável (EM) diariamente, se o leite contiver 12,5% de sólidos. Por outro lado, se o vitelo consumir os mesmos 562 g de MS mas de leite de substituição por dia, contendo 4,4

Mcal EM/kg de MS, o seu aporte diário de EM será de apenas 2,47 Mcal por dia. Espera-se que estes dois vitelos ganhem 446 e 289 g/dia respetivamente, assumindo que a proteína não era limitante em ambos os casos. Esta diferença de crescimento é explicada inteiramente com base no consumo de energia.

O leite de desperdício contém em média entre 16 e 18% de sólidos totais o que poderá levar a bons ganhos diários de peso dos vitelos comparativamente com outros tipos de alimentação fornecida nas mesmas quantidades (Davis & Drackley, 1998). A variação diária da sua composição não afeta significativamente as taxas globais de crescimento (Foley & Otterby, 1978). No entanto, a disponibilidade, dificuldade de armazenamento e preservação são alguns dos inconvenientes ao seu uso generalizado. A congelação é uma opção aceitável, mas torna-se problemática para a alimentação de um grande número de vitelos. Uma alternativa à utilização de leite de desperdício não refrigerado é a sua fermentação o que produz um alimento de alta qualidade para vitelos, permitindo bons ganhos de peso (superiores a 0,320 kg/dia) e crescimentos homogéneos, bem como um acréscimo de aproximadamente 9 a 10 kg para períodos de 28 dias de aleitamento, com um índice de conversão alimentar inferior a 2,0 kg MS/kg de ganho de peso (Rodrigues, 2004). Com tempo frio, o processo de fermentação produz principalmente ácido láctico, resultando num pH final de cerca de 4,5 (Foley & Otterby, 1978). No entanto, com tempo ameno ou quente a fermentação putrefativa pode ocorrer, produzindo um produto impróprio para o consumo dos vitelos (Davis & Drackley, 1998). Este problema pode ser resolvido através do uso de conservantes, tais como ácido propiónico, fórmico e láctico. Estes não são muito utilizados devido à necessidade de misturar e processar produtos químicos, tóxicos e cáusticos (Davis & Drackley, 1998), bem como por se verificarem fenómenos de rejeição deste alimento lácteo devido ao processo fermentativo acelerado, que pode ser excessivo provocando um aumento da acidez titulável e consequente diminuição da palatabilidade do leite (Rodrigues, 2004).

Outra opção para aproveitar este leite de forma segura passa pela pasteurização do mesmo, de forma a reduzir a contaminação bacteriana e limitar a propagação de doenças veiculadas por este leite (Stabel, 2004).

Como forma de reduzir a carga bacteriana pode-se recorrer também ao tratamento com luz Ultravioleta (UV). Segundo Dann (2014), num estudo realizado em leite de desperdício de 9 explorações, o tratamento com luz UV foi efetivo para alguns, mas não para todos os tipos de bactérias. Em geral, as bactérias foram reduzidas em aproximadamente 10 a 100 vezes. *Coliformes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *streptococci* ambientais e *streptococci* contagiosos foram reduzidas em mais de 50%.

Em contraste, o tratamento com luz UV do colostro apenas reduziu a quantidade de *Listeria*, *Salmonella* e *Acinetobacter baumannii* em cerca de 10 vezes, mesmo quando o colostro foi exposto a mais ciclos de radiação UV. Tal acontece por a luz UV ser limitada na sua capacidade de penetração no líquido devido ao alto teor de sólidos do colostro (6,7% de gordura, 14% de proteína) em relação ao leite (4% de gordura, 3,1% de proteína). O tratamento com luz UV reduziu a concentração de IgG no colostro até 50%.

No mesmo estudo, o leite de desperdício foi pasteurizado a 72,22 °C durante 15 segundos e reduziu a contagem bacteriana em 10 a 100000 vezes.

Foi então possível concluir que o tratamento térmico do leite de desperdício foi mais eficaz do que o tratamento com UV, na redução da contagem bacteriana, tendo-se o mesmo verificado em relação ao colostro.

3. Risco da alimentação de vitelos com leite de desperdício

Com esta secção pretende-se caracterizar e definir os leites não comercializáveis numa exploração de bovinos leiteiros, a sua importância e riscos da sua utilização na alimentação de vitelos. Será também apresentada uma breve revisão sobre *E. coli*, seus fatores de virulência, epidemiologia, fisiopatologia e tratamento. Por último, abordar-se-á a utilização de antimicrobianos na atualidade, bem como a pressão seletiva desencadeada e eventual formação de resistências.

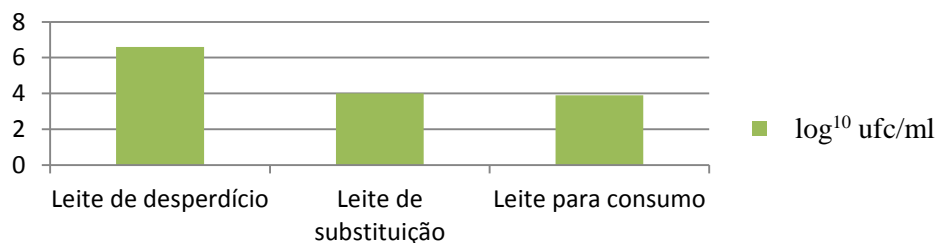
3.1. Leites não comercializáveis

As explorações leiteiras têm ao seu dispor uma vasta gama de alimentos líquidos para os vitelos após a administração do colostro inicial, tal como: leite cru, colostro excedente, leite de transição, leite mastítico, leite que contém antimicrobianos ou outros resíduos e, ainda, leite de substituição (Elizondo-Salazar et al., 2007).

Os leites não comercializáveis, ou com resíduos, não podem ser aprovados para consumo humano, sendo assim frequentemente utilizados na alimentação de vitelos (Elizondo-Salazar et al., 2007). No entanto, e tal como referido anteriormente, a sua utilização acarreta alguns riscos, uma vez que estes leites possuem uma carga microbiana e composição química variável.

No que concerne ao carácter microbiológico, Selim e Cullor (1997) demonstraram que o leite de desperdício contém maiores concentrações bacterianas ($6,6 \log^{10}$ de ufc/ml), comparando com o leite de substituição ($4 \log^{10}$ de ufc/ml) e com o leite para consumo humano ($3,9 \log^{10}$ de ufc/ml) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Contagens bacterianas (\log^{10} ufc/ml) de leites utilizados na alimentação de vitelos
(Adaptado de Selim e Cullor, 1997).



Após pesquisa em 31 efetivos no Wisconsin (EUA), Jorgensen e colaboradores (2005) referem que a contagem de microrganismos totais em leites de desperdício foi em média

8,82x10⁶ ufc/ml, sendo os Coliformes totais os agentes mais comumente identificados (Quadro 1).

Quadro 1- Caracterização microbiológica dos leites não comercializáveis (adaptado de Jorgensen et al., 2005)

Componente	Média	Intervalo
Bactérias totais (1000 ufc/ml)	8822	6-72000
CCS (1000 CECS/ml)	1772	110-3800
 ufc/ml	
<i>E. coli</i>	10000	<10-80000
Coliformes Totais	82052	600-800000
<i>Salmonella sp.</i>	243	<10-2000
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1281	<10-34000
<i>Strep. sp.</i>	47281	200-170000
<i>Staphylococcus aureus</i>	549	<10-11000
<i>Staph. sp.</i>	8426	<10-88000
<i>Enterococcus sp.</i>	17274	<10-180000

CECS: contagem eletrônica de células somáticas

A nível nutricional, Jones e colaboradores (2009) referem que existem variações nos teores de nutrientes dos leites de desperdício, que se podem dever a alterações no número de vacas que contribuíram para esse leite e respetiva fase de lactação, redução na produção dos componentes do leite devido a mastite (Hagnestam et al., 2007) ou a água adicionada indevidamente, sendo por isso importante a determinação dos sólidos totais nestes leites não comercializáveis (Moore et al., 2009).

Nas mesmas 31 explorações mencionadas anteriormente, Jorgensen e colaboradores (2005) observaram estas alterações no leite de desperdício, tendo a gordura variado entre 27,3 e 49,5% de MS a proteína entre 23,6 e 41,8 % de MS e a energia bruta entre 5,3 e 7,7 Mcal/kg de MS (Quadro 2).

Quadro 2 - Características nutricionais dos leites não comercializáveis (adaptado de Jorgensen et al., 2005)

Constituinte	Média (em % de MS)	Intervalo (em % de MS)
Gordura	35,4	27,3 – 49,5
Proteína	28,3	23,6 – 41,8
Lactose	34,0	27,3 – 38,2
Energia Bruta, Mcal/kg de MS	6,22	5,27-7,69

No que concerne à percentagem de matéria seca destes leites, Leadley (2014) calculou a sua percentagem em 9 explorações, por um período de 15 dias, tendo registado em média 10,4% de MS.

Outro fator que influencia a qualidade dos leites de desperdício é a sua maior instabilidade uma vez que, destes, fazem parte leite mastítico (Oliveira et al, 2007). Segundo Moore e colaboradores (2009) o valor de pH nestes leites encontra-se abaixo de 6,6.

A temperatura, o valor de pH e o tempo de incubação do leite no úbere de vacas com mastite durante o tempo entre ordenhas, fornece condições ideais para a atividade enzimática dos leucócitos levando à proteólise da caseína e à conversão proteolítica do plasminogénio em plasmina (Verdi et al., 1991).

Como forma de avaliar a deterioração destes leites pode-se recorrer à medição do pH, uma vez que este está diretamente correlacionado com a percentagem de sólidos totais (pH mais baixo, menor a quantidade de sólidos totais). A deterioração microbiana dos produtos alimentares pode afetar, não só a cor e o odor, como a ingestão, e pode também afetar os teores de nutrientes (Moore, 2009).

3.2. *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é a espécie tipo do género *Escherichia* que reúne a maior parte dos bacilos Gram-negativos móveis da família *Enterobacteriaceae* (Nataro & Kaper, 1998).

Foi descrita pela primeira vez em 1885 por Theodor Escherich, após ter sido isolada de fezes de recém-nascidos, que lhe atribuiu o nome de *Bacterium coli commune*. Em 1895, Migula alterou-lhe o nome para *Bacillus coli*, sendo mais tarde alterado para *Escherichia coli* por Castellani e Chalmers em 1919 (Cowan, 1974). Mais tarde, no início da década de 40, estirpes de *E. coli* foram identificadas pela primeira vez como causa de gastroenterite por investigadores ingleses que procuravam determinar a causa de diarreia em crianças (Adams & Moss, 2000).

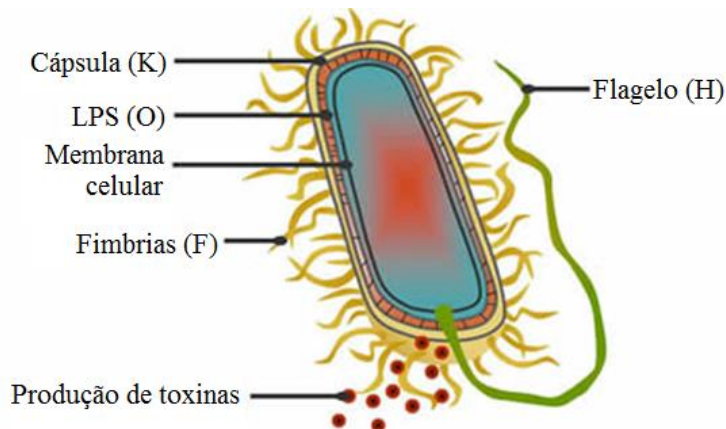
A *E. coli* é uma bactéria ubiqüitária comensal, sendo um habitante natural do intestino dos mamíferos desde os primeiros dias de vida (Quinn, 1994) não causando doença, numa relação denominada de comensalismo, em que a bactéria obtém alimento e benefício do hospedeiro sem causar dano (Manning, 2005).

Esta representa cerca de 0,1% das bactérias intestinais de um indivíduo saudável (Todar, 2002) e em condições normais exerce um papel protetor do intestino contra infeções, junto com outras bactérias comensais, uma vez que compete com os agentes patogénicos intestinais como *Shigella* e *Salmonella* (Sousa & Peixe, 2010).

Trata-se de um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, fermentador de glicose e outros açúcares. É oxidase-negativo, catalase positivo, não formador de esporos, crescendo bem em agar MacConkey e são, na sua maioria, móveis. Reduzem nitratos em nitritos e fermentam a lactose (Quinn & Markey, 2003; Manning, 2005).

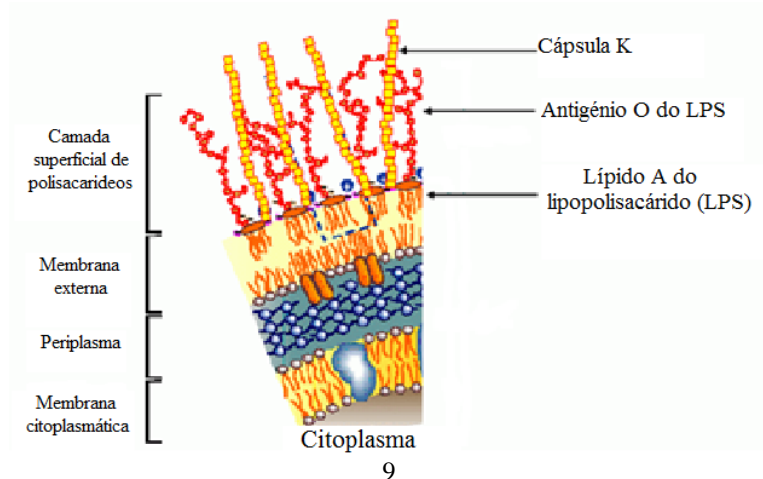
A parede celular desta bactéria consiste numa membrana externa e uma interna separadas por peptidoglicanos (Figura 1).

Figura 1 – Esquema simplificado de *E.coli* (Adaptado de: ECL- Université de Montréal).



Estão presentes diversas proteínas em cada membrana, algumas atravessando-as inclusive (Figura 2). A cápsula (antigénio K) é o componente estrutural exterior da parede celular bacteriana e é composta por carboidratos. Os antigénios somáticos (antigénios O) são compostos por determinantes antigénicos formados pelos diferentes tipos de açúcares e as ligações entre eles, localizados na porção “O” do lipopolissacarídeo. O flagelo, estrutura usada pela *E. coli* para locomoção, é constituído por subunidades proteicas, as flagelinas. O antigénio flagelar (H) tem por base os diferentes tipos de flagelinas que podem constituir o flagelo (Hirsh, MacLachlan & Walker, 2004).

Figura 2 – Representação esquemática de corte vertical de *E. coli* (Adaptado de: Jornal of Endotoxin Research, Vol.7, Nº3, 2001).



Esta bactéria é excretada nas fezes e pode sobreviver nas partículas fecais, pó e água durante semanas ou meses, apresentando características de crescimento e sobrevivência muito similares aos restantes organismos entéricos. É um típico mesófilo, crescendo de 7-10 °C até 50 °C, mas com um crescimento ótimo a 37 °C (Quinn et al., 2002).

Nem todos os elementos da família *Enterobacteriaceae* são agentes comensais como *Escherichia coli*, *Klebsiella* ou *Enterobacter*. Há bactérias que são agentes patogénicos como *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*. No entanto, o facto de serem agentes comensais não exclui de modo algum a capacidade de provocarem doença, agindo como agentes patogénicos oportunistas e originando infeções em locais extra intestinais como o trato urinário ou a glândula mamária (Quinn et al., 2002). É, portanto, importante notar que diferentes estirpes de bactérias comensais podem ser consideradas como agentes patogénicos, uma vez que causam doença.

A classificação das estirpes patogénicas pode ser feita em dois grandes grupos, consoante o local onde provocam doença: *E. coli* patogénica intestinal (InPEC) e *E. coli* patogénica extraintestinal (ExPEC) (Russo, 2005; Moriel et al., 2012). Dentro destes dois grupos é feita uma divisão das estirpes segundo a doença que provocam (Moriel et al., 2012). De entre as estirpes InPEC, causadoras de afeções caracterizadas por diarreia, encontram-se a *E. coli* enteropatogénica (EPEC), a *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), a *E. coli* enteroagregativa (EAEC), a *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e a *E. coli* aderente invasiva (AIEC) (Moriel et al., 2012).

As estirpes ExPEC, que provocam doença fora do trato intestinal, são normalmente associadas a *sepsis* (SEPEC), infeções do trato urinário (UPEC) e meningites (NMEC) (Siqueira et al., 2009; Moriel et al., 2012).

Os diferentes serótipos da *E. coli* são serotipificados consoante o perfil antigénico apresentado pela bactéria, nomeadamente os antígenos O e H (Nataro & Kaper, 1998).

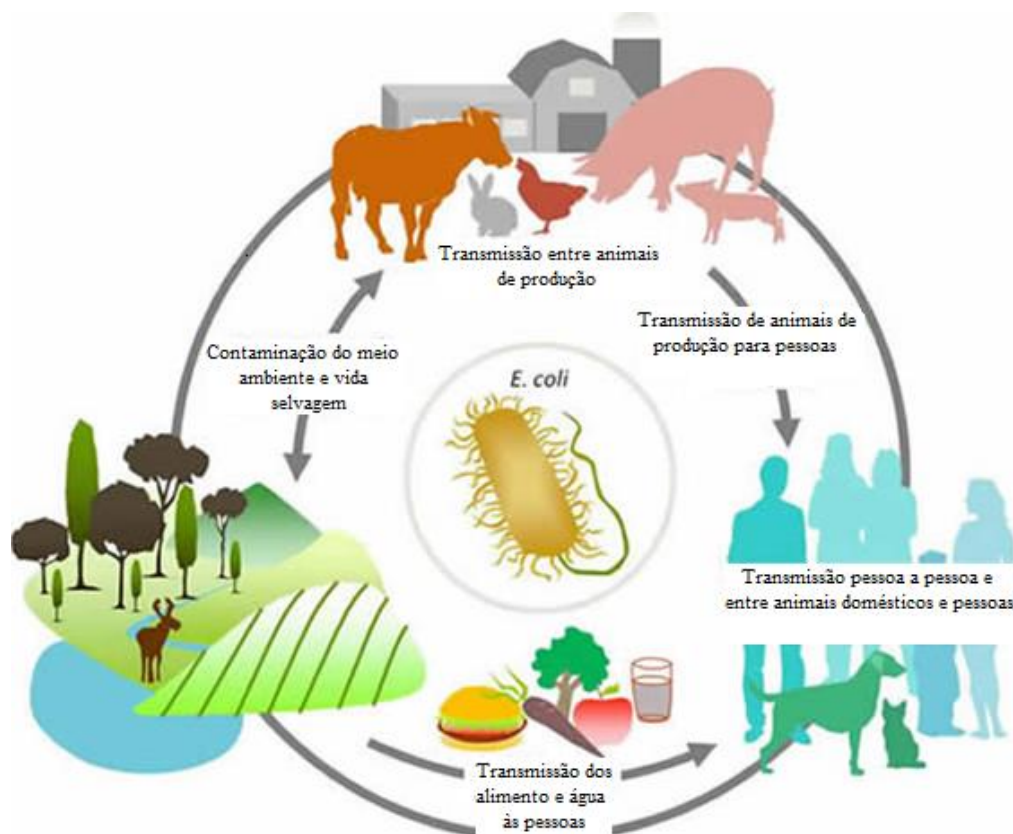
Estudos filogenéticos distribuem *E. coli* por 4 grupos principais: A, B1, B2 e D (Escobar-Páramo et al., 2004). As estirpes ExPEC pertencem, normalmente, aos grupos filogenéticos B2 e D (Picard et al., 1999; Johnson & Stell, 2000), enquanto as estirpes comensais extraintestinais pertencem, na maioria, aos grupos filogenéticos A e B1 (Bingen et al., 1998; Duriez et al., 2001). Pelo contrário, as InPEC pertencem, maioritariamente, aos grupos filogenéticos A, B1 e D (Escobar-Páramo et al., 2004).

Em geral, as estirpes dos grupos B2 e D são consideradas mais patogénicas e possuem mais fatores de virulência do que as dos grupos A e B1 (Bingen et al., 1998; Boyd & Hartl, 1998;

Picard et al., 1999; Johnson & Stell, 2000; Duriez et al., 2001; Johnson, Delavari, Kuskowski, & Stell, 2001; Tramuta, Nucera, Robino, Salvarani & Nebbia, 2011).

Em termos de Saúde Pública (Figura 3) esta é uma bactéria relevante, causadora de surtos de doença, bem como um útil indicador da pressão seletiva.

Figura 3 – Ciclo de transmissão de *E. coli* (Adaptado de: ECL- Université de Montréal).



Segundo os últimos registos da EFSA (2011), assume-se que o surto mais recente digno de relevo foi reportado pela Alemanha em 2011. Tratou-se de um surto de *E. coli* (STEC), serotipo O104:H4, responsável por 2988 casos de diarreia (prováveis e confirmados) em que resultaram 31 mortes. Fora da UE foram encontrados 8 casos de STEC, incluindo uma morte, nos EUA, Canada e Suíça ainda relacionados com este foco. Baseado nas últimas informações (26 julho de 2011) o último caso clínico relacionado com o surto alemão data de 4 de julho de 2011.

A *E. coli* constitui, também, um reservatório de genes de resistência para bactérias patogénicas. O seu nível de resistência é considerado um bom indicador da pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos e do tipo de resistências que se pode esperar encontrar em agentes patogénicos. Monitorizar a prevalência de resistência em bactérias indicadoras como a *E. coli* fecal em diferentes populações de animais e humanos, saudáveis ou doentes,

torna possível a comparação de prevalências e a detecção da transferência de bactérias resistentes ou de genes de resistência de animais para humanos e vice-versa (van den Bogaard & Stobberingh, 2000).

3.2.1. Fatores de virulência

O número de fatores de virulência existentes em *E. coli* é bastante diverso e estes atuam em diferentes etapas da infecção, facilitando a colonização, a proliferação e a sua persistência no hospedeiro (Peterson, 1996). As adesinas, os sideróforos, as toxinas e a cápsula são exemplos dos fatores de virulência (Quinn et al., 2011).

As adesinas são estruturas que permitem à bactéria aderir às células do hospedeiro facilitando a colonização (Quinn et al., 2011). Estas estruturas podem ser fímbrias (ou *pili*), que são estruturas proteicas filamentosas ou adesinas afimbriais que se encontram na membrana externa (Bower, Eto & Mulvey, 2005).

Algumas destas adesinas, para além de proporcionarem a adesão das bactérias, permitem ainda a sua entrada nas células epiteliais do hospedeiro, nos mastócitos, nos macrófagos e provocam hemaglutinação (Bower et al., 2005)

Os sideróforos (enterobactina, as salmoquelinas, a aerobactina e a yersiniabactina) são moléculas com grande afinidade para o ferro removendo-o das proteínas transportadoras, disponibilizando-o à bactéria (Ratledge & Dover, 2000; Hirsh & Zee, 2003; Quinn et al., 2011). Um dos principais mecanismos de tomada de ferro pela *E. coli* é a enteroquelina ou enterobactina. Esta consegue retirar o ferro ligado à transferrina, por ter uma maior afinidade para este ião (Ratledge & Dover, 2000).

Outros sistemas de captação de ferro pelas bactérias incluem transportadores de metais (Andrews et al., 2003) e recetores de membrana para proteínas do hospedeiro que transportam ferro como é o caso do grupo heme (Schubert & Heesemann, 1998). As bactérias possuem assim uma forma de adquirir ferro, diretamente, através deste grupo onde se encontra a maior parte do ferro no organismo hospedeiro (Torres, Redford, Welch, & Payne, 2001).

Uma só estirpe de *E. coli* pode ter vários tipos de sistemas de captação de ferro. Estes podem ser influenciados por diferentes estímulos externos, tais como o pH. Sendo então que as proteínas das quais adquirem o ferro diferem, esta pode ser uma vantagem desenvolvida para sobreviver em diferentes meios e aumentar a sua eficiência (Valdebenito, Crumbliss, Winkelmann, & Hantke, 2006).

As toxinas produzidas por *E. coli* são, também, outro fator de virulência importante nestas bactérias, tais como a hemolisina, o fator necrosante citotóxico (CNF) e os antigénios O. Esta

bactéria produz dois fatores necrosantes citotóxicos, denominados CNF-1 e CNF-2 que afetam as células eucariotas e impedem a sua divisão, sem inibir a replicação de ácidos nucleicos, o que origina células multinucleadas (Brito, Vidotto, Berbel & Tagliari, 2004).

A hemolisina é uma toxina que forma poros transmembranares nas células do hospedeiro provocando a lise, o que permite à bactéria ter acesso aos nutrientes celulares. Entre estas células encontram-se os eritrócitos e células do sistema imunitário (Johnson, 1991; Jonas et al., 1993). Para além da lise e necrose celular, esta toxina é capaz de inibir a fagocitose e a quimiotaxia e induzir a apoptose de células do hospedeiro (Johnson, 1991; Jonas et al., 1993; Russo et al., 2005; Chen et al., 2006; Smith, Grande, Rasmussen & O'Brien, 2006; Smith et al., 2008; Todar, 2008). Existem vários tipos de hemolisina, sendo que algumas (por exemplo, a α -hemolisina) são excretadas e outras, como a β -hemolisina, se encontram fixas à célula bacteriana (Johnson, 1991).

Os antígenos O são constituídos por repetições de polissacarídeos (polissacarídeo O) (Raetz & Whitfield, 2002) e constituem, juntamente com um núcleo de oligossacarídeos e o lípido A, o LPS ou endotoxina, que integra a membrana externa das bactérias gram negativas (Quinn et al., 2011). O LPS é um fator importante na virulência de *E. coli*, devido não só ao carácter tóxico do lípido A (Hirsh & Zee, 2003), mas também ao antígeno O do qual se presume que a principal função seja evitar as defesas do hospedeiro (Raetz & Whitfield, 2002).

A cápsula é a estrutura externa que compõe a maior parte da parede celular e onde se localizam os antígenos K (Hirsh & Zee, 2003). Estes são polissacarídeos que impedem a ligação de anticorpos e de proteínas do sistema do complemento à bactéria. Para além disso, diminuem a capacidade de reconhecimento e fagocitose pelas células do hospedeiro (Todar, 2008).

3.2.2. Epidemiologia

A prevalência de infeção por *E. coli* não é, regra geral, muito elevada dentro dos efetivos tal como é possível observar pelo Quadro 3, onde são resumidos alguns estudos de prevalência de infeções por esta bactéria ao longo dos anos.

Quadro 3 - Características nutricionais dos leites não comercializáveis.

Referência	Estudo	Prevalência
Myers & Guinee (1976)	Prevalência de infecção por <i>E. coli</i> em vitelos (n=1.004) de 6 estados dos EUA	12,4%
Acres, Saunders & Radostits (1977)	Prevalência de ETEC em vitelos de carne (n=222) em 59 explorações do Canadá	18,3% (14,5% positivos apenas a <i>E. coli</i> mais 3,8% positivos a <i>E. coli</i> e a Coronavirus) (48,5% dos efetivos)
Sherwood, Snodgrass & Lawson (1983)	Prevalência de ETEC em 11,4% dos efetivos do Norte de Inglaterra e Escócia (n=1529 vitelos)	7,2%
de la Fuente et al. (1999)	Prevalência de infecções mistas por <i>E. coli</i> e <i>Cryptosporidium</i> em Espanha (n=218 vitelos)	27,8%
Uhde et al. (2008)	Prevalência de <i>E. coli</i> em vitelos Suíços (n=147)	5,5% (2,1% dos efetivos)
Martins (2011)	Prevalência de <i>E. coli</i> em vitelos diarreicos do concelho de Odemira (n=33)	12,1%

A infecção dá-se por via oro-fecal acontecendo durante o parto ou logo após este, sendo o período ótimo de infecção entre o 1º e o 3º dia de idade (Acres, 1985). Esta é uma bactéria raramente relacionada com o aparecimento de diarreias em animais jovens e adultos (Wieler et al., 2007).

Podem-se destacar algumas causas predisponentes para o aparecimento da doença que são de extrema importância e, em grande medida, determinantes para se desenvolver doença clínica ou não (Quinn et al., 1994):

- Má transmissão de imunidade passiva (anticorpos) a partir de colostro. Tal pode-se dever a uma deficiência quantitativa ou qualitativa do mesmo;
- Práticas intensivas de produção que fomentam uma transmissão rápida de *E. coli*.
- Má higiene dos viteiros que contribuem para uma elevada carga microbiana;

Neonatos, com menos de uma semana de idade, são particularmente sensíveis pois:

- A flora normal do intestino não está ainda estabelecida;
- Têm um fraco sistema imunitário;
- Os recetores para as adesinas da *E. coli* estão apenas presentes na primeira semana de vida.

A mortalidade verificada depende muito das características e práticas das explorações. Em explorações “ideais” a taxa de mortalidade não ultrapassa os 3% podendo chegar aos 60% em explorações com más condições de manejo e higiene (Radostits, 2007).

3.2.3. Fisiopatologia

Embora seja uma bactéria comensal do intestino de todos os mamíferos de sangue quente (Todar, 2002) esta é, tal como já vimos, capaz de provocar doença particularmente em animais debilitados e nos primeiros dias de vida (Poeta & Rodrigues, 2008).

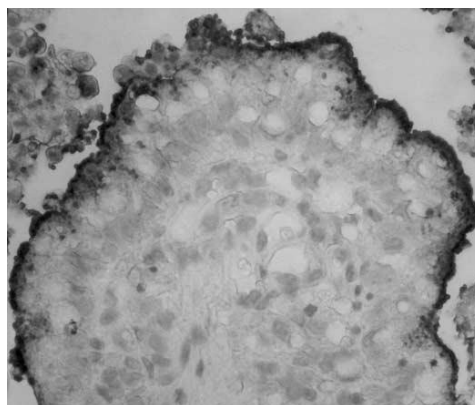
A colibacilose, em neonatos, provoca diarreia que poderá levar a septicémias ou infeções intestinais (Naylor, 2002), sendo esta a bactéria mais frequentemente encontrada em septicémias desde os primeiros dias de vida (50%) (Raboisson, et al, 2010).

Nestas idades é fácil obter o diagnóstico clínico, pois afeta animais muito jovens, provocando diarreias aquosas sem tenesmo (muito mais profusas do que a diarreia causada por outro agente etiológico) sendo a mortalidade alta (Naylor, 2002).

A *E.coli* enterotoxinogénica (ETEC) atinge em número mais elevado de indivíduos na faixa etária inferior a 4 dias, apresentando um período de incubação de 12 a 18 horas (Naylor, 2002).

A patogenicidade da *E.coli* enterotoxinogénica inicia-se com a adesão desta às microvilosidades dos enterócitos do intestino delgado. O organismo tem defesas contra o sobrecrecimento bacteriano, nomeadamente por excreção através da peristalse desse excesso (Acres, 1985). No entanto, no caso das ETEC, a adesão resulta numa ligação forte mas morfológicamente não destrutiva, da bactéria à célula do hospedeiro (Figura 4).

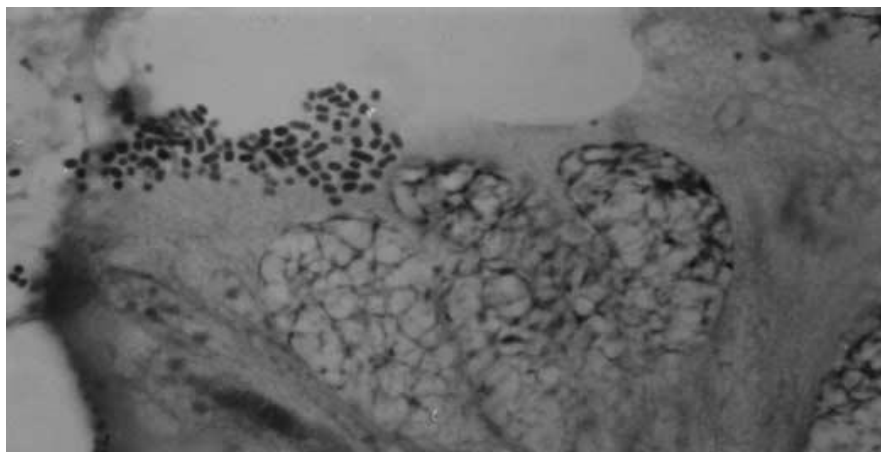
Figura 4 – Aderência de ETEC ao epitélio do íleo e cólon (40x) (Fonte: Sandhu & Gyles, 2002).



Esta ligação é feita através de fatores de adesão que podem ser fimbriais ou fibrilares (Qadri et al., 2005). A adesão é necessária para que a bactéria não seja eliminada com a ingesta e para que as enterotoxinas por ela produzidas exerçam o seu efeito junto à mucosa, não se

perdendo no lúmen intestinal. Após aderir, a *E. coli* multiplica-se junto à superfície das microvilosidades, formando microcolónias que podem ter várias camadas de espessura (Acres, 1985) (Figura 5).

Figura 5 – Formação de microcolónias (Giemsa, 100X) (Fonte: Sandhu & Gyles, 2002).



Estas bactérias ao libertarem as suas toxinas, particularmente a enterotoxina termo-estável (ST), poderão dar origem a uma diarreia secretória (Bradbury & Ameen, 2005; Sellers et al., 2005; Weiglmeier, Rösch & Berkner, 2010) ou a uma diarreia por má absorção (Lucas, 2001; Weiglmeier et al. 2010; Peijian & Yun, 2010).

Esta enterotoxina é produzida por várias estirpes de ETEC (Giannella & Mann, 2003) e após a sua secreção liga-se a uma enzima presente nas microvilosidades dos enterócitos, cuja distribuição se localiza principalmente no íleo (Krause et al., 1994). Ainda não existem estudos conclusivos em vitelos, no entanto noutros mamíferos (coelhos e ratos) já foi demonstrado que a afinidade dos recetores à ST e a sua concentração diminuem com a idade das crias (Al-Majali et al., 1999; Bhattacharya & Chakrabarti, 1999), o que explicaria uma maior suscetibilidade dos neonatos à ação da enterotoxina.

A diarreia secretória deve-se a um aumento da secreção de cloro e bicarbonato, criando-se um gradiente osmótico que retira água às células e que ultrapassa o limiar de absorção das vilosidades (Sellers et al., 2005).

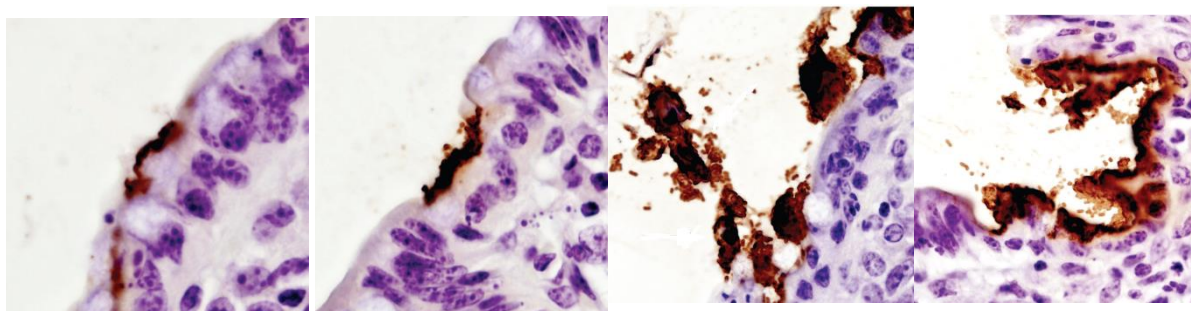
No caso da diarreia por má absorção a enterotoxina bloqueia as trocas de sódio-hidrogénio. Isto leva a uma diminuição da absorção de sódio que por sua vez aumenta o gradiente osmótico (Lucas, 2001). Noutro estudo, Weiglmeier e colaboradores (2010) explicam a má absorção provocada pela ST através da inibição do transportador sódio-hidrogénio 3 (NHE3) promovido pela ativação da Proteína Cinase A.

Alguns estudos demonstram que enterites virais podem aumentar a suscetibilidade para o desenvolvimento desta doença (Naylor, 2002)

Os vitelos atingidos com ETEC têm uma reação inflamatória média na parede do intestino delgado com o atrofiamento das vilosidades apresentando diarreia, desidratação e fraqueza. Esta patologia progride rapidamente, de um estado de alerta, a uma apatia em apenas 6 a 12 horas mesmo antes da ocorrência de episódios diarreicos (Naylor, 2002).

Existem ainda outras variedades patogênicas de *E.coli*, que aderem principalmente aos enterócitos do cólon destruindo a bordadura em escova (Figura 6).

Figura 6 – Sequência de alterações histopatológicas induzidas por *E.coli* enterohemorrágica no intestino de vitelo (Fonte: Evelyn et al., 1997).



Estas são divididas em grupos enterohemorrágicos e enteropatogênicos, dependendo da capacidade ou não de produzir verocitoxina (VT), tendo sido ambos os grupos associados à diarreia dos vitelos (Naylor, 2002; Radostitis, et al, 2007). A VT produzida por *E.coli* origina uma colite mucohemorrágica com hemorragias equimóticas e petequiais na parede do cólon e recto.

Há relatos de surtos de diarreia hemorrágica em vitelos com idade compreendida entre os 2 dias e as 4 semanas, associada a *E.coli* enterohemorrágica, havendo em alguns deles o envolvimento de outros agentes (Naylor, 2002).

3.2.4. Sinais clínicos

O sinal clínico mais comum é a diarreia, líquida e amarelada, durante os primeiros 5 dias de vida, sendo muitas vezes acompanhada de desidratação, acidose e disenteria. Ocasionalmente pode haver sinais de dor à palpação abdominal (Naylor, 2002).

De acordo com Stilwell (2013), o diferente grau de desidratação que o animal apresenta está relacionado com o aparecimento e evolução de sinais clínicos tais como: depressão, enoftalmia, mucosas secas, tempo de prega de pele aumentado (> 2 segundos), hipotermia e em casos extremos sinais de choque e coma.

A acidose, embora mais difícil de avaliar o seu grau, é responsável por sintomas como letargia e taquipneia Stilwell (2013).

3.2.5. Métodos de diagnóstico

O diagnóstico de estarmos na presença de uma diarreia neonatal provocada por *E. coli* (ETEC) pode ser feito no campo com base nos sinais clínicos e idade do doente, já que esta permite dar uma identificação presuntiva do agente envolvido Stilwell (2013).

A *E. coli* é também facilmente isolada em meios de cultura gerais ou seletivos incubados a 37 °C em aeróbiose. Os meios mais usados são o meio de MacConkey e o de Agar de Eosina Azul de Metileno, que selecionam os membros da família *Enterobacteriaceae* e permitem a diferenciação de organismos entéricos com base na sua morfologia (Nataro & Kaper, 1998), no entanto, esta identificação tem pouco valor de diagnóstico visto esta ser uma bactéria comensal Stilwell (2013).

Segundo Martins (2011), o diagnóstico definitivo das infeções por ETEC requer a deteção dos fatores de virulência (adesinas e enterotóxicas) através de análises genotípicas e fenotípicas. As análises fenotípicas são realizadas para deteção das fimbrias patogénicas (F5) através de técnicas de imunofluorescência indirecta ou ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) Para as análises genotípicas são procurados os genes codificadores das fimbrias (F5) e das enterotoxinas (principalmente aSTa) por PCR e por sondas de DNA. (Nataro & Kaper, 1998). Para o diagnóstico laboratorial no campo, foi desenvolvido um teste imunocromatográfico (teste rápido) que deteta a proteína F5 da *E. coli* (Martins, 2011).

3.2.6. Tratamento

As soluções eletrolíticas orais continuam a ser a principal forma de combater a diarreia não sendo, no entanto, uma medida curativa, numa primeira abordagem, vão aumentar o estado de hidratação do vitelo (Argenzio, 1985).

A fluidoterapia endovenosa (Figura 7) deve ser instituída sempre que a desidratação ultrapasse os 8%, e sempre complementada com fluidoterapia oral (Berchtold, 2009).

Figura 7 – Vitelo recebendo terapia endovenosa (Stilwell, 2013).



A composição dos fluidos parenterais necessita de ter em conta os défices eletrolíticos e energéticos sendo indispensável incluir um elemento alcalinizante (ex. bicarbonato de sódio), fonte de energia (glucose) e eletrólitos (Na^+ , Cl^- , K^+), segundo Stilwell (2013). De acordo com o mesmo autor não devem ser administrados parasimpaticolíticos ou outros fármacos com ação antiperistáltica.

O antimicrobiano parenteral apenas deve ser usado em casos suspeitos de bacteriemia ou quando se verifica lesão intestinal (sangue nas fezes, por exemplo) com provável invasão microbiana. O tratamento adicional deve incluir anti-inflamatórios não esteróides, ou corticóides no caso de choque, e um complexo vitamínico destinado a favorecer a regeneração do epitélio intestinal. O manejo dos vitelos afetados deve ainda incluir: manutenção da temperatura corporal, cama confortável e limpa, mudança frequente de posição de decúbito e sossego (Stilwell, 2013).

O aparecimento da doença deve ser prevenido através de vacinação das progenitoras para o antígeno F5, no último terço da gestação, para que a concentração de anticorpos no colostro seja elevada (Crouch et al., 2001).

A redução da exposição à bactéria deve também ser promovida devendo o vitelo nascer num ambiente de carga microbiana reduzida. Deve-se garantir que ingerem colostro tão cedo quanto possível (num máximo de seis horas após o nascimento) e em quantidade adequada (10% do peso vivo). Por último, os vitelos infetados devem ser separados dos saudáveis (Radostits et al., 2007).

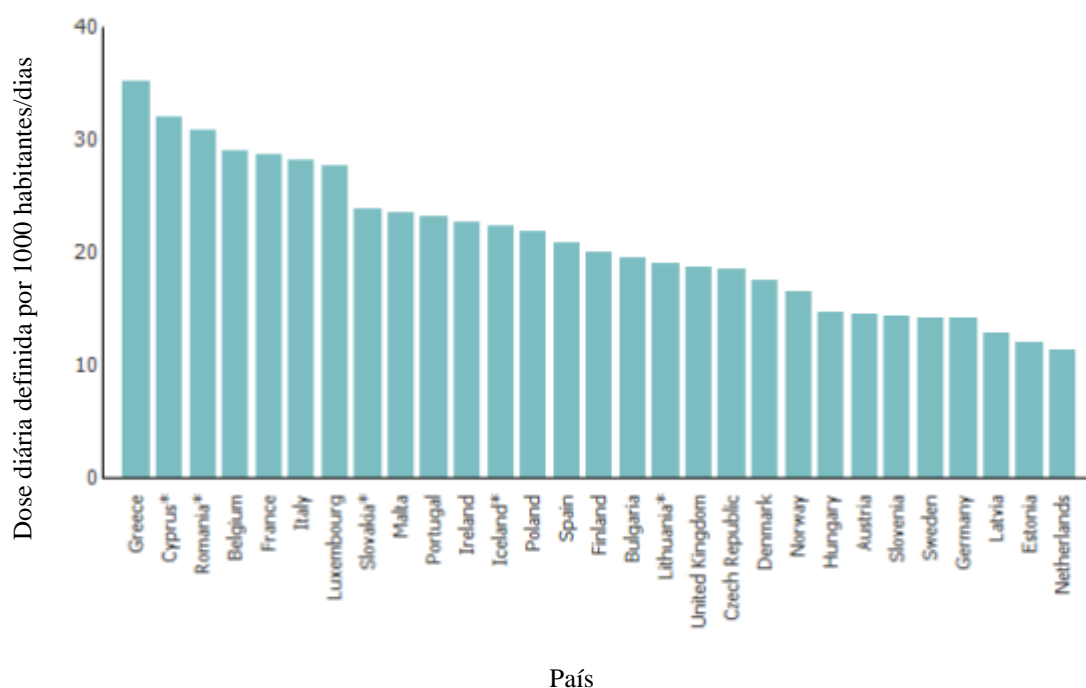
3.3. Utilização de antimicrobianos

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

A descoberta e a utilização destes agentes possibilitaram resultados excelentes contra doenças bacterianas, que até então eram a principal causa de doença e mortalidade (Cohen, 1997). Nas últimas décadas, o uso generalizado, excessivo e indiscriminado destes agentes para vários fins, como promotores de crescimento, fins terapêuticos e profiláticos tanto em humanos, como em animais e plantas, teve como consequência o desenvolvimento de resistências pelas bactérias (Witte, 1997; Barbosa & Levy, 2000).

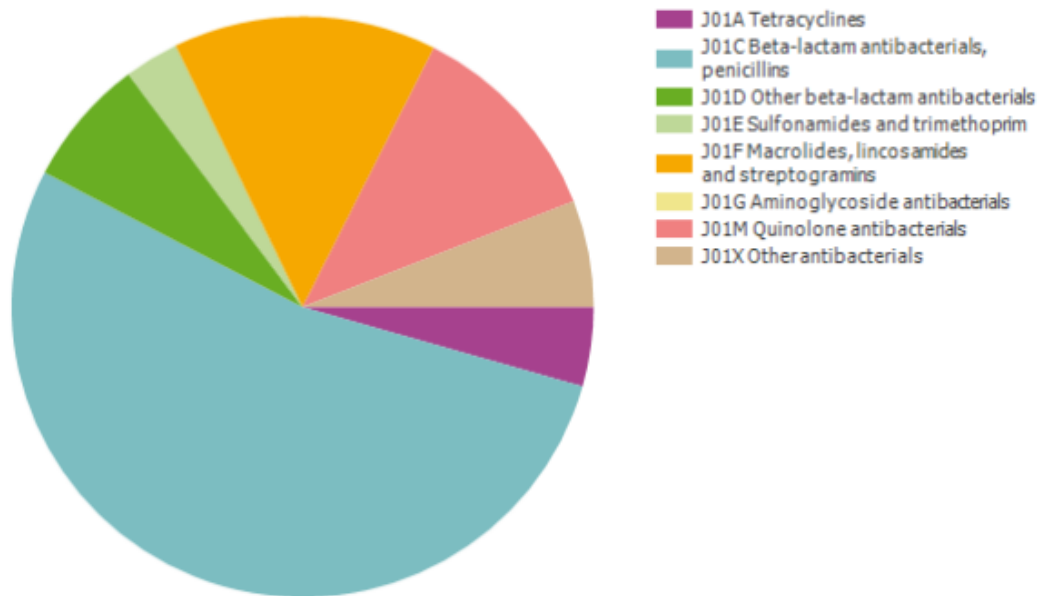
Nos gráficos seguintes é possível visualizar a utilização nos animais, em larga escala, de antimicrobianos na Europa (Gráfico 2) bem como caracterizar a sua utilização no caso concreto de Portugal (Gráfico 3).

Gráfico 2 – Consumo de Antimicrobianos de uso sistémico na Europa (Fonte: ESAC-Net 2011).



País

Gráfico 3 – Distribuição do consumo de antimicrobianos de uso sistémico em Portugal (Fonte: ESAC-Net, 2011)



Os dois principais impulsionadores do desenvolvimento e aumento de resistência bacteriana são a pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos na microbiota bacteriana, que permite uma seleção preferencial das bactérias resistentes por vantagem competitiva e a disseminação de genes de resistência entre as bactérias, e a transmissão de microrganismos resistentes através de contacto direto, superfícies contaminadas, água e comida (WHO, 2011).

Nos dias de hoje, os sistemas de produção intensiva de bovinos, com elevada carga animal, são favoráveis ao desenvolvimento de infeções que, conseqüentemente, obrigam ao recurso a antimicrobianos, quer com fins terapêuticos, quer profiláticos ou metafiláticos, quer ainda ao uso “off-label” ou “extra-label” criando condições ideais de pressão seletiva nas bactérias (Fàbrega, Sánchez-Céspedes, Soto & Vila, 2008).

O uso profilático refere-se ao uso de um ou mais antimicrobianos em animais saudáveis considerados em risco de desenvolverem uma infeção ou antes do início clínico de uma doença infecciosa; este tratamento inclui o controlo da disseminação de uma doença infecciosa clinicamente diagnosticada num grupo de animais e a prevenção de uma doença infecciosa que ainda não foi clinicamente diagnosticada (Codex Alimentarius Commission, Recommended Code of Practice 61, 2005).

De referir que, frequentemente, quando se faz referência ao controlo de doença, mais do que à prevenção da mesma, o conceito de metafilaxia pode ser usado em substituição do conceito de profilaxia, sendo definido como a medicação em massa de um grupo de animais com vista a eliminar ou minimizar um surto de doença já identificado em alguns animais do efetivo (Coe & Grooms, 2002).

O uso terapêutico refere-se ao uso de um antimicrobiano com o propósito específico de tratar um animal ou animais com uma doença infecciosa clinicamente diagnosticada (CAC/RCP 61, 2005). Por último, a utilização “off-label” envolve a administração do fármaco de outra forma que não aquela descrita nas indicações de uso; isto inclui o uso em espécies diferentes, para uma indicação diferente ou numa dose diferente da recomendada (Moon et al., 2011).

Nas explorações leiteiras, a maior parte dos vitelos são retirados às mães logo no primeiro dia de vida e seriam, idealmente, alojados separadamente de forma a controlar eventuais agentes infecciosos, alimentados com leite de desperdício ou leite de substituição por 6 a 8 semanas, desmamados e depois acomodados em grupos (McEwen & Fedorka-Cray, 2002). Os antimicrobianos nesta faixa etária são usados, fundamentalmente, com o fim de tratar e prevenir diarreia e pneumonia, ambas, doenças de relevância nos vitelos de aptidão leiteira. Já no que se refere a vacas leiteiras adultas e segundo McEwen e Fedorka-Cray (2002) a principal causa da utilização de antimicrobianos são as mastites.

3.3.1. Pressão seletiva

A pressão seletiva imposta pela exposição aos antimicrobianos constitui um dos aspetos mais relevantes na origem da crescente resistência a estes fármacos por parte das bactérias, uma vez que a resistência se desenvolve como uma resposta à pressão exercida (WHO, 2011).

Estima-se que cerca de 50% do total da produção de antimicrobianos (por peso) sejam usados em animais e plantas, sendo 50-80% usados em alguns países como promotores de crescimento ou de forma profilática e apenas o restante usado para fins terapêuticos (Fabrega, 2008).

O uso de antimicrobianos, quer para fins profiláticos quer para fins terapêuticos, causam esta pressão seletiva nas bactérias de origem animal (Fabrega, 2008).

Para que tal se verifique são, portanto, necessárias duas condições: o seletor tem que estar numa concentração que possibilite a sobrevivência da bactéria, o que é comumente referido como concentração sub-inibitória, e a substância seletora tem que estar em contacto prolongado com a população bacteriana (Acar & Rostel, 2003).

Com o passar do tempo, e tal como sugeriu Darwin, os organismos resistentes são favorecidos face aos organismos suscetíveis ao efeito dos fármacos, tornando-o gradualmente ineficaz (Laxminarayan, 2003).

O principal fator que contribui para o aparecimento de resistências a antimicrobianos em bactérias indicadoras, como *E. coli* comensal, é a pressão seletiva exercida pelo uso destes fármacos em diferentes populações de animais produtores de alimentos.

A pressão seletiva imposta pela utilização de antimicrobianos promove o aparecimento de bactérias resistentes por dois motivos. Primeiro, porque ao haver uma pressão seletiva haverá uma disseminação preferencial das bactérias resistentes pela existência de uma vantagem competitiva sobre as bactérias suscetíveis e, segundo, porque a existência de uma pressão seletiva vai facilitar a disseminação de possíveis genes de resistência entre as bactérias (Call, Davis & Sawant, 2008).

Quando estes fármacos são administrados a animais, a resistência poderá ser selecionada na microbiota comensal intestinal, bem como noutros locais colonizados por agentes patogênicos. Por outro lado, a resistência pode também diminuir em prevalência quando a administração de um antimicrobiano é reduzida ou descontinuada, pois embora as estirpes individuais possam reter os genes responsáveis pela resistência, estas serão eventualmente repostas por estirpes suscetíveis assim que a pressão seletiva for removida (Phillips et al., 2004).

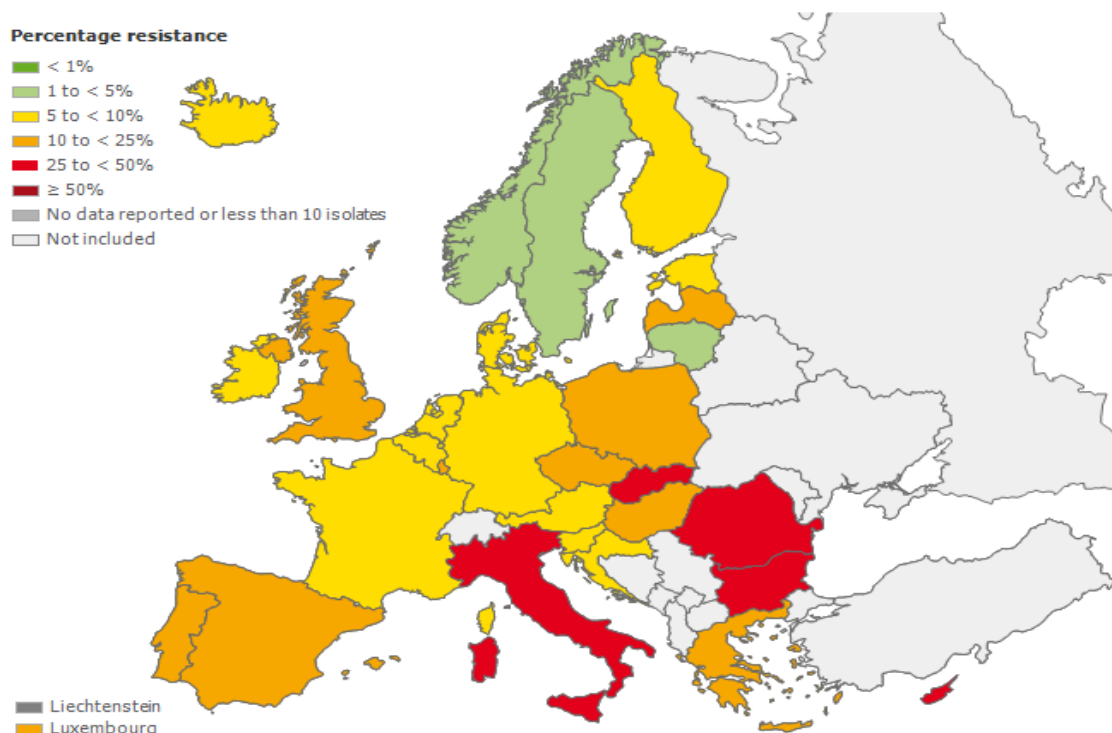
Segundo McEwen (2002) os esquemas de administração de antimicrobianos variam muito mas, nalguns países, a maioria dos animais de produção recebe nalguma fase da sua vida e muitos deles, por longos períodos de tempo estes fármacos em doses sub-terapêuticas.

Pensa-se que a pressão seletiva derivada do uso destes agentes é maior durante a baixa-dosagem e exposição a longo-prazo, característica da utilização como promotores de crescimento e profiláticos (McEwen, 2002). Também a metafilaxia pode contribuir para a promoção da seleção de bactérias resistentes (Lorenz et al., 2011). No entanto, também o uso terapêutico, que requer elevadas doses em curtos períodos de tempo, pode contribuir para o aparecimento de resistência (McEwen, 2002).

As bactérias entéricas de animais produtores de alimentos são particularmente expostas a pressão seletiva (McEwen, 2002), pelo que a ocorrência de resistência a antimicrobianos em microrganismos indicadores comensais, como *E. coli*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, constitui um bom indicador da pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos na população bacteriana intestinal de animais de produção (EFSA & ECDC, 2011). Por outro lado, estes microrganismos funcionam também como reservatório de genes de resistência que podem ser transferidos para outras bactérias patogênicas e/ou comensais (EFSA, 2008). Neste contexto, a monitorização de resistência a antimicrobianos em bactérias comensais como a *E. coli*, isoladas de animais saudáveis, selecionados aleatoriamente e escolhidos para serem representativos da população em geral, pode fornecer informação valiosa a respeito dos determinantes de resistência presentes em bactérias de origem animal (EFSA & ECDC, 2011). Devem ser alvo desta monitorização as classes de antimicrobianos criticamente

importantes usados em medicina humana e em medicina veterinária tal como a efetuada pelo Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) (Figura 8).

Figura 8 – Percentagem de resistências de *E. coli* a Cefalosporinas de 3ª geração verificadas nos países participantes (Fonte: ESAC-Net, 2012).



3.3.2. Resistências

Uma consequência inevitável do uso massivo de antimicrobianos é o aparecimento e disseminação de bactérias resistentes e a transmissão entre bactérias de genes de resistência (Fabrega, 2008).

A resistência aos antimicrobianos é um problema global, com implicações em saúde pública. O seu uso generalizado permitiu às bactérias sobreviver e multiplicar-se sob a pressão dos antimicrobianos devido à sua flexibilidade genética (Cohen, 1997; Kapil, 2005).

É considerada a presença de resistência quando uma estirpe não é suscetível a uma concentração clinicamente relevante de um antimicrobiano e/ou quando é demonstrado que a estirpe dispõe de mecanismos ou propriedades que possam tornar o antimicrobiano ineficaz (Degener, 1999).

Apesar da natureza complexa da resistência aos antimicrobianos, a exposição a estes fármacos é considerada o fator mais importante na origem e disseminação da resistência. Por contraste,

quando a utilização de antimicrobianos é reduzida ou abolida, pode ocorrer um decréscimo na prevalência de isolados resistentes (Cantón & Morosini, 2011).

A pressão seletiva imposta pela exposição de uma população bacteriana a um dado antimicrobiano está, assim, associada à resistência observada para esse fármaco (Alessiani et al., 2009).

O seu uso pode não influenciar diretamente o aparecimento de resistências ao nível das bactérias, mas pode criar um ambiente com uma pressão seletiva que favorece o aparecimento de tais resistências (Fabrega, 2008). Estas podem surgir, ou ser adquiridas, a partir de mutações a nível cromossómico, transferência de plasmídeos, transferência de genes entre elementos genéticos no interior da bactéria, e transferência de genes entre bactérias (von Baum & Marre, 2005). Esta capacidade de desenvolver mecanismos de resistência depende da fisiologia das bactérias, das características das mutações que podem ocorrer, da supremacia dos genes de resistência adquiridos e do período de exposição aos antimicrobianos (Van den broucke-Grauls, 1993; Levy, 1998).

A transferência de genes de resistência entre bactérias pode dar-se por conjugação, transdução e transformação (Hawkey, 2008). A conjugação em bactérias Gram-negativas é um processo replicativo em que a bactéria recetora adquire uma nova cópia do plasmídeo transferido e que é mais significativo em populações bacterianas de grande densidade, como acontece no trato intestinal (Rang et al., 2004). Na transdução o ADN do plasmídeo é envolvido num bacteriófago e transferido para uma nova estirpe. A transformação ocorre em algumas bactérias quando, em condições naturais, captam ADN livre do ambiente e incorporam-no no seu genoma ou plasmídeos (Hawkey, 2008).

Os mecanismos bioquímicos de resistência podem basear-se numa variedade de mecanismos, podendo ser divididos em quatro categorias principais: alteração da permeabilidade da membrana; expulsão ativa do antimicrobiano (efluxo); modificação ou proteção do alvo e modificação ou inibição enzimática do antimicrobiano. Todos estes mecanismos são influenciados por proteínas e podem ocorrer simultaneamente num microrganismo (Fuchs et al., 1994; Hancoch, 2005, Tenover, 2006; Sousa & Peixe, 2010).

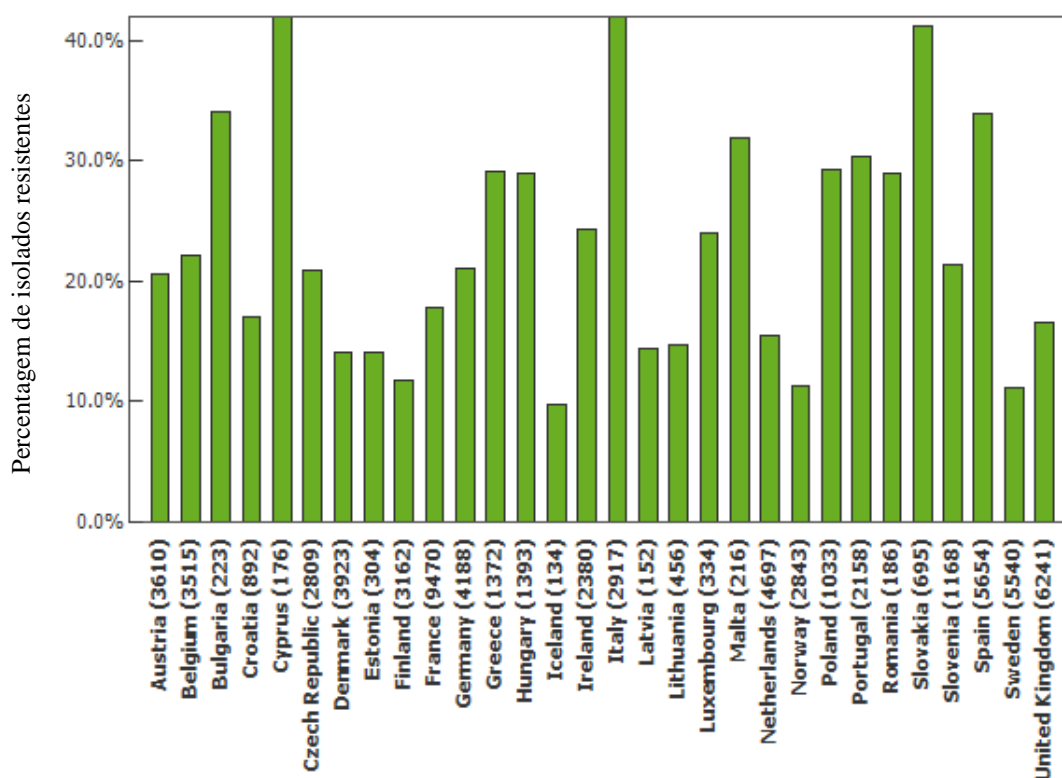
Estas bactérias, comumente isoladas de fezes de animais, atuam como reservatório de genes de resistência a antimicrobianos havendo o risco desses genes serem transmitidos a agentes patogénicos que entrem em contacto com elas. Assim, estas bactérias são consideradas boas indicadores do nível de pressão seletiva imposta nos animais pelo uso de antimicrobianos, e podem dar uma ideia sobre o nível de resistência que se pode esperar nos agentes patogénicos. Ao analisar a prevalência da resistência na microbiota comensal de diferentes animais e na

população humana, torna-se possível comparar essa prevalência entre espécies e identificar transferências de resistência entre bactérias (Bogaard, 2000).

A monitorização da resistência nestes organismos indicadores comensais permite, além de determinar a taxa de resistência naquela população, avaliar o efeito dos padrões de uso de antimicrobianos num determinado país e numa determinada espécie animal (EFSA, 2011).

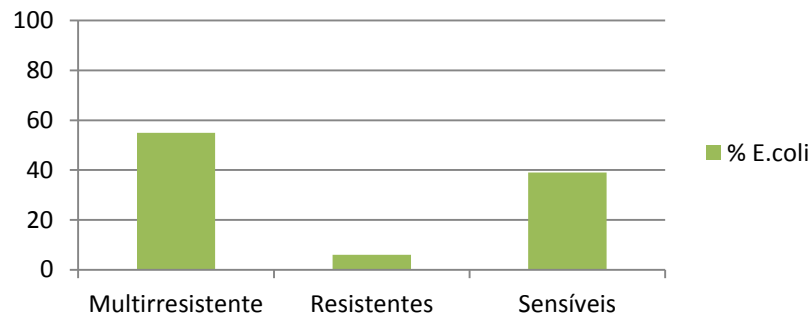
Segundo dados reportados ao ECDC, Portugal figura entre os países da Europa com elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos em diferentes bactérias potencialmente causadoras de infeções graves no Homem como demonstrado, a título de exemplo, pelo Gráfico 4.

Gráfico 4 – Proporção de estirpes de *E. coli* resistente a fluoroquinolonas nos países participantes (Fonte: ESAC-Net, 2012).



Num estudo de 2006, Berge e colaboradores avaliaram a influência da administração profilática de um antimicrobiano (tetraciclina) por via do leite e da administração terapêutica de ceftiofur em vitelos no aparecimento de isolados de *E. coli* comensal multirresistente. Houve uma pressão seletiva para a ocorrência de *E. coli* multirresistente, surgindo 55% dos isolados multirresistentes (resistência a dois ou mais antimicrobianos), 6% resistentes a um antimicrobiano e apenas 39% dos isolados provaram ser sensíveis (Gráfico 5). Foi então comprovado, neste estudo, que a exposição dos animais a um determinado antimicrobiano levou ao desenvolvimento de resistências nos isolados a mais do que um tipo de antimicrobiano.

Gráfico 5 - Ocorrência de resistências em *E.coli* após administração profilática de um antimicrobiano (tetraciclina) por via do leite e da administração terapêutica de ceftiofur em vitelos (Adaptado de: Berge et al, 2006).



No entanto também a situação inversa pode ocorrer, ou seja, a remoção da fonte de pressão seletiva (exposição a antimicrobianos) pode levar ao aumento de suscetibilidade nas bactérias comensais intestinais. O estudo de Kaneene e colaboradores (2008) demonstra isso mesmo. Kaneene avaliou se a remoção da exposição subterapêutica dos vitelos à tetraciclina e à neomicina iria aumentar a suscetibilidade dos isolados de *E. coli* e *Salmonella spp.* aos antimicrobianos. Antes da suspensão da exposição foram recolhidas várias amostras de fezes e verificou-se que os isolados de *E. coli* e *Salmonella spp.* obtidos nestas amostras evidenciaram uma elevada resistência à tetraciclina (> 77%). Os isolados obtidos após a remoção do antimicrobiano demonstraram um aumento significativo na sua suscetibilidade. Foi possível então concluir que a interrupção da exposição a antimicrobianos resultou num aumento significativo de sensibilidade das bactérias tanto comensais como patogénicas.

Outra forma de avaliar a prevalência de resistências em *E. coli* comensal é comparar explorações convencionais com explorações biológicas, onde a exposição a antimicrobianos é muito mais reduzida. Sato, Bartlett e Saeed (2005) verificaram que os isolados de *E. coli* de explorações convencionais de bovinos apresentaram valores significativamente mais elevados de resistência do que as explorações biológicas a 7 dos 17 antimicrobianos testados (ampicilina, estreptomicina, canamicina, gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina e sulfametoxazole). Porém, apesar das explorações biológicas estarem associadas a baixas prevalências de resistências a antimicrobianos, as bactérias que desenvolveram resistências persistem durante muitos anos nestas explorações, mesmo que não haja administração de antimicrobianos, o que faz realçar o facto de que não ser só a pressão seletiva imposta pelos antimicrobianos que faz surgir as resistências em bactérias (Ball et al., 2000).

Devido à crescente importância do tema em questão, a EFSA, em conjunto com o ECDC, possuem uma rede de monitorização da prevalência das resistências de agentes patogénicos e

elementos indicadores aos antimicrobianos, com base nos dados reportados pelos Estados Membros.

No último relatório emitido pela EFSA (2010), a prevalência das resistências, entre os anos de 2004 e 2007, nos Estados Membros para *E.coli* comensal de bovinos foi o expresso no Quadro 4.

Quadro 4 - Níveis de resistência de *Escherichia coli* comensal aos nove antimicrobianos estudados em bovinos, declarados por oito Estados Membros no ano de 2007 (Adaptado de: EFSA, 2010).

Antimicrobianos	% de isolados resistentes
Tetraciclina	27 (n= 1138)
Cloranfenicol	10 (n= 1132)
Ampicilina	18 (n= 983)
Ceftiofur	1 (n= 248)
Cefotaxim	2 (n=761)
Sulfonamida	23 (n= 1139)
Gentamicina	6 (n=886)
Ciprofloxacina	33 (n=701)
Ácido Nalidíxico	4 (n=1138)

Durante a última década o aparecimento de bactérias resistentes a estes antimicrobianos tem vindo a aumentar rapidamente e bactérias como a *E. coli* comensal são agora alvo de elevada monitorização (EMEA, 2009).

4. Objetivos

Uma vez que os leites de desperdício são um recurso tentador e disponível nas explorações leiteiras para a alimentação de vitelos, tem-se o intuito de, com este trabalho, identificar alguns dos potenciais riscos da sua administração e a sua contribuição para o desenvolvimento de resistências em *E. coli* comensal.

Pretendeu-se, por isso:

- Caracterizar as diferentes formas de manejo das explorações através da realização de um questionário.
- Observar a prevalência de resistências de *E. coli* proveniente de fezes de vitelos, determinando os isolados resistentes aos antimicrobianos em estudo (amoxicilina/ácido clavulânico, ceftiofur, enrofloxacina, gentamicina, tetraciclina e trimetoprim/sulfametoxazole).
- Relacionar as práticas usuais das explorações com as resistências verificadas.

5. Materiais e Métodos

5.1. Caracterização das explorações

Para a realização deste trabalho recolheram-se amostras de fezes de vitelos de raça Holstein-Frísia, bem como de leite de desperdício de 37 explorações leiteiras pertencentes à Proleite - Cooperativa de produtores de leite da zona centro litoral portuguesa, e de algumas explorações do Ribatejo e Alto Alentejo.

No coletivo existem explorações bastante diferentes entre si, indo desde explorações modernas e de grandes dimensões (Figura 9A) até pequenas explorações de carácter familiar (Figura 9B), possuindo desde 16 até 715 vacas em ordenha, apresentando em média 160 animais em ordenha no dia da realização do questionário integrante deste trabalho (Anexo I). No total existiam 13 explorações com menos de 50 animais, 10 que possuíam entre 50 e 100 animais e 14 com mais de 100 animais em lactação no momento de implementação dos questionários integrantes deste estudo.

Figura 9 – Exemplos de explorações estudadas (A e B).



(A)

(B)

Também as práticas de manejo e alojamento dos vitelos, nas explorações observadas, são bastante diversas (Figura 10 A e B).

Figura 10 – Vitelheiros de diferentes explorações (A e B).



(A)

(B)

5.2. Questionários

Foram realizados questionários em todas as vacarias estudadas de forma a caracterizar a exploração e as suas práticas habituais.

O questionário foi constituído por 21 perguntas de escolha múltipla ou resposta curta tendo sido efetuado ao proprietário da exploração ou ao seu responsável aquando duma visita à exploração inserida no acompanhamento clínico ou reprodutivo da mesma (Anexo I).

5.3. Recolha de amostras

No decorrer do estágio foram colhidas amostras de fezes de vitelos, saudáveis e de ambos os sexos, presentes nas 37 explorações em estudo, no período de 26 de Setembro de 2013 a 10 de Março de 2014.

No total recolheram-se 37 amostras de fezes de vitelos não desmamados.

As colheitas foram efetuadas por recolha direta a partir da ampola rectal removendo-se deste modo uma pequena porção de fezes para a qual contribuíram 5 ± 1 vitelos para cada amostra.

A cada amostra foi atribuído um número correspondente ao seu registo (data, exploração, nº de recolha, nº de animais que contribuíram).

As amostras foram mantidas congeladas até 3 de Março de 2014 e transportadas para o laboratório da FMV onde se efetuou o seu processamento e análise.

5.4. Análises efetuadas

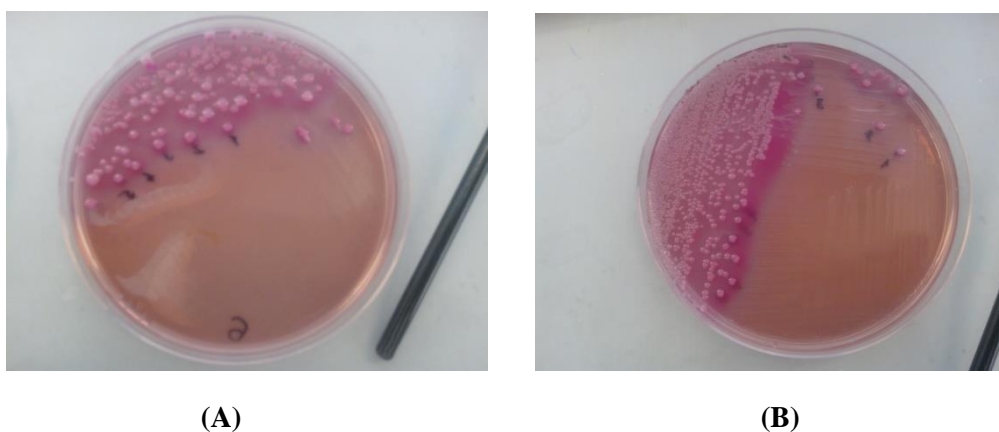
5.4.1. Isolamento de *Escherichia coli* comensal

As amostras foram processadas para a pesquisa de *E. coli*, seguindo o protocolo seguidamente descrito:

Homogeneizaram-se as amostras de fezes em 9ml de NaCl 0,9% (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Semeou-se, então, cada amostra com uma ansa de 10 µl por estria em placas de Agar MacConkey Agar (Liofilchem, Itália). As placas foram então submetidas a incubação a 37 °C±1 °C durante 24h±3h (Figura 11 A e B).

Figura 11 – Placas de Agar MacConkey após incubação.



Posteriormente foram selecionadas, em cada placa, 5 colónias presumivelmente de *E. coli*, avaliadas pela morfologia e cor, e repicadas individualmente para placas de Agar Columbia (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França). As placas foram então submetidas a incubação a 37 °C±1 °C durante 24h±3h (figura 12, A e B)

5.4.2. Identificação de isolados de *Escherichia coli* comensal

A partir das culturas puras obtidas, foi realizado, a cada uma, o teste presuntivo IMViC a fim de se comprovar estarmos na presença de culturas de *E. coli*.

Para tal, a cada isolado foi efetuada uma galeria IMViC (SIM-medium®, Merck, Darmstadt, Alemanha; MR-VP broth®, Liofilchem, Itália; Simmons Citrate Agar®, Oxoid, Hampshire, Inglaterra).

Os tubos obtidos foram sujeitos a incubação a 37 °C±1°C durante 24h±3h sendo posteriormente feita a sua leitura. Consideramos estar na presença de culturas puras de *E. coli* sempre que foi obtido o padrão expresso no Quadro 5 e demonstrado na Figura 12.

Quadro 5 - Resultados de *E. coli* ao teste IMViC.

Testes IMViC	<i>E. coli</i>
MR-VP	
MR	+
VP	-
Citrato de Simmons Agar	
Citrato	-
SIM Agar	
Indol	+
Mobilidade	+
H ₂ S	-

Figura 12 – Padrão obtido por *E. coli* ao teste IMViC.



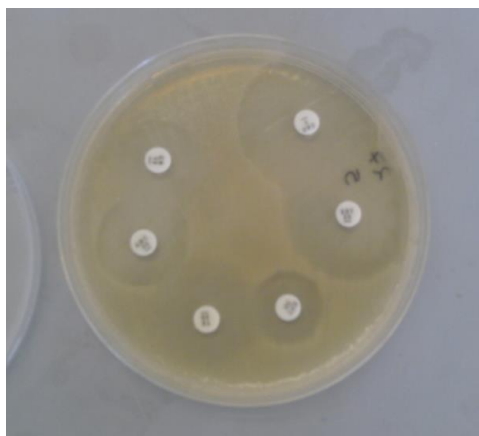
5.4.3. Suscetibilidade aos antimicrobianos

A fim de avaliar a suscetibilidade dos isolados de *E. coli* aos antimicrobianos recorreu-se ao método de Kirby-Bauer. Para tal foram usados discos (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) dos seguintes antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg), enrofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg) e sulfametoxazole/ trimetoprim (23,7/1,25 µg) e ceftiofur (30 µg – Mast diagnostics, Merseyside, U.K).

O teste foi feito em placas de Müeller-Hinton Agar (Condal, Madrid, Espanha), a partir de colônias de cultura pura de *E. coli* homogeneizadas em 4 ml Soro Fisiológico (Merck, Darmstadt, Alemanha) de forma a obter uma turvação de 0,5 na escala de MacFarland.

As placas foram então submetidas a incubação a 37 °C±1 °C durante 24h±3h (figura 13) e os resultados foram interpretados de acordo com os critérios definidos no documento M31-A3 do (CLSI, 2008) (Quadro 6).

Figura 13 – Placa resultante do TSA.



Quadro 6 - Critérios de avaliação dos antimicrobianos utilizados segundo o *Clinical Laboratory Standards Institute*, 2008.

Antimicrobianos	Limite dos diâmetros (mm)		
	Sensível	Intermédio	Resistente
AMC	≥18	14-17	≤13
ENR	≥21	17-20	≤16
CN	≥15	13-14	≤12
TE	≥19	15-18	≤14
SXT	≥16	11-15	≤10
CFT*	≥21	18-20	≤17

*Critério para Doença Respiratória Bovina – *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni*; e Mastite Bovina – *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberi* e *Escherichia coli*

Na sequência dos testes de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) os resultados foram analisados de acordo com os padrões de resistência apresentados.

Foi também considerado que um isolado sem resistências é um isolado suscetível, um isolado resistente a um antimicrobiano possui resistência simples, um isolado resistente a dois

antimicrobianos - resistência múltipla e isolados resistentes a três ou mais - multirresistente (Centeno, 2010).

5.5. Análise estatística

Os resultados foram analisados através do programa Excel do Microsoft Office 2007®, para o cálculo de frequências e percentagens, e recorrendo ao freeware disponibilizado em “vassarstats.net” onde foram testadas associações estatísticas através do teste de Qui Quadrado quando os resultados eram superiores a 5 e o Teste Exato de Fischer quando os resultados eram inferiores a 5 (considerando um erro de 5%).

6. Resultados

6.1. Questionários

Nesta secção apresentam-se os resultados obtidos a partir da análise das respostas dadas, pelos inquiridos, ao questionário aplicado a 37 produtores.

A fim de ter uma ideia geral da dimensão de cada exploração foi efetuada uma primeira questão com o intuito de se conhecer o “Número de animais em lactação”.

Em média, as explorações estudadas apresentavam no dia de realização do questionário, 160 animais em lactação, com um mínimo de 16 e um máximo de 715.

Pode-se constatar que, quanto ao tipo de maternidade, 8% das explorações possuíam maternidade individual, e 92% tinham maternidades de grupo.

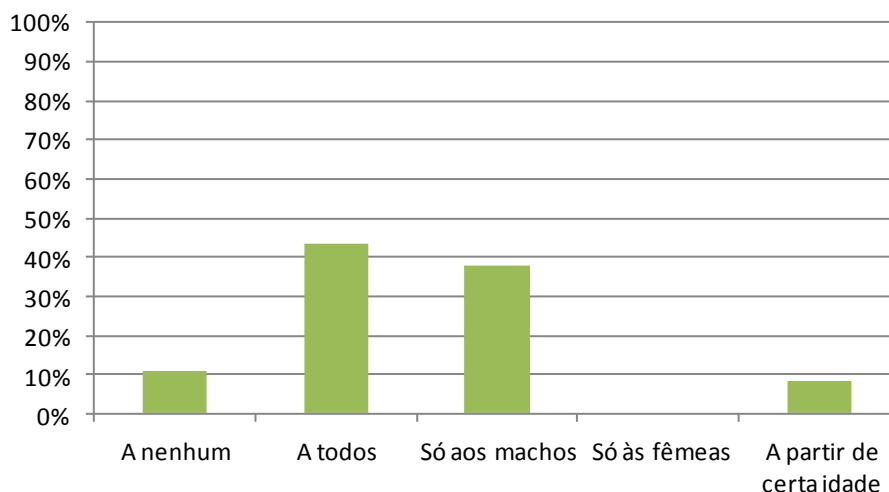
No caso das maternidades de grupo, em média encontravam-se 14,4 animais adultos em contacto com o animal aquando do parto (com um mínimo de dois e um máximo de 60).

No que concerne à questão quatro “Quanto tempo os vitelos ficam com a mãe após o parto?” foi possível concluir que em 32% das explorações, estes ficavam menos de uma hora com as mães, em 49% ficavam entre uma e quatro horas, em 16% entre quatro e nove horas e em 3% (apenas uma exploração) ficavam mais de 24 horas em contacto com a mãe após o parto.

Relativamente à questão 5 “Qual o destino dado aos seus vitelos?”, e tendo em conta que o destino dado aos vitelos varia com o sexo, constatou-se que, no caso dos machos, 24% das explorações fazem a sua recria, e nos restantes 76%, as explorações vendiam os machos logo que possível. No caso das fêmeas, verificou-se que a totalidade das explorações efetuava a recria das vitelas.

Quanto à pergunta 6 “Dá leite mastítico aos vitelos?” e após a análise dos resultados recolhidos e representados no Gráfico 6, verificou-se que 11% das explorações não tinham esta prática, mas que nos restantes, o leite mastítico era de alguma forma utilizado na alimentação dos vitelos.

Gráfico 6 - Distribuição da frequência da administração de leite mastítico.



No caso dos 33 produtores que administravam leite mastítico, este correspondia, em 19 das explorações, a leite em intervalo de segurança do antimicrobiano de secagem, em 30 delas a leite durante o tratamento de mastites clínicas, em 26 a leite após o tratamento de mastites clínicas mas durante o intervalo de segurança e em 23 a leite com descargas celulares elevadas mas de animais sem estarem em tratamento. De referir que em 11 explorações todo o leite de desperdício, independentemente da sua proveniência, era utilizado na alimentação de vitelos.

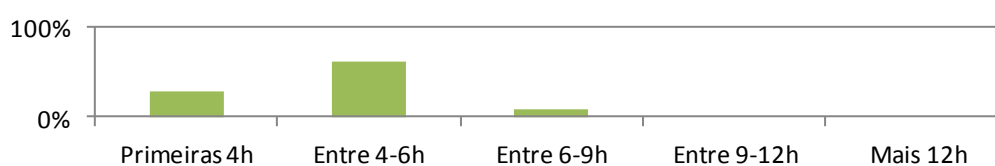
Relativamente à questão 6.1 “Efetua algum tratamento ao leite mastítico?”, pode-se constatar que apenas uma das explorações efetuava a pasteurização do mesmo.

Com a pergunta número 7 “Medica preventivamente os vitelos?” pretendia-se saber se os vitelos eram medicados preventivamente e a que substâncias os produtores recorriam habitualmente para o efeito. Foi então possível constatar que 73% das explorações não o efetuavam e as restantes 27% que recorriam a essa prática usavam, na sua maioria aminosidina (Gabbrocol®, CEVA) ou toltrazuril (Baycox®, Bayer), a fim de prevenir diarreias neonatais.

Com as questões 8 a 13 inclusive, pretendeu-se caracterizar a administração de colostro na exploração.

A partir dos dados recolhidos pelas respostas dadas à questão 8 “ O colostro que administra é...” conclui-se que 92% dos produtores administravam colostro aos vitelos apenas da própria mãe e os restantes 8% procediam à administração de uma mistura de colostro de várias vacas. A partir das respostas dadas à questão 9 “Como administra o colostro” pode-se concluir que quanto à forma de administração do colostro, 43% utilizava tetina (balde com tetina/biberon), 3% recorria à entubação e os restantes 54% recorriam apenas à administração por balde. A análise da questão 10 “ Quando começa a administração do colostro?” permitiu recolher os dados que se encontram expressos no Gráfico 7.

Gráfico 7 – Percentagem de explorações divididas pelo tempo decorrido após o parto até à administração do colostro.



Constatou-se que a maioria (62%) procedia à sua administração entre as 4 e as 6 horas após o nascimento do vitelo.

A partir da análise das respostas dadas à questão 11 “Que quantidade de colostro administra na primeira refeição?” verifica-se que a quantidade de colostro fornecido variava de menos de 2 L em 24% das explorações, a valores entre 2 a 3L em 59% e entre 3 a 4L em 16% das explorações.

Pode-se constatar, a partir das respostas dadas à questão 12 “Quantas vezes administra colostro no 1º dia?” que em 3% era dado uma única vez no primeiro dia, em 92% era administrado por duas vezes no primeiro dia e em 5% era administrado mais do que duas vezes.

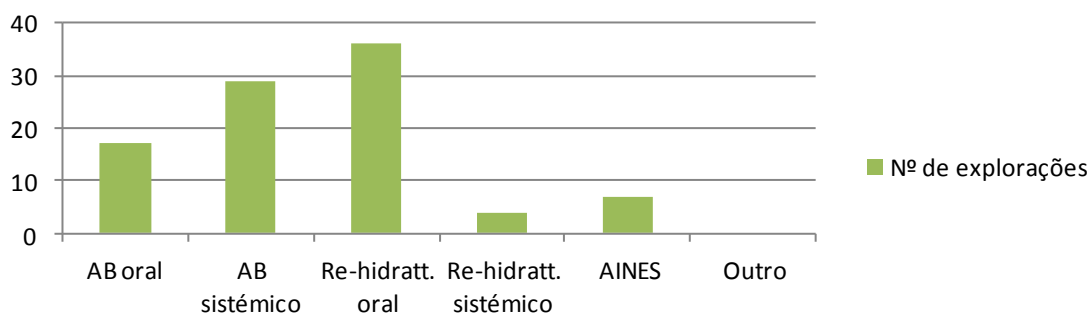
Os dados recolhidos a partir das respostas dadas à questão 13 “Durante quanto tempo administra o colostro” permitem inferir que quanto à duração da administração do colostro 14% dos produtores administrava-o apenas no 1º dia, 27% entre um a três dias e os restantes 59% por mais de três dias.

A partir da análise dos questionários foram recolhidos os dados referentes à questão 14 “Após terminar a administração do colostro, quantas vezes por dia administra leite aos vitelos?” e constatou-se que após a administração do colostro, nas primeiras semanas de vida, em 100% das explorações mantinham-se duas tomas diárias de leite.

As respostas dadas à questão 15 “Que quantidade de leite administra aos vitelos por dia?” permitem depreender que em 54% dos casos são administrados menos de 4 L, em 43% das explorações entre 4 a 8L e nos restantes 3% são administrados mais de 8 L por dia.

No que respeita à questão 16 “O que utiliza para tratar as diarreias dos vitelos” pode-se verificar, através do Gráfico 8, que os mais utilizados eram os re-hidratantes orais e os antimicrobianos por via sistémica ou oral.

Gráfico 8 - Tipo de medicação administrada em casos de diarreia.



Por forma a caracterizar a introdução de novos animais na exploração colocou-se a questão 17: “Compra animais para introduzir na sua exploração?”. Pode-se constatar que 38% dos produtores comprava animais para a sua exploração e 62% não o fazia.

Pela análise dos resultados obtidos e referentes à questão 17.1” Se sim, há quanto tempo foi a última compra?”, constatou-se que nas explorações que efetuaram a compra de animais (n=14), 53% realizaram-na no último ano, 27% nos últimos dois anos e 13% nos últimos dois a três anos.

As respostas dadas à questão 17.2 “Quantos animais comprou nos últimos 5 anos?” permitiu inferir que destes, 29% compraram menos de 10 animais, 50% compraram entre 10 e 50 animais, 14% entre 50 a 100 animais e 7% mais de 100 animais.

Através da análise dos dados recolhidos com a questão 17.3 “ Que tipo de animais comprou?”, constata-se que em sete das explorações foram adquiridas novilhas pré parto (núlparas), em seis, novilhas pós-parto (primíparas) e em seis das explorações, vacas com dois ou mais partos (multíparas).

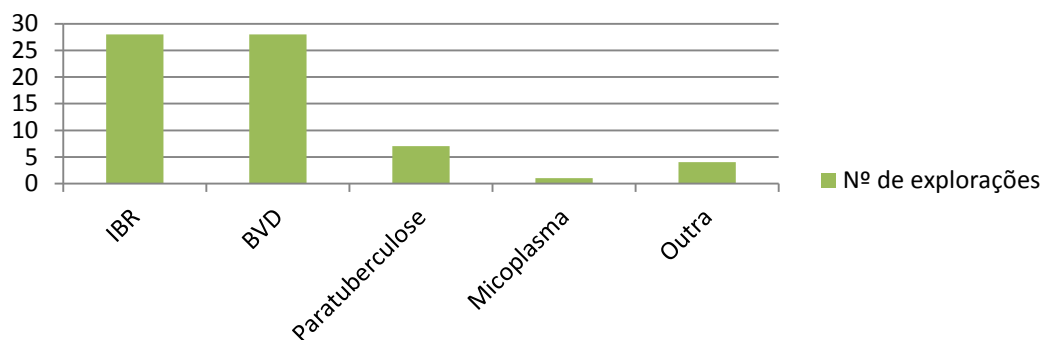
Com a questão 17.4 “Qual a sua origem?” verifica-se que estas provêm do território nacional em nove dos casos e em sete têm proveniência de um país estrangeiro.

Os animais comprados em cinco explorações tinham como origem uma única vacaria e nas restantes doze foram adquiridas através dum negociante.

Quando inquiridos sobre o conhecimento da presença de doenças infecciosas nas suas explorações (questão 18), foi possível, após análise dos dados recolhidos e registados no Gráfico 9, reconhecer que um grande número de explorações tinha conhecimento da presença de IBR e BVD. Foi também referenciado, em sete explorações, a presença de Paratuberculose,

numa de *Mycoplasma bovis* e em quatro a presença de outra doença, mais concretamente de Neosporose (n=4) e Anaplasmosse (n=1).

Gráfico 9 - Distribuição das explorações que têm conhecimento de doenças infecciosas na exploração.

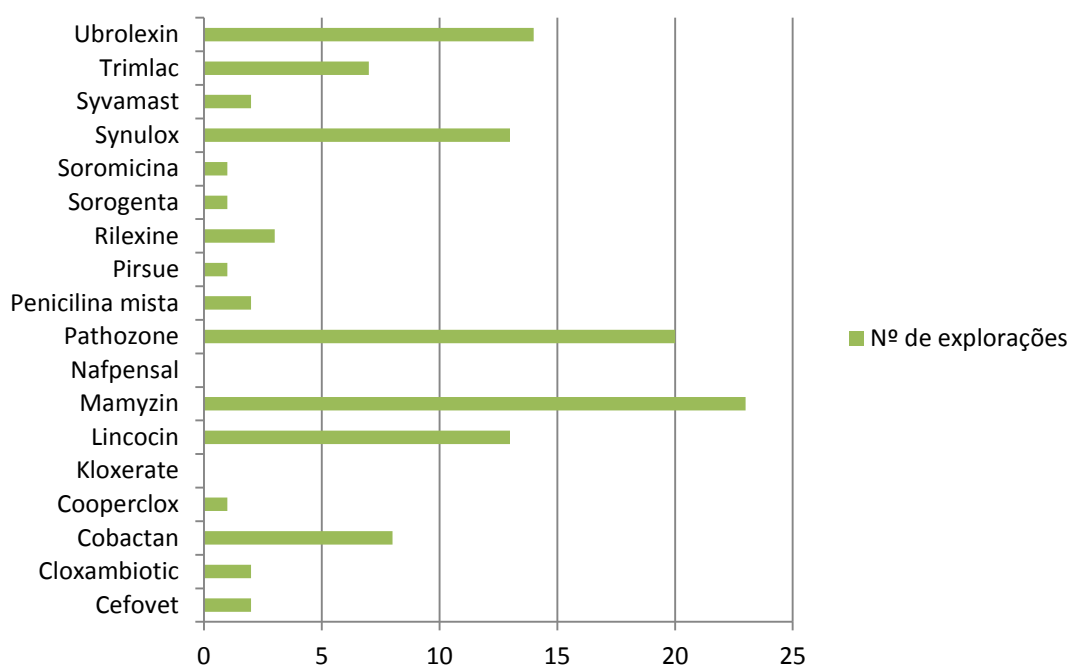


Com a questão 19 “Tem algum plano de controlo destas doenças?” ficou-se a saber se os produtores tinham planos de controlo das doenças nas suas explorações, e quais. Concluiu-se que em 81% destas, existia um plano de controlo das doenças presentes através de vacinação, e em 19% delas não.

A fim de aferir a suspeita da presença de sinais de paratuberculose nos animais da exploração efetuou-se a questão 20 “ No último ano detetou na exploração vacas que se encontrassem magras, com apetite e com diarreia crónica sem cura?”. Pode-se verificar que 30% dos inquiridos deu uma resposta afirmativa (em média três animais por exploração) e 70% responderam negativamente.

Para finalizar, a partir da análise da questão 21 do questionário “Que bisnagas utiliza para o tratamento de mastites?”, pode-se recolher os dados que se encontram expressos no Gráfico 10.

Gráfico 10 - Distribuição das bisnagas utilizadas para o tratamento de mastites (Princípios ativos correspondentes – Anexo II)



Partindo dos resultados recolhidos foi possível identificar que as bisnagas habitualmente mais usadas para o tratamento de mastites foram o Mamyzin® (23 explorações), Pathozone® (20 explorações) e Ubrolexin® (14 explorações) (Anexo II).

6.2. *Escherichia coli*

6.2.1. Isolamento e identificação de isolados de *Escherichia coli*

Das 37 amostras de fezes recolhidas não foi possível realizar o estudo em causa em cinco delas, uma vez que não se verificou qualquer tipo de crescimento bacteriano ou as colónias obtidas não eram correspondentes em morfologia e cor com o esperado para *E. coli* em MacConkey Agar (Liofilchem, Itália).

Das restantes 32, foram seleccionadas, sempre que possível, cinco colónias isoladas.

No total foram testadas 162 colónias em galeria de testes IMViC. Destas, 11 evidenciaram resultados diferentes dos esperados para *E. coli* pelo mesmo método (Anexo III) não tendo por isso sido utilizadas no restante trabalho.

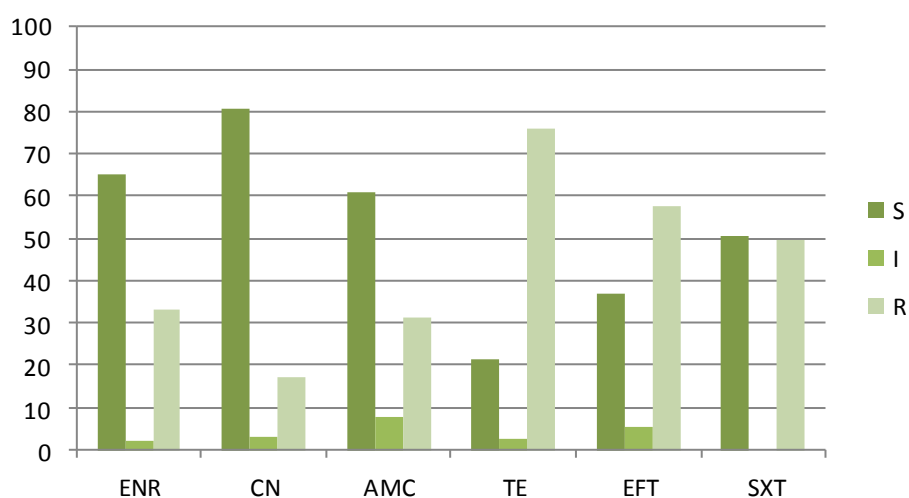
Contribuíram, então, para este estudo cinco explorações com seis isolados, 21 explorações com os cinco isolados pretendidos, uma exploração com quatro e quatro explorações com apenas três isolados, num total de 151 isolados em estudo.

6.2.2. Suscetibilidade aos antimicrobianos

A todas as 151 amostras identificadas como *E. coli*, foi realizado um teste de suscetibilidade a antimicrobianos cujos resultados foram interpretados de acordo com os critérios M31-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) (Anexo IV e V).

Foi possível encontrar as seguintes percentagens dos isolados de *E. coli* resistentes aos diferentes antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulânico - 31,1%, enrofloxacina - 33,1%, gentamicina - 17,2%, tetraciclina - 76,2%, sulfametoxazole/ trimetoprim - 49,7%, ceftiofur - 57,6% (Gráfico 11).

Gráfico 11- Suscetibilidade dos isolados de *E. coli* aos diferentes antimicrobianos classificados em sensível (S), intermédio (I) ou resistente (R) após TSA.



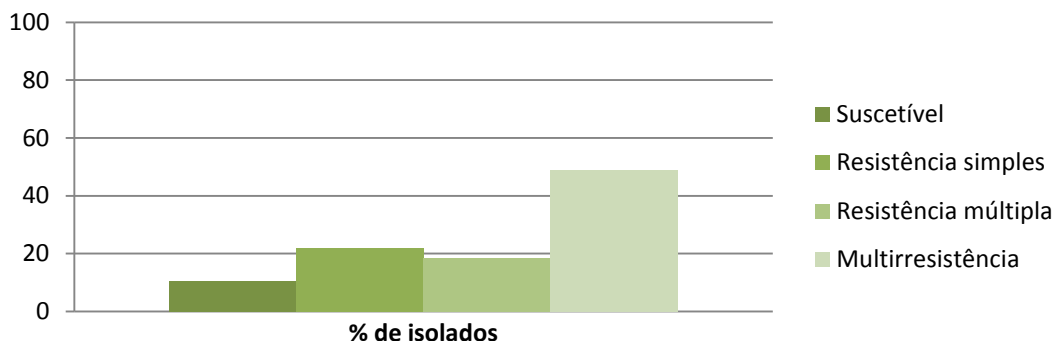
Através da observação do Gráfico 11, foi possível concluir que a tetraciclina foi o antimicrobiano ao qual foram detetados mais isolados com resistência e a gentamicina o antimicrobiano ao qual foram detetadas menos resistências. Podemos então ordenar por ordem decrescente de sensibilidade os antimicrobianos em estudo em: gentamicina, enrofloxacina, amoxicilina/ácido clavulânico, sulfametoxazole/ trimetoprim, ceftiofur e tetraciclina.

No caso da enrofloxacina, gentamicina e amoxicilina/ácido clavulânico a percentagem de isolados sensíveis foi superior às resistências encontradas. Já no caso da tetraciclina e do ceftiofur o padrão inverteu-se, apresentando estes uma maior percentagem de isolados resistentes do que de sensíveis. No respeitante ao sulfametoxazole/ trimetoprim a percentagem de isolados sensíveis e resistentes foi a mesma.

Caracterizando, de forma conjunta, as suscetibilidades verificadas para cada isolado podemos verificar que 16 dos 151 isolados foram considerados suscetíveis (isolados sem resistências; 11%), 33 apresentaram-se com resistência simples (resistentes a um antimicrobiano; 21,9%),

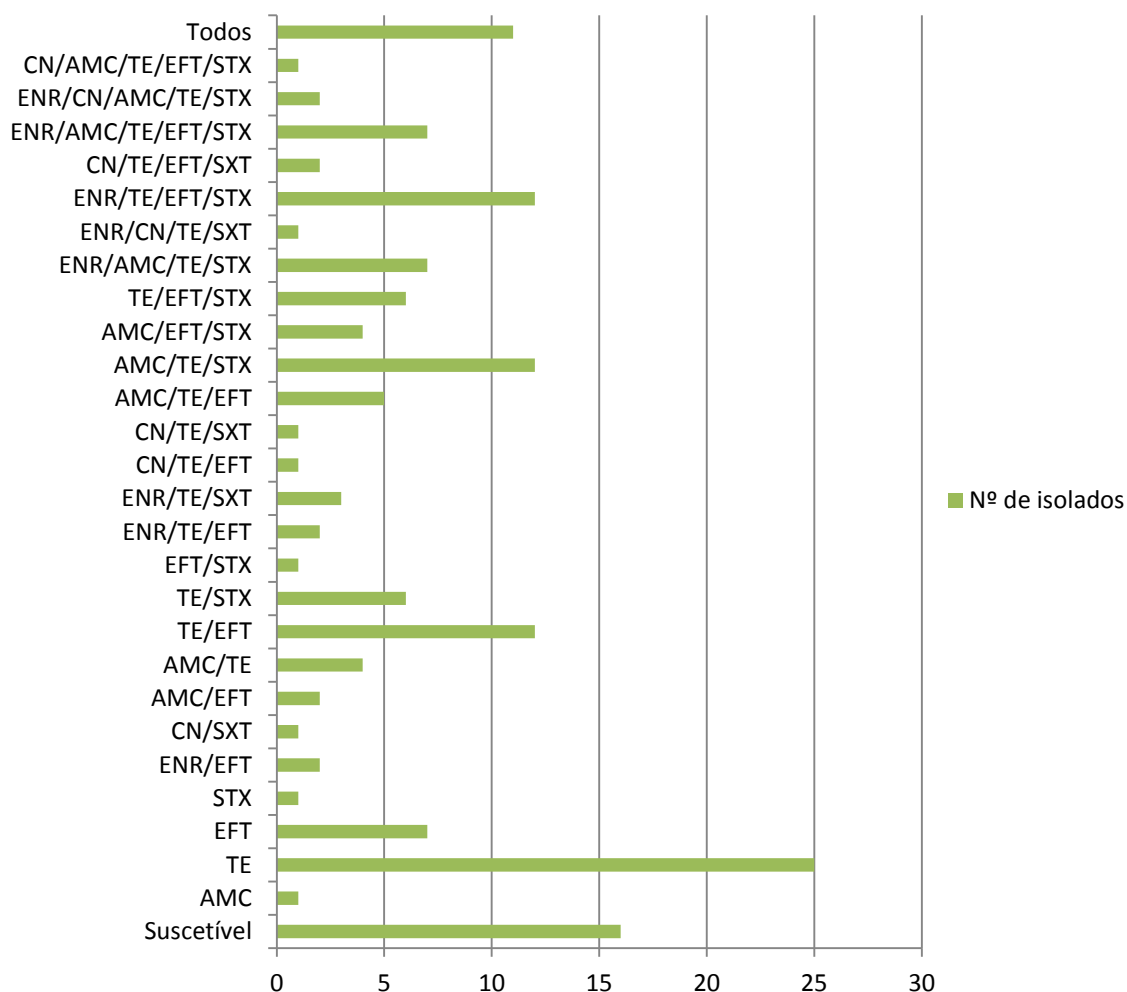
28 com resistência múltipla (resistentes a dois antimicrobianos; 18,5%) e 74 multirresistentes (resistentes a três ou mais antimicrobianos; 49%) (Gráfico 12).

Gráfico 12- Distribuição do padrão de suscetibilidades verificado, considerando que um isolado sem resistências é um isolado suscetível, um isolado resistente a um antimicrobiano possui resistência simples, um isolado resistente a dois antimicrobianos - resistência múltipla e isolados resistentes a três ou mais - multirresistente.



Através do Gráfico 13 pode-se analisar os padrões de resistência verificados. A resistência simples à tetraciclina foi o padrão mais encontrado (n=25).

Gráfico 13 – Padrão de resistências observadas nos isolados de *E. coli*



De forma a estudar-se cada exploração individualmente, reuniram-se os resultados das suscetibilidades dos isolados correspondentes a cada exploração (Quadro 7), tendo sido possível identificar quais os antimicrobianos que não revelaram qualquer tipo de resistência (sensíveis) e quais apresentaram mais de três isolados resistentes (mais resistências) em cada exploração.

Quadro 7 – Suscetibilidades verificadas nas 37 explorações em estudo.

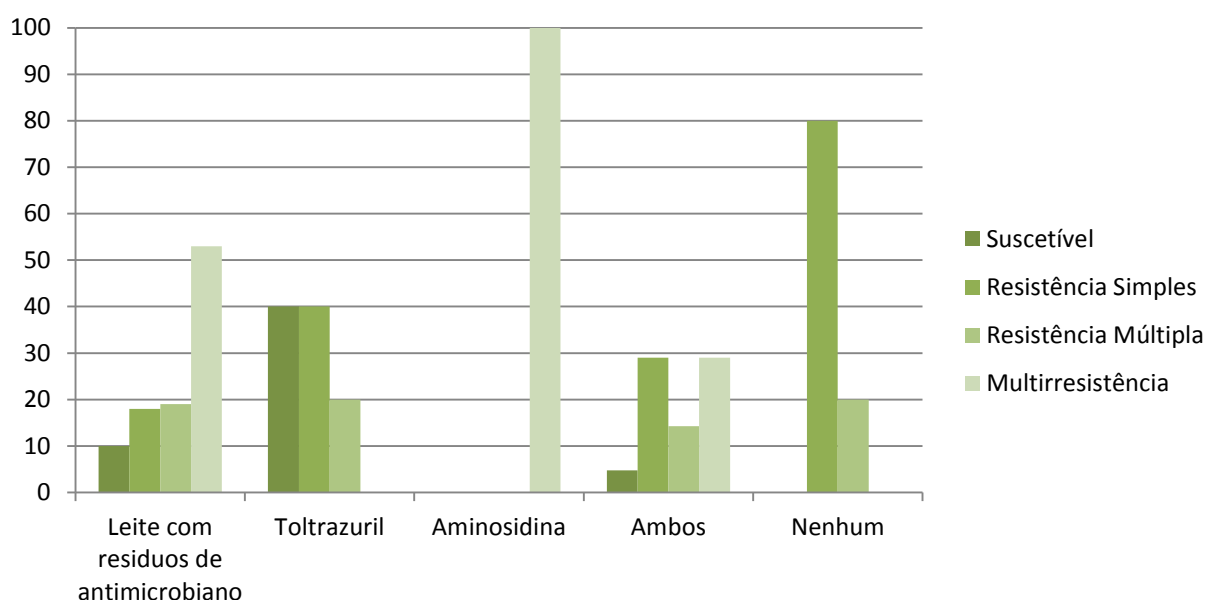
Exploração	Sensíveis	Mais resistências
1	ENR EFT	TE
2	ENR CN SXT	AMC TE EFT
4	ENR CN AMC EFT	TE
5	-	ENR AMC TE EFT SXT
6	ENR CN	AMC TE EFT SXT
7	-	ENR AMC TE EFT SXT
8	CN AMC	ENR TE EFT
9	EFT	AMC TE
10	ENR CN TE	AMC EFT SXT
11	ENR CN AMC EFT	TE
12	ENR CN AMC TE EFT SXT	-
13	ENR CN EFT	TE
15	CN	ENR TE EFT
16	CN AMC	ENR TE EFT SXT
17	ENR CN AMC	-
18	-	ENR AMC TE EFT SXT
19	ENR AMC	TE
20	ENR CN AMC SXT	TE EFT
21	AMC	CN TE EFT SXT
22	-	EFT
23	CN AMC	TE EFT SXT
24	-	ENR TE EFT SXT
25	-	ENR CN AMC TE EFT SXT
26	CN EFT	TE
27	ENR CN AMC SXT	EFT
28	CN	ENR AMC TE SXT
30	-	ENR CN AMC TE EFT SXT
32	-	TE EFT
33	ENR CN AMC EFT	TE
35	ENT CN AMC EFT SXT	TE
36	CN AMC EFT	-

Importa salientar que, apenas numa exploração, todos os isolados obtidos (n=5) eram sensíveis a todos os antimicrobianos em estudo. Pelo contrário, em duas explorações, a totalidade dos isolados obtidos eram resistentes a todos os antimicrobianos.

Também, em sete explorações, não foi possível verificar qualquer antimicrobiano que reunisse sensibilidade para todos os isolados obtidos na exploração. Mais uma vez verificou-se que a tetraciclina foi o antimicrobiano com mais resistências por exploração.

Relacionando as práticas de manejo caracterizadas através do questionário, com as suscetibilidades verificadas, foi possível obter os resultados registados no gráfico 14.

Gráfico 14 - Categorização dos isolados de acordo com as práticas realizadas em cada exploração de acordo com o número de antimicrobianos a que apresentavam resistências.



Concluiu-se que nas explorações em que era administrado leite de desperdício, 10,1% dos isolados eram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, 17,6% apresentavam resistência simples, 19,3% resistência múltipla e os restantes 52,9% eram multirresistentes.

No caso em que não era dado leite de desperdício, mas todos os animais eram medicados preventivamente podemos subdividir os resultados de acordo com a pré-medicação efetuada (toltrazuril e aminosidina) uma vez que os resultados obtidos no TSA são bastante diferentes. No caso de serem pré-medicados com toltrazuril os isolados foram na sua maioria suscetíveis ou apresentaram resistências simples, enquanto no caso de ser administrada aminosidina, 100% dos isolados apresentavam multirresistências.

No caso de explorações que recorriam às duas práticas em simultâneo verificaram-se 4,8% de isolados sensíveis, 28,6% com resistência simples, 14,3% com resistência múltipla e 28,6% com multirresistência.

A exploração que não medicava preventivamente os vitelos nem administrava leite de desperdício apresentou 80% de isolados com resistência simples e os restantes 20% com resistência múltipla.

Posteriormente, foi analisada estatisticamente a dependência de algumas variáveis em estudo. Foi possível concluir que a administração de leite contendo resíduos de antimicrobianos (em explorações em que não era efetuada pré-medicação) apresentava uma relação estatística significativa com o aparecimento de isolados multirresistentes ($p= 0.026$). Também nas explorações em que não era administrado leite de desperdício verificou-se uma diferença de frequência de observação de multirresistências estatisticamente significativa ($p= 0,01$) entre explorações que administravam profilaticamente aminosidina e as que não tinham esta prática.

No entanto, não foi possível aferir estatisticamente qualquer tendência para o aparecimento de isolados resistentes quando era administrado leite com resíduos de antimicrobianos, independentemente de ser efetuada pré medicação ou não, e quando se verificavam as duas práticas em simultâneo

Relacionando o número de animais em lactação, em cada uma das explorações, com a presença de isolados multirresistentes constatou-se que o facto de existirem mais de 50 animais em ordenha estava associado à presença de multirresistências (entre 50 a 100 animais $p= 0,004$ e para explorações com mais de 100 animais $p= 0,005$). Tal não se verificou em explorações que possuíam menos de 50 animais.

7. Discussão

Discussão dos resultados

Com a realização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos, conseguiu-se obter uma imagem geral sobre a resistência aos antimicrobianos presentes em *E. coli* de vitelos de diferentes explorações do País (Anexo V).

O antimicrobiano que revelou maior percentagem de isolados resistentes foi a tetraciclina (78,9%) o que é similar à identificada num estudo recente em isolados de *E. coli* provenientes também de fezes de vitelos (Centeno, 2010).

Quanto às restantes percentagens calculadas, amoxicilina/ácido clavulânico - 31,1%, enrofloxacina - 33,1%, gentamicina - 17,2%, tetraciclina - 76,2%, sulfametoxazole/trimetoprim - 49,7%, ceftiofur - 57,6% denotou-se um aumento das resistências em relação ao obtido por Centeno em 2011. No entanto, no caso da enrofloxacina (35,6%) e trimetoprim/sulfametoxazole (64,4%) a percentagem de resistências encontradas foi inferior ao determinado neste estudo.

Comparando estes dados com os reportados por Portugal ao ESAC em 2012 (último relatório) as aminopenicilinas tinham 59,4% de resistências, num total de 2152 isolados de *E. coli* estudados, as fluoroquinolonas (enrofloxacina) 30,3%, os aminoglicosídeos (gentamicina) 16,3% e as cefalosporinas de 3ª geração (ceftiofur) 13,5%. Embora ligeiramente inferiores aos resultados obtidos neste trabalho, para os aminoglicosídeos (gentamicina) e fluoroquinolonas (enrofloxacina), estes assemelham-se ao relatado. Já no que concerne ao apresentado para as cefalosporinas de 3ª geração (ceftiofur) a percentagem de isolados resistentes apresentada neste estudo foi muito superior ao relatado por Portugal à ESAC.

Foram verificados valores muito superiores de resistências comparativamente aos declarados por oito Estados Membros no ano de 2007 à EFSA referentes à gentamicina (6%) e ao ceftiofur (1%),

Não sendo os restantes antimicrobianos abrangidos por esta monitorização, podemos recorrer ao relatório da ARBAO II relativo ao ano de 2003, onde a Itália e a Bélgica analisaram a suscetibilidade de *E. coli* comensal à amoxicilina/ácido clavulânico obtendo uma resistência de 11% e de 26,1%, respetivamente. Os valores apresentados neste trabalho foram superiores aos referidos.

Relativamente à tetraciclina, segundo a EFSA (2008), a percentagem de resistências a este antimicrobiano é bastante discrepante nos vários países, situando-se os valores obtidos neste trabalho entre os relatados pela Holanda (67,32%) e a França (90,67%), estando de acordo

com o verificado por Kaneene e colaboradores (2008) num estudo também efetuado com *E.coli* isolada de fezes de vitelo (> 77%). No entanto são muito superiores aos declarados à EFSA por oito Estados Membros no ano de 2007 (27%).

Quanto ao trimetoprim/sulfametoxazole, os valores declarados pela Itália, Bélgica e Holanda foram 28%, 60,9% e 9%, respetivamente (ARBAO, 2003), estando os valores obtidos neste estudo mais próximo dos valores reportados pela Bélgica.

Os dois antimicrobianos que apresentaram maior percentagem de isolados resistentes foram a tetraciclina e o ceftiofur (beta-lactâmico).

As tetraciclinas são usadas recorrentemente, e de forma muitas vezes excessiva, por possuírem um largo espectro de ação, poucos efeitos secundários e serem regra geral de baixo custo. Isto levou ao aparecimento de resistência devido a uma pressão seletiva muito elevada (Chopra & Roberts, 2001). Como consequência de uma utilização abusiva das tetraciclinas em animais, quer em modo profilático, quer terapêutico, observou-se a disseminação generalizada dos seus mecanismos de resistência, o que poderá justificar a elevada percentagem de isolados de *E. coli* resistentes à tetraciclina.

Selim e Cullor em 1997 verificaram, usando testes comerciais de deteção da presença de antimicrobianos, que 63% do leite de desperdício era positivo a beta-lactâmicos e à tetraciclina. Já Langford (2003) detetou uma concentração média de 5,6 µl/kg (de 0,8 a 50,4 µl/kg) de antimicrobianos beta-lactâmicos no leite de desperdício.

A exposição de bactérias a um antimicrobiano não implica que este tenha influência direta no aparecimento de resistências mas origina uma pressão seletiva muito forte que potencia o desenvolvimento de bactérias resistentes a diferentes antimicrobianos (Kaneene et al., 2008). Vários estudos já provaram que bactérias resistentes surgem, persistem e disseminam-se como consequência de uma pressão seletiva induzida pelo uso de antimicrobianos (Angulo et al., 2000; De Francesco et al., 2004).

As resistências bacterianas ao sulfametoxazole/ trimetoprim (terceiro antimicrobiano com uma maior percentagem de isolados resistentes - 49,7%) desenvolvem-se de modo lento e gradual mas quando surgem são persistentes e irreversíveis. Esta associação de quimioterápicos é muito utilizada, pelo seu largo espectro de ação, sendo frequentemente utilizada em animais de produção como método de profilaxia (Górniak, 2006). Poderá ser esta uma explicação para a percentagem elevada de resistência dos isolados de *E. coli* a este antimicrobiano.

O uso generalizado e, por vezes, indiscriminado de antimicrobianos levou à emergência, seleção e disseminação de bactérias resistentes, de tal modo que a resistência aos

antimicrobianos é, presentemente, uma das maiores ameaças para a Saúde Pública (Direção Geral de Saúde, 2010).

Sendo a *E. coli* comensal uma bactéria indicadora dos níveis de resistência a antimicrobianos na microbiota intestinal de diferentes espécies animais (van den Bogaard & Stobberingh, 2000), é importante monitorizá-la devido ao potencial risco de saúde pública que representa, pela possibilidade de haver transferência de resistências a bactérias patogénicas (Guardabassi et al., 2004).

Um melhor conhecimento do impacto de diferentes antimicrobianos, em diferentes nichos, constitui um passo importante no controlo da emergência e disseminação da resistência em geral (Costa, 2008).

Quase metade dos isolados obtidos neste estudo pode ser classificada como multirresistente uma vez que são resistentes a pelo menos três dos antimicrobianos utilizados. Esta grande percentagem vem, no entanto, de encontro com o obtido noutros estudos recentes envolvendo *E. coli* de diferentes proveniências (Centeno, 2011; Costa, 2011; Salazar 2011). Já no que concerne a isolados suscetíveis (sensíveis a todos os antimicrobianos) o número obtido neste trabalho é superior ao apresentado nos estudos acima referidos.

Vitelos jovens apresentam uma maior prevalência de *E. coli* comensal resistente do que indivíduos adultos. Segundo DeFrancesco (2004) e Sharma (2008), tal deve-se à elevada exposição a diferentes antimicrobianos administrados como meio profilático, metafilático ou como meio terapêutico, a uma maior transmissão fecal-oral e a um esforço elevado no *turnover* da microbiota bacteriana do trato gastrointestinal. DeFrancesco (2004) demonstrou esta diferença obtendo 17% de isolados resistentes a pelo menos um antimicrobiano em vacas adultas enquanto os vitelos apresentaram 72% de isolados resistentes a pelo menos um antimicrobiano, sendo que nos dez padrões de resistência mais comuns, nove eram padrões de multirresistência.

O aparecimento de bactérias multirresistentes, particularmente no caso da *E. coli* comensal, é preocupante para a Saúde Pública devido ao risco de disseminação de bactérias resistentes e genes de resistência.

Quanto aos padrões de resistência observados foi possível concluir que a resistência simples à tetraciclina foi o mais encontrado, não sendo possível estabelecer nenhuma similaridade com outros estudos (Centeno, 2011; Costa, 2011; Salazar 2011).

Tal como já foi referido, o uso abusivo das tetraciclinas em animais após a sua introdução no mercado, levou à disseminação dos seus mecanismos de resistência (Kaneene, 2008). Sendo este um antimicrobiano com largo espectro de ação, boas características de farmacocinética e farmacodinamia e poucos efeitos secundários (Chopra & Roberts, 2001) o aparecimento

generalizado de resistências a este agente representa menos uma importante opção de tratamento.

No que respeita à distribuição de suscetibilidades por exploração, não foi possível estabelecer nenhum padrão de distribuição com exceção de ser a tetraciclina o antimicrobiano com mais resistências num maior número de explorações. Uma vez que este antimicrobiano não é utilizado pela via intramamária, a sua elevada presença em leites de desperdício (Selim e Cullor em 1997) deve-se à sua excreção no leite após ser administrado pela via parenteral no tratamento de outras afeções. Estes resultados, em termos práticos, dão informações úteis que podem vir a ser tidos em conta aquando da escolha de antimicrobianos a utilizar em cada exploração.

Foi também possível, com este trabalho, concluir que nas explorações em que era administrado leite de desperdício contendo resíduos de antimicrobianos, o número de isolados resistentes eram muito superiores, existindo, nestes casos, isolados multirresistentes. Foi mesmo provada uma dependência entre estas variáveis. Nas explorações em que tal prática não era efetuada, embora estivessem presentes isolados resistentes, nenhum deles pôde ser considerado multirresistente.

Tal pode ser explicado pela pressão seletiva imposta pela administração de leite de desperdício, contendo concentrações desconhecidas de antimicrobianos, o que promove o aparecimento de bactérias resistentes por dois motivos. Primeiro, porque ao haver uma pressão seletiva, haverá uma disseminação preferencial das bactérias resistentes pela existência de uma vantagem competitiva sobre as bactérias suscetíveis e, segundo, porque a existência de uma pressão seletiva vai facilitar a disseminação de possíveis genes de resistência entre as bactérias (Call, Davis & Sawant, 2008).

No entanto, através dos resultados obtidos (elevada percentagem de resistências à tetraciclina, enrofloxacina e gentamicina), antimicrobianos que não são vulgarmente utilizados via intramamária, indica que a utilização destes nas explorações, e sua consequente presença nos leites de desperdício, se deve à sua trivial utilização noutras situações, não estando diretamente relacionada com mamites e o seu tratamento.

Este resultado revela-se preocupante uma vez que o leite de desperdício representa aproximadamente 1 a 4% da produção total das explorações (Duse, 2013) e é amplamente utilizado para alimentação de vitelos, como foi possível verificar como o questionário implementado. A utilização de leites de desperdício deve ser pensada de forma ponderada e consciente para cada exploração, pesando todos os benefícios e riscos da sua utilização.

No caso de explorações que não efetuavam a prática acima descrita, mas procediam por sistema à utilização de pré-medicação, foi demonstrada uma expressiva diferença entre a

utilização de toltrazuril (coccidiostático) e aminosidina (antimicrobiano). Nos casos em que era administrado este antimicrobiano de forma profilática, foi possível estabelecer uma relação entre esta prática e o aparecimento de isolados multirresistentes.

Contudo, não foi verificado um efeito cumulativo quando associada, a administração de leite de desperdício contendo resíduos de antimicrobianos, com a pré-medicação com aminosidina. A exposição dos animais a baixas doses de antimicrobianos, por longos períodos de tempo, (como é o caso da utilização da aminosidina de forma profilática) pode selecionar resistência aos antimicrobianos (McEwen, 2001) devendo, por isso, a necessidade do uso de antimicrobianos de forma profilática ser sempre considerada com prudência e preservada para circunstâncias específicas.

Verificou-se, também, uma relação entre o número de animais em lactação (dimensão do efetivo) e o aparecimento de isolados multirresistentes. Explorações com mais de 50 animais em lactação revelaram possuir um maior risco de terem isolados de *E. coli* multirresistentes. Com o aumento do número de explorações de grandes dimensões, esta é uma problemática que deve ser tida em conta, pois nas mesmas condições o aumento da carga animal na exploração está diretamente relacionada com o aumento da pressão microbiana existente na mesma (Uhde, 2008).

Sendo o manejo de uma exploração um fator chave na produção leiteira foi possível, através do questionário implementado, caracterizar alguns dos pontos mais relevantes para a concretização deste trabalho.

Quanto à constituição do leite de desperdício da exploração e a sua administração aos vitelos, foi possível perceber que na maioria das situações todos os leites não destinados a consumo humano são, de alguma forma, aproveitados para alimentação dos vitelos. Tais práticas foram também verificadas por Brunton (2012) e Duse (2013). No entanto, na Suécia (Duse, 2013), foi demonstrado, na grande maioria das explorações, um especial cuidado em alimentar apenas os machos com leites de desperdício contendo resíduos de antimicrobianos o que não foi verificado neste estudo. O facto de este ser um recurso disponível e a sua utilização evitar mais custos para a exploração justifica, na ótica do produtor, tais práticas. No entanto, os riscos da sua administração devem ser conhecidos pelo produtor e a sua utilização adaptada de forma a minimizar o impacto na exploração.

Observando a medicação normalmente utilizada para o tratamento de diarreias foi possível constatar que, de forma sistemática, 32 das explorações recorrem à administração de antimicrobianos sistémicos/ orais para o seu tratamento o que, e particularmente no caso da administração parenteral, apenas deveria ser usado em casos suspeitos de bacteriémia ou quando se verificasse lesão intestinal com invasão microbiana (Stilwell, 2013). Em certos

casos, a administração destes fármacos poderá estar a ser feita de forma desnecessária ou inadequada, uma vez que a síndrome diarreia tem uma natureza multifatorial e vários agentes podem estar implicados, às vezes em simultâneo, no mesmo animal/surto não necessitando sempre de uma terapêutica antimicrobiana (Martins, 2011).

No último ponto abordado no questionário, foram identificados os antimicrobianos (bisnagas intramamárias) normalmente utilizadas para o tratamento de mastites nas diferentes explorações. Destacam-se o Mamyzin® (estreptomicina+penetamato), utilizado com regularidade em 62,2% das explorações, o Pathozone® (cefoperazona) em 54% e o Ubrolexin® (cefalexina+canamicina) em 37,8% das explorações.

Estas percentagens são bastante superiores às obtidas por Bruton (2012) para antimicrobianos intramamários de primeira escolha no tratamento de mastites (estreptomicina+penetamato-2%; cefoperazona 0,4%; cefalexina+canamicina 6,5%). O uso aleatório, indiscriminado e sem aconselhamento veterinário, de bisnagas intramamárias, deve ser evitado e sempre que possível apenas utilizado após realização de TSA de forma a seleccionar o antimicrobiano mais adequado a cada caso.

Limitações do estudo e sugestões para futuras investigações

Este estudo apresenta como principais limitações o facto de que, embora a amostra em estudo seja razoável, uma amostra maior daria sempre mais consistência à interpretação dos dados e poderia, eventualmente, ter proporcionado a evidência de outras associações estatísticas. A realização do questionário nas explorações pode levar a que o produtor responda o que sabe ser a hipótese “ideal” e não aquela que realmente pratica habitualmente o que pode deturpar de alguma forma os resultados.

A nível laboratorial revelou-se impossível recolher os mesmos cinco isolados de *E. coli* por amostra o que fez com que algumas explorações adquiram um peso estatístico superior.

No futuro seria importante dar continuidade ao estudo, nomeadamente:

- Estudar quais as implicações futuras destes resultados nas explorações e até mesmo na Saúde Pública, se o padrão de resistências encontradas se manteria ao longo do tempo nos animais em estudo e se seria coincidente com o encontrado em animais de outras fases produtivas da exploração;
- Avaliar outros riscos da utilização de leites de desperdício, como a transmissão de agentes infecciosos;
- Aprofundar o estudo no sentido de encontrar soluções acessíveis para a utilização deste recurso na alimentação de vitelos de forma mais segura.

8. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que, numa grande maioria das explorações, o leite de desperdício é utilizado na alimentação de vitelos. O estudo das implicações da sua utilização e possíveis soluções para tornar o seu uso menos arriscado são pontos pertinentes a estudar e que acrescentam uma mais valia para a produção.

Neste estudo foi possível observar uma grande percentagem de isolados que possuíam resistências aos antimicrobianos em estudo, sendo a tetraciclina o que apresentava o maior número de isolados resistentes e a gentamicina o menor.

No caso da enrofloxacina, gentamicina e amoxicilina/ácido clavulânico a percentagem de isolados sensíveis foi superior à das resistências encontradas. Já no caso da tetraciclina e do ceftiofur o padrão inverte-se apresentando estes uma maior percentagem de isolados resistentes do que de sensíveis. No respeitante ao sulfametoxazole/ trimetoprim a percentagem de isolados sensíveis e resistentes encontrada foi a mesma.

Foram registados neste trabalho 49% de isolados classificados como multirresistentes uma vez que apresentavam resistência a três ou mais dos antimicrobianos em estudo.

Foram também estabelecidos os padrões de resistência dos isolados obtidos tendo sido a resistência simples à tetraciclina o mais verificado.

Foi possível concluir que a administração de leite de desperdício contendo resíduos de antimicrobianos contribuiu para o aumento das resistências da *E. coli* de fezes de vitelos, em particular de isolados multirresistentes. Também a administração de aminosidina de forma preventiva estava associada à presença de isolados multirresistentes. Não se verificou, no entanto, um efeito cumulativo entre a administração de leite de desperdício e aminosidina.

Concluiu-se que a administração de leite de desperdício contendo resíduos de antimicrobianos assim como a utilização de aminosidina de forma profilática está relacionada com o aparecimento de isolados multirresistentes.

Também quando o número de animais em lactação é superior a 50 foi demonstrado uma maior probabilidade de a *E. coli* comensal possuir multirresistências.

Importa, então, pensar em soluções para a utilização destes leites, um recurso disponível em todas as explorações, de forma a minimizar os riscos da sua utilização.

9. Bibliografia

- Acar, J. & Rostel, B. (2003). *Antimicrobial resistance: an overview*. World Organisation for Animal Health, OIE International Standards on Antimicrobial Resistance. (pp. 45- 68). Paris: OIE.
- Acres, S. D., J. R. Saunders and O. M. Radostits (1977). Acute undifferentiated neonatal diarrhea of beef calves: the prevalence of enterotoxigenic *E. coli*, reo-like (rota) vírus and other enteropathogens in cow-calf herds. *Canadian Veterinary Journal* 18(5), 113-121.
- Acres, S. D. (1985). Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. *Journal of Dairy Science* 68(1), 229-256.
- Adams M.R. & Moss M.O. (2000). *Bacterial agents of foodborne diseases*. In M.R. Adams & M.O. Moss, *Food Microbiology*. (2nd ed.). (pp. 217). UK: Royal Society of Chemistry.
- Alessiani, A., Di Giannatale, E., Perilli, M., Forcella, C., Amicosante, G. & Zilli, K. (2009). Preliminary investigations into fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* strains resistant to nalidixic acid isolated from animal faeces. *Veterinaria Italiana*, 45(4), 521-527.
- al-Majali, A. M., J. P. Robinson, E. K. Asem, C. Lamar, M. J. Freeman and A. M. Saeed (1999). Age-dependent variation in the density and affinity of *Escherichia coli* heatstable enterotoxin receptors in mice. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 473, 137-145.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quiñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 215-237.
- Angulo, F., Johnson, K., Tauxe, R. & Cohen, M. (2000). Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications of the use of fluoroquinolones in food animals. *Microbiology Drug Resistance* Vol. 6, 77-83
- Anónimo, (2003). *Antibiotic resistance in bacteria of animal origin – II [ARBAO II. Collection of routine susceptibility data*. Acedido em 20 de Junho, 2014. Disponível em: www.dfvf.dk.
- Argenzio, R. A. (1985). Pathophysiology of neonatal calf diarrhea. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 1(3), 461-469.
- Aust V, Knappstein K, Kunz HJ, Kaspar H, Wallmann J, Kaske M. (2012). Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. *Jornal of Animal Physiology*, 34, 111-113.
- Ball, P. (2000). Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(SupplT1), 17-24.
- Barbosa, T. M., and S. B. Levy. (2000). The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates*. 3, 303-311.

- Barto, P. B., Bush, L. J. e Adams, G. D. (1982). Feeding milk containing staphylococcus aureus to calves. *Journal of Dairy Science* 65, 271-274.
- Berchtold, J. (2009). Treatment of calf diarrhea: intravenous fluid therapy. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 25(1), 73-99.
- Berge, A.C., Moore, D.A. & Sisco, W.M. (2006). *Field trial evaluating the influence of prophylactic and therapeutic antimicrobial administration on antimicrobial resistance of fecal Escherichia coli in dairy calves*. Applied and Environmental Microbiology. Vol.72, 3872-3878.
- Bhattacharya, J. and M. K. Chakrabarti (1999). Binding of Escherichia coli heat-stable toxin and rise of guanylyl cyclase activity in the brush-border membranes of rabbit intestinal epithelial cells. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* 17(1), 28-33.
- Bingen, E., Picard, B., Brahimi, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J., & Denamur, E., (1998). Phylogenetic analysis of Escherichia coli strains causing neonatal meningites suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *The Journal of Infectious Diseases*, 177(3), 642-650.
- Bogaard, A.E. & Stobberingh, E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal Antimicrobial Agents*. Vol. 14, 327-335.
- Bower, J. M., Eto, D. S., & Mulvey, M. A. (2005). Covert operations of uropathogenic Escherichia coli within the urinary tract. *Traffic*, 6(1), 18-31.
- Boyd, E. F., & Hartl, D. L. (1998). Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of Escherichia coli have a phylogenetically clustered distribution. *Journal of Bacteriology*, 180(5), 1159-1165.
- Brito, B. G., Vidotto, M. C., Berbel, M. M., & Tagliari, K. C. (2004). Fatores de virulência presentes em amostras de Escherichia coli uropatogênicas – UPEC para suínos. *Ciência Rural*, 34(2), 645-652.
- Brunton, L. A., Duncan, D., Coldham, N. G., Snow, L. C., Jones, J. R. (2012). A survey of antimicrobial usage on dairy farms and waste milk feeding practices in England and Wales. *Veterinary Record*, doi: 10.1136/vr.100924.
- Call, D.R., Davis, M.A. & Sawant, A.A. (2008). Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production. *Animal Health Research Reviews*. Vol. 9, 159-167.
- Cantón, R. & Morosini, M.-I. (2011). Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 977-991.
- Centeno, M. M. (2010). *Influência do Uso de Fluoroquinolonas no Aparecimento de Escherichia coli E Salmonella spp. multirresistentes em vitelos*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.

- Chen, M., Tofighi, R., Bao, W., Aspevall, O., Jahnukainen, T., Gustafsson, L. E., Celsi, G. (2006). Carbon monoxide prevents apoptosis induced by uropathogenic *Escherichia coli* toxins. *Pediatric Nephrology*, 21(3), 382-389.
- Chopra, I. & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Micro Molecular Biology. Review*. Vol. 65, 232-260.
- Clarke, R.C., S.A. McEwen, V.P. Gannon, H. Lior, and C.L. Gyles. (1989). Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* from milk filters in South-Western Ontario. *Epidemiology Infection* 102, 253-260.
- CLSI (2008). *Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals*. Approved Standard: Third Edition M31-A3. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Codex Alimentarius Commission/Recommended Code of Practice 61 (2005). *Code of practice to minimize and contain antimicrobial resistance*. Acedido a 4 de Maio, 2014. Disponível em <http://www.codexalimentarius.net>.
- Coe, P.H. & Grooms, D. (2002). Metaphylaxis. *Cattle call*, 7(3), 2-7.
- Cohen, M. L. (1997). *Epidemiological factors influencing the emergence of antimicrobial resistance*. Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread (pp.233-237) Eds. John Wiley e Sons.
- Costa, D., Poeta, P., Saénz, Y., Coela, A. C., Matos, M., Vinué, L., Rodrigues, J., Torres, C. (2008). Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Veterinary Microbiology*, 127, 97-105.
- Cowan, S.T. (1974). *Gram Negative Facultatively Anaerobic Rods*. In R.E. Buchanan & N.E. Gibbons Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th ed.)(pp. 290-384). Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
- Crouch, C. F., S. Oliver and M. J. Francis (2001). Serological, colostral and milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus, coronavirus and *Escherichia coli* F5 (K99). *Veterinary Record* 149(4), 105-108.
- Dann, H. (2014). *Ultraviolet light treatment of waste milk evaluated*. *Dairy Herd Management*. Acedido em 15 de Março, 2014. Disponível em: <http://www.dairyherd.com/Ultraviolet-light-treatment-of-waste-milk-evaluated-258530061.html>.
- Davis, C. L., and J. K. Drackley (1998). The Development, Nutrition, and Management of the Young Calf. *Iowa State University Press*.
- de la Fuente, R., M. Luzon, J. A. Ruiz-Santa-Quiteria, A. Garcia, D. Cid, J. A. Orden, S. Garcia, R. Sanz and M. Gomez-Bautista (1999). Cryptosporidium and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Veterinary Parasitology* 80(3), 179-185.

- De Francesco, K.A., Cobbold, R.N., Rice, D.H., Besser, T.E. & Hancock, D.D. (2004). Antimicrobial resistance of commensal *Escherichia coli* from dairy cattle associated with recent multi-resistant salmonellosis outbreaks. *Veterinary Microbiology*. Vol. 98, 55-61.
- Degener, J. E. (1999). The consequences of bacterial resistance to antibiotics. *Geneesmiddelen Bulletin*, No 6.
- Direcção Geral de Veterinária (2010). *Lista de Quinolonas e Enrofloxacinas aprovadas para Bovinos*, Dr^a Maria Helena Silveiras Teodoro Ponte, Divisão de Gestão e Autorização de Medicamentos e Produtos Veterinários; Direcção de Serviços de Medicamentos e Produtos de Uso Veterinário. Lisboa.
- Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J. Denamur, E. (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*, 147(6), 1671-1676.
- Duse, A., Waller, K., Emanuelson, U., Unnerstad, H., Persson, Y. (2013). Farming practices in Sweden related to feeding milk and colostrum from cows treated with antimicrobials to dairy calves. *Acta Veterinaria Scandinavica* 55, 49.
- ECL (2014). *Reference Laboratory for Escherichia coli - Pathogenic E. coli*. Acedido em 24 de Março, 2014, disponível em: <http://www.ecllab.com/en/ecoli/index.asp>
- Elizondo-Salazar, J. A. e Heinrichs, A. J. (2007). *Pasteurization of Non-saleable Milk*. Department of Dairy and Animal Science, The Pennsylvania State University.
- European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC] (2012). *Antimicrobial resistance interactive database*. Acedido em 24 de Março, 2014, disponível em: http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/map_reports.aspx.
- Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A. B., Bui, H., Le Bouguéneq, C., & Denamur, E. (2004). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, 21(6), 1085-1094.
- European Food Safety Authority [EFSA] (2010). *The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007*. EFSA Journal 2010; 8(4),1309.
- European Food Safety Authority [EFSA] (2011). *Scientific report*. EFSA Journal 2011; 9(10), 2390.
- European Medicine Agency (2009). Reflection paper on the use of third and fourth generation cephalosporins in food producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Vol. 32, 515-33.
- European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network [ESAC-Net] (2012). *Antimicrobial resistance interactive database*. Acedido em 24 de Março, 2014, disponível em:

http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/map_reports.aspx.

- Evelyn, A., Dean-nystrom, Brad, T., Bosworth, William C., Cray J.R., Harley, W. Moon (1997). Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the Intestines of Neonatal Calves. *American Society for Microbiology*. 65, 1842–1848.
- Fàbrega, A., Sánchez-Céspedes, J., Soto, S. & Vila, J. (2008). Quinolone resistance in the food chain. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 31, 307-315.
- Farber, J.M., G.W. Sanders, and S.A. Malcolm. (1988). The presence of *Listeria* spp. in raw milk in Ontario. *Journal of Microbiology*. 34, 95-100.
- Foley, J. A, Otterby, D. E. (1978). Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum: a review. *Journal of Dairy Science* 61, 1033-1060.
- Fuchs, L. Y., L. Chihu, C. Conde, V. M. González, A. H. Noguez, E. Calderón, N. Avonce, and C. Ovando (1994). Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. Instituto Nacional de Salud Pública Cuernavaca, México. *Salud Pública de México*. 36, 428-438.
- Giannella, R. A. and E. A. Mann (2003). *E. coli* heat-stable enterotoxin and guanylyl cyclase C: new functions and unsuspected actions. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 114, 67-85; discussion 85-66.
- Giles, N., S.A. Hopper, and C. Wray (1989). Persistence of *S. typhimurium* in a large dairy herd. *Epidemiology Infection* 103, 235-241.
- Godden, S. M. R., Smith, S., Feirtag, J. M., Green, L. R., Wells, S. J. & Fetrow, J. P. (2003). Effect of on-farm commercial batch pasteurization of colostrum on colostrum and serum immunoglobulin concentrations in dairy calves. *Journal of Dairy Science* 86, 1503–1512.
- Górniak, S.L. (2006). *Quimioterápicos*. H. S. Spinosa, S. L. Górniak & M. M. Bernardi, Farmacologia aplicada à medicina veterinária (4ª ed.). (pp. 453-464). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan
- Grant, I.R., H.J. Ball, and M.T. Rowe. (1996). Thermal inactivation of several *Mycobacterium* spp. in milk by pasteurization. *Appl. Microbiology*. 22, 253-256.
- Guardabassi, L., Schwarz, S. & Lloyd, D. H. (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 321–332.
- Hagnestam, C., Emanuelson, U. e Berglund, B. (2007). Yield Losses Associated with Clinical Mastitis Occurring in Different Weeks of Lactation. *Journal of Dairy Science* 90, 2260–2270.
- Hancock, L. E. (2005). Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *The Lancet Infectious Diseases*. 5, 209-218.
- Hawkey, P. M. (2008). Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *British Journal of Pharmacology*, 153, 406-413.

- Hawkey, P.M. & Jones, A.M. (2009). The changing epidemiology of resistance. *J. Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 64, 3-10.
- Hirsh, D. C., & Zee, Y. C. (2003). *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Hirsh, D. C., N. J. MacLachlan and R. L. Walker (2004). *Family Enterobacteriaceae*. In D. C. Hirsh, *Veterinary Microbiology*. (2ed). (pp. 57-60) Ames, Iowa: Blackwell Publishing.
- Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 80-128.
- Johnson, J. R., & Stell, A. L. (2000). Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 261-272.
- Johnson, J. R., Delavari, P., Kuskowski, M., & Stell, A. L. (2001). Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in Escherichia coli. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(1), 78-88.
- Jonas, D., Schultheis, B., Klas, C., Krammer, P. H., & Bhakdi, S. (1993). Cytocidal effects of Escherichia coli hemolysin on human T lymphocytes. *Infection and Immunity*, 61(5), 1715-1721.
- Jones, G.M., Bailey, Jr T.L. (2009). *Understanding the Basics of Mastitis*. Publication 404-233 Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Jorgensen, M., Hoffman, P., Nytes, Y. (2005). *Efficacy of on-farm pasteurized waste milk systems on upper midwest dairy and custom calf rearing operations*. 4-State Dairy Management Seminar.
- Kaneene, J.B., Warnick, L.D., Bolin, C.A., Erskine, R.J., May, K. & Miller, R. (2008). Changes in tetracycline susceptibility of enteric bacteria following switching to nonmedicated milk replacer for dairy calves. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 46, 1968-1977.
- Kapil, A. (2005). The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate. *Indian Journal of Medical Research*. 121, 83-91.
- Kesler, E. M. (1981). Feeding Mastitic Milk to Calves: Review. *Journal of Dairy Science* 64, 719-723.
- Khachatryan, A. R.; Hancock, D. D.; Besser, T. E.; Call, D. R. (2004). Role of calf-adapted Escherichia coli in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 254- 262.
- Krause, W. J., G. L. Cullingford, R. H. Freeman, S. L. Eber, K. C. Richardson, K. F. Fok, M. G. Currie and L. R. Forte (1994). Distribution of heat-stable enterotoxin/guanylin receptors in the intestinal tract of man and other mammals. *Journal of Anatomy* 184, 407-417.

- Langford, F. M., Weary, D. M., e Fisher, L. (2003). Antibiotic resistance in gut bacteria from dairy calves: A dose response to the level of antibiotics fed in milk. *Journal of Dairy Science* 86, 2990–3966.
- Laxminarayan, R. (2003). *Introduction: on the Economics of Resistance*. Laxminarayan (Ed.), *Battling resistance to antibiotics and pesticides: an economic approach*. (pp. 1- 17). Washington: Resources for the Future.
- Leadley, S. (2014). *Dry matter composition of waste milk*. *Dairy Herd Management*. Acedido em 15 de Março, 2014. Disponível em: <http://www.dairyherd.com/dairy-news/Calves-with-Sam-Dry-matter-composition-of-waste-milk-247243821.html>.
- Levy, S. B. (1998). The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American*. 278, 32-39
- Lorenz, I., Earley, B., Gilmore, J., Hogan, I., Kennedy, E. & More, S.J. (2011). Calf health from birth to weaning. III. Housing and management of calf pneumonia. *Irish Veterinary Journal*, 64(14), 1-9.
- Lovett, J., D.W. Francis, and J.M. Hunt (1983). Isolation of *Campylobacter jejuni* from raw milk. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 459-462.
- Lucas, M. L. (2001). A reconsideration of the evidence for *Escherichia coli* STa (heat stable) enterotoxin-driven fluid secretion: a new view of STa action and a new paradigm for fluid absorption. *Journal of Applied Microbiology* 90(1), 7-26.
- Manning, S.D. (2005). *Deadly Diseases and Epidemics, Escherichia coli infections*. Philadelphia: Chelsea House Publishers.
- Martins, D. R. F. (2011). Investigação nosológica de diarreias neonatais indiferenciadas em vitelos no concelho de Odemira. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- McEwen, S.A., W. Martin, R.C. Clarke, and S.E. Tamblin. (1988). A prevalence survey of *Salmonella* in raw milk in Ontario, 1986-87. *J. Food Prot.* 51, 963-965.
- McEwen, S.A. & Fedorka-Cray, P.J. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical Infectious Diseases*, 34,S93–S106.
- Moon, C.S., Berke, O., Avery, B.P., McEwen, S.A., Reid-Smith, R.J., Scott, L. & Menzies, P. (2011). Rates and determinants of antimicrobial use, including extra-label, on Ontario sheep farms. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75(1), 1-10.
- Moore, D. A., Taylor, J., Hartman, M. L., e Sisco, W. M. (2009). Quality assessments of waste milk at a calf ranch. *Journal of Dairy Science* 92, 3503–3509.
- Moriel, D. G., Rosini, R., Seib, K. L., Serino, L., Pizza, M., & Rappuoli, R. (2012). *Escherichia coli*: great diversity around a common core. *mBio*, 3(3), 12-18.
- Myers, L. L. and P. A. Guinee (1976). Occurrence and characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea. *Infection and Immunity* 13(4), 1117-1119.

- Naylor J.M. (2002). *Neonatal Ruminant Diarrhea*. Large Animal Internal Medicine; (3^o edition,) (pp. 352-366). Ed. Mosby, USA.
- Nataro, J. P. and J. B. Kaper (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11(1), 142-201.
- Oliveira, DS e Timm, CD (2007). Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 102, 561-562.
- Peijian, H. and C. C. Yun (2010). Mechanisms of the Regulation of the Intestinal Na⁺/H Exchanger NHE3. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 10-15.
- Peterson, J. W. (1996). *Bacterial pathogenesis*. S. Baron, Medical microbiology. Galveston, Estados Unidos da América: University of Texas Medical Branch.
- Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R. & Waddell, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1), 28–52.
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E. Denamur, E.(1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity*, 67(2), 546-553.
- Poeta, P. e J. Rodrigues (2008). *Identificação de bactérias com interesse em microbiologia médica*. Parte 1 *Escherichia coli*. Série Didáctica – Ciências Aplicadas 355.
- Qadri, F., A. M. Svennerholm, A. S. Faruque and R. B. Sack (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clinical Microbiology Reviews* 18(3), 465-483.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. & Carter, J.E. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby Wolf.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. & Leonard, F.C. (2002). *Enterobacteriaceae*. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. (pp. 106-123). Iowa: Blackwell Publishing.
- Quinn, P.J. & Markey, B.K. (2003). *Concise Review of Veterinary Microbiology*. Oxford: Blackwell Science.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J., & Leonard, F. C. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. West Sussex (2^a ed.). Reino Unido: Willey-Blackwell.
- Raboisson D, Clément J, Queney N, Lebreton P, Schelcher F. (2010). Detection of Bacteriuria and Bacteremia in Newborn Calves by a Catalase-Based Urine Test, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24, 1532–1536.
- Radostits, O. M., C. C. Gay, K. W. Hinchcliff and P. D. Constable (2007). *Diseases associated with bacteria - III: Diseases associated with *Escherichia coli* – Acute undifferentiated diarrhea of newborn farm animals (particularly calves and piglets)*.

- Elsevier, *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. (10th ed). (pp. 847-851): Saunders.
- Raetz, C. R. H., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635-700.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Moore, P. K. (2004). *Farmacologia*. (4ª edição) Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier Editora Ltd.
- Ratledge, C., & Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54, 881-941.
- Regulamento n° 1069/2009. *Regulation of the European parliament and of the council laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing regulation (EC) no 1774/2002 (Animal By-Products regulation)*. Official journal of the EU.
- Rodrigues, J., Thomazini, C. M., Lopes, C. A. & Dantas, L. O. (2004). Concurrent Infection in a Dog and Colonization in a Child with a Human Enteropathogenic *Escherichia coli* Clone. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 1388-1389.
- Russo, T. A., Davidson, B. A., Genagon, S. A., Warholic, N. M., MacDonald, U., Pawlicki, P. D., Knight, P. R. (2005). E. coli virulence factor hemolysin induces neutrophil apoptosis and necrosis/lysis in vitro and necrosis/lysis and lung injury in a rat pneumonia model. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(2), L207-L216.
- Salazar, A. S. (2011). *Estudo da resistência às cefalosporinas de terceira geração de isolados de escherichia coli de origem canina*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Sato, K., Bartlett, P.C. & Saeed, M.A. (2005). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from dairy farms using organic versus conventional production methods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* Vol. 226, 589-594.
- Schaeren, W., (2006). *Fakten zur Verfü tterung von antibiotikahaltiger Milch na Ka lber*. ALP Forum.
- Schaffer, L. V.; McGuffey, R. K., (1980). *Effects of feeding fermented mastitic milk to calves*. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings.
- Schmoltdt, P. (1991). *Kalber- und Jungrinderaufzucht. Veterina`rmedizinische Aufgaben und Erfahrungen*. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E., & Heesemann, J. (1998). Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infection and Immunity*, 66(2), 480-485.
- Selim, S. A., and J. S. Cullor. (1997). Number of viable bacteria and presumptive antibiotic residues in milk fed to calves on commercial dairies. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 211:1035.

- Sellers, Z. M., D. Childs, J. Y. Chow, A. J. Smith, D. L. Hogan, J. I. Isenberg, H. Dong, K. E. Barrett and V. S. Pratha (2005). Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* stimulates a non-CFTR-mediated duodenal bicarbonate secretory pathway. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 288(4), G654-663.
- Shandhu, K. S., Gyles, C. L. (2002). Pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the intestine of calves. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 66, 65-72.
- Sherwood, D., D. R. Snodgrass and G. H. Lawson (1983). Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves in Scotland and northern England. *Veterinary Record* 113(10), 208-212.
- Siqueira, A. K., Ribeiro, M. G., Leite, D. S., Tiba, M. R., Moura, C., Lopes, M. D., Silva, A. V. (2009). Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Research in Veterinary Science*, 86(2), 206-210.
- Smith, Y. C., Grande, K. K., Rasmussen, S. B., & O'Brien, A. D. (2006). Novel three-dimensional organoid model for evaluation of the interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with terminally differentiated human urothelial cells. *Infection and Immunity*, 74(1), 750-757.
- Smith, Y. C., Rasmussen, S. B., Grande, K. K., Conran, R. M., O'Brien, A. D. (2008). Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation in mice. *Infection and Immunity*, 74(7), 2978-2990.
- Sousa, J. C. (2006). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. 2ª Edição. Edições Universidade Fernando Pessoa.
- Sousa, J. C. F. e L. V. Peixe. (2010). *Antibióticos Antibacterianos*. Ferreira, W. F. C., J. C. F. Sousa, e N. Lima. 2010. Microbiologia. LIDEL – Edições Técnicas, Lda. pp. 453-469.
- Stabel, J. R.; Hurd, S.; Calvente, L.; Rosenbusch, R. F., (2004). Destruction of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Salmonella* spp. and *Mycoplasma* spp. in raw milk by a commercial on-farm high-temperature, short-time pasteurizer. *Journal of Dairy Science* 88, 170-174
- Statistisches Bundesamt, (2008). *Milcherzeugung und – verwendung*, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, Germany.
- Steele, M.L., W.B. McNab, C. Poppe, M.W. Griffiths, S. Chen, S. A. Degrandis, L.C. Fruhner, C.A. Larkin, J.A. Lynch, and J.A. Odumeru. (1997). Survey of Ontario bulk tank raw milk for food-borne pathogens. *J. Food Protection*. 60(11), 1341-1346.
- Stilwell, G. (2013). *Clínica de bovinos*. (pp. 52-55). Lisboa: Ciência e vida, Lda.
- Streeter, R.N., G.F. Hoffsis, S. Bech-Nielsen, W.P. Shulaw, and D.M. Rings. (1995). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Journal Veterinary Research*. 56, 1322-1324.

- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*. 119, S3-S10.
- Todar, K. (2002). *Pathogenic E. coli. Bacterial Diseases of Humans*. Todar's Online Textbook of bacteriology. Acedido em 8 de Junho, 2014, disponível em: <http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html>.
- Todar, K. (2008). *Pathogenic E. coli*. Acedido em 8 de Junho, 2014, disponível em: http://textbookofbacteriology.net/e.coli_1.html.
- Torres, A. G., Redford, P., Welch, R. A., & Payne, S. M. (2001). TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infection and Immunity*, 69(10), 6179-6185.
- Tramuta, C., Nucera, D., Robino, P., Salvarani, S., & Nebbia, P. (2011). Virulence factors and genetic variability of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Italy. *Journal of Veterinary Science*, 12(1), 49-55.
- Uhde, F. L., T. Kaufmann, H. Sager, S. Albin, R. Zanoni, E. Schelling and M. Meylan (2008). Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland. *Veterinary Record* 163(12), 362-366.
- Valdebenito, M., Crumbliss, A. L., Winkelmann, G., & Hantke, K. (2006). Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(8), 513-520.
- van den Bogaard, A.E. & Stobberingh, E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 14, 327-335.
- Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. (1993). The Threat of Multiresistant Microorganisms. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 12, 27-30.
- Verdi, R. e Barbano, D. (1991). Properties of proteases from milk somatic cells and blood leukocytes. *Journal of Dairy Science* 74, 2077-2081.
- von Baum, H. & Marre, R. (2005). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *International Journal of Medical Microbiology*, 295, 503-511.
- Walz, P. H.; Mullaney, T. P.; Render, J. A.; Walker, R. D.; Mosser, T.; Baker, J. C., (1997). Otitis media in preweaned Holstein dairy calves in Michigan due to *Mycoplasma bovis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 45, 42-43.
- Watson, E., Jeckel, S., Snow, L., Stubbs, R., Teale, C., Wearing, H., Horton, R., Toszeghy, M., Tearne, O., Ellis-iversen, J. & Coldham, N. (2012). Epidemiology of extended spectrum beta-lactamase *E. coli* (CTX-M-15) on a commercial dairy farm. *Veterinary Microbiology*, 76, 339-346.
- Weiglmeier, P. R., P. Rösch and H. Berkner (2010). Cure and Curse: *E. coli* Heat-Stable Enterotoxin and Its Receptor Guanylyl Cyclase C. *Toxins* 2(9), 2213-2229.

- WHO (2011). *World Health Day 2011 – Antibiotic resistance: No action today, no cure tomorrow*. Acedido em Abril 7, 2014, disponível em: <http://www.euro.who.int/en/who-we-are/whd/world-health-day-2011/antibioticresistance-no-action-today,-no-cure-tomorrow>.
- Wieler, L. H., G. Sobjinski, T. Schlapp, K. Failing, R. Weiss, C. Menge and G. Baljer (2007). Longitudinal prevalence study of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 120(7-8), 296-306.
- Witte, W. (1997). *Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance bacterial pathogens*. Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread. John Wiley e Sons, England.
- Wray, C., S. Furniss, and C. L. Benham. (1990). Feeding antibioticcontaminated waste milk to calves: Effects on physical performance and antibiotic sensitivity of gut flora. *Veterinary Journal* 146, 80–87.

ANEXOS

Anexo I. Questionário implementado em cada exploração em estudo

Questionário

Exploração:

Local:

Data:

Este questionário insere-se num trabalho de investigação a decorrer no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Lisboa que tem por objetivo avaliar a transmissão de agentes infecciosos através do leite dado aos vitelos e sua implicação no aumento de resistências aos antibióticos.

- 1) Nº de animais em lactação hoje: _____

- 2) A maternidade que possui na sua exploração é:
 - Individual
 - Grupo

- 3) Quantos animais adultos costumam estar na maternidade? _____

- 4) Quanto tempo os vitelos ficam com as mães após o parto?
 - Menos de 1 hora
 - 1 a 4 horas
 - 4 a 9 horas
 - 9 a 12 horas
 - 12 a 24 horas
 - Mais de 24 horas

- 5) Qual o destino dado aos seus vitelos?
 - 5.1) Machos: Recria Venda
 - 5.2) Fêmeas: Recria Venda

- 6) Dá leite mamático aos vitelos?
 - A nenhum
 - A todos
 - Só aos machos
 - Só às fêmeas
 - A partir de certa idade Qual? _____
 - 6.1) Se sim, provem de:
 - Leite em intervalo de segurança do antibiotico de secagem
 - Leite durante o tratamento de mamites clinicas
 - Leite após o tratamento de mamites clinicas mas durante o intervalo de segurança
 - Leite de vacas com descargas celulares elevadas, mas sem estarem em tratamento
 - Outro: _____

 - 6.2) Se sim, efetua algum tratamento ao leite mamático? Sim Não

- 6.3) Se sim, qual?
- Pasteurização
 - Acidificação
 - Outro: _____
- 7) Medica preventivamente os vitelos? Sim Não
- 7.1) Se sim, com:
- Gabbrocol
 - Outro: _____
- 8) O colostro que administra é:
- Mistura de várias vacas
 - Só da própria mãe
 - Outro: _____
- 9) Como administra o colostro?
- Tetina
 - Entubação
 - Balde
 - Outro: _____
- 10) Quando começa a administração do colostro?
- Primeiras 4h após o nascimento
 - Entre 4 e 6h após o nascimento
 - Entre 6 e as 9h após o nascimento
 - Entre 9 e as 12h após o nascimento
 - Mais de 12h após o nascimento
- 11) Que quantidade de colostro administra na primeira refeição?
- Menos de 2 L
 - 2 a 3 L
 - 3 a 4 L
 - Mais de 4 L
- 12) Quantas vezes administra colostro no 1º dia?
- Uma
 - Duas
 - Mais de duas
- 13) Durante quanto tempo administra colostro?
- 1 dia
 - 1 a 3 dias
 - Mais de 3 dias
- 14) Após terminar a administração do colostro, quantas vezes por dia administra leite aos vitelos?
- Uma
 - Duas
 - Mais de duas
- 15) Que quantidade de leite administra aos vitelos por dia?
- Menos de 4L
 - 4 a 8 L
 - Mais de 8 L
- 16) O que utiliza para tratar as diarreias dos seus vitelos?
- Antibiótico oral
 - Antibiótico sistémico
 - Re-hidratante oral
 - Re-hidratante sistémico
 - AINES
 - Outros: _____

17) Compra animais para introduzir na sua exploração? Sim Não

18.1) Se sim, há quanto tempo foi a última compra?

- Último ano
- 1 a 2 anos
- 2 a 3 anos
- Mais de 3 anos

18.2) Quantos animais comprou nos últimos 5 anos?

- Menos de 10
- 10 a 50
- 50 a 100
- Mais de 100

18.3) Que tipo de animais comprou?

- Novilhas pré-parto
- Novilhas pós-parto
- Vacas de 2ª barriga
- Outros: _____

18.4) Qual a sua origem?

- Nacional
- Estrangeiro
- Uma única vacaria
- Negociante
- Outros: _____

19. Sabe se existe na sua exploração:

- IBR
- BVD
- Paratuberculose
- Micoplasma
- Outros: _____

20. Tem algum plano de controlo destas doenças? Sim Não

20.1) Se sim, qual? _____

21. No último ano detetou na sua exploração vacas que se encontrassem magras, com apetite e com diarreia crónica sem cura? Sim Não

21.1) Se sim, quantas? _____

22. Que bisnagas utiliza para o tratamento de mastites?

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Trimlac | <input type="checkbox"/> Synulox |
| <input type="checkbox"/> Cloxambiotic | <input type="checkbox"/> Sorogenta |
| <input type="checkbox"/> Penicilina mista LIL | <input type="checkbox"/> Kloxerate |
| <input type="checkbox"/> Cefovet | <input type="checkbox"/> Soromicina |
| <input type="checkbox"/> Cobactan VL | <input type="checkbox"/> Syvamast |
| <input type="checkbox"/> Cooperclon | <input type="checkbox"/> Mamyzin |
| <input type="checkbox"/> Nafpenzal | <input type="checkbox"/> Ubrolexin |
| <input type="checkbox"/> Pathozone | <input type="checkbox"/> Rilexine |
| <input type="checkbox"/> Pirsue | <input type="checkbox"/> Lincocin forte S |

Muito obrigada pela colaboração!
Inês Rebelo

Anexo II. Princípios ativos das bisnagas utilizadas no tratamento de mamites

Bisnaga	Substância ativa
Cefovet® , Merial	Cefazolina
Cloxambiotic® , Calier	Cloxacilina + Ampicilina
Cobactan VL® , MSD	Cefquinoma
Cooperclor® , MSD	Cloxacilina + Ampicilina
Kloxerate® , Zoetis	Cloxacilina
Lincocin Forte S® , Zoetis	Lincomicina + Neomicina
Mamyzin® , Vetlima	Estreptomicina + Penetamato + Framicetina
Nafpenzal® , MSD	Penicilina G + Estreptomicina
Pathozone® , Zoetis	Cefoperazona
Penicilina mista LIL® , Ceva	Penicilina + Estreptomicina
Pirsue® , Zoetis	Pirlimicina
Rilexine® , Virbac	Cefalexina
Sorogenta® , Medinfar-Sorológico	Gentamicina
Sorocimicina® , Medinfar-Sorológico	Penicilina + Estreptomicina
Synulox® , Zoetis	Amoxicilina + Ácido clavulânico
Syvamast® , Syva	Cloxacilina + Ampicilina
Trimlac® , Bayer	Sulfadiazina + Trimetropim
Ubrolexin® , Vetlima	Cefalexina + Canamicina

Anexo III. Resultados do teste IMViC

Resultados IMViC

Nº de amostra	Citrato Simmons	VP	Mobilidade	H ₂ S	Indol	<i>E. coli</i>
1.1	-	-	-	-	+	✓
1.2	-	-	+	-	+	✓
1.3	-	-	-	-	+	✓
1.4	-	-	+	-	+	✓
1.5	-	-	+	-	+	✓
2.1	-	-	+	-	+	✓
2.2	-	-	+	-	+	✓
2.3	-	-	+	-	+	✓
2.4	-	-	+	-	+	✓
2.5	-	-	+	-	+	✓
4.1	-	-	+	-	+	✓
4.2	-	-	+	-	+	✓
4.3	-	-	-	-	+	✓
4.4	-	-	-	-	+	✓
4.5	-	-	+	-	+	✓
5.1	-	-	+	-	+	✓
5.2	-	-	+	-	+	✓
5.3	-	-	+	-	+	✓
5.4	-	-	+	-	+	✓
5.5	-	-	+	-	+	✓
6.1	-	-	-	-	+	✓
6.2	-	-	-	-	+	✓
6.3	-	-	+	-	+	✓
6.4	-	-	-	-	+	✓
6.5	-	-	-	-	+	✓
7.1	-	-	-	-	+	✓
7.2	-	-	-	-	+	✓
7.3	-	-	-	-	+	✓
7.4	-	-	+	-	+	✓
7.5	-	-	+	-	+	✓
7.6	-	-	-	-	-	x
8.1	-	-	+	-	+	✓
8.2	-	-	+	-	+	✓
8.3	-	-	+	-	+	✓
8.4	-	-	+	-	+	✓
8.5	-	-	+	-	+	✓
9.1	-	-	+	-	+	✓
9.2	-	-	+	-	+	✓
9.3	-	-	+	-	+	✓
9.4	-	-	+	-	+	✓
9.5	-	-	+	-	+	✓
9.6	-	-	-	-	+	✓
10.1	-	-	+	-	+	✓
10.2	-	-	+	-	+	✓
10.3	-	-	+	-	+	✓
10.4	-	-	+	-	+	✓
10.5	-	-	+	-	+	✓

Nº de amostra	Citrato Simmons	VP	Mobilidade	H ₂ S	Indol	<i>E. coli</i>
11.1	-	-	+	-	+	✓
11.2	-	-	+	-	+	✓
11.3	-	-	-	-	+	✓
11.4	-	-	+	-	+	✓
11.5	-	-	+	-	+	✓
12.1	-	-	+	-	+	✓
12.2	-	-	-	-	+	✓
12.3	-	-	-	-	+	✓
12.4	-	-	-	-	+	✓
12.5	-	-	+	-	+	✓
13.1	-	-	+	-	+	✓
13.2	-	-	+	-	+	✓
13.3	-	-	+	-	+	✓
14.1	-	-	-	-	-	x
14.2	-	-	-	-	-	x
14.3	-	-	-	-	-	x
14.4	-	-	-	-	-	x
14.5	-	-	-	-	-	x
14.6	-	-	-	-	-	x
15.1	-	-	-	+	-	x
15.2	-	-	+	-	+	✓
15.3	-	-	+	-	+	✓
15.4	-	-	+	-	+	✓
15.5	-	-	+	-	+	✓
15.6	-	-	-	-	+	✓
16.1	-	-	-	-	+	✓
16.2	-	-	-	-	+	✓
16.3	-	-	-	-	+	✓
16.4	-	-	-	-	+	✓
16.5	-	-	-	-	+	✓
17.1	-	-	-	+	-	x
17.2	-	-	+	-	-	x
17.3	-	-	+	-	+	✓
17.4	-	-	+	-	-	x
17.5	-	-	+	-	+	✓
17.6	-	-	-	-	+	✓
18.1	-	-	+	-	+	✓
18.2	-	-	+	-	+	✓
18.3	-	-	-	+	-	x
18.4	-	-	-	-	+	✓
18.5	-	-	+	-	+	✓
19.1	-	-	-	-	+	✓
19.2	-	-	+	-	+	✓
19.3	-	-	+	-	+	✓
19.4	-	-	+	-	+	✓
19.5	-	-	-	-	+	✓
20.1	-	-	+	-	+	✓
20.2	-	-	+	-	+	✓

Nº de amostra	Citrato Simmons	VP	Mobilidade	H ₂ S	Indol	<i>E. coli</i>
20.3	-	-	+	-	+	✓
20.4	-	-	+	-	+	✓
20.5	-	-	+	-	+	✓
21.1	-	-	+	-	+	✓
21.2	-	-	+	-	+	✓
21.3	-	-	+	-	+	✓
21.4	-	-	+	-	+	✓
21.5	-	-	+	-	+	✓
21.6	-	-	+	-	+	✓
22.1	-	-	+	-	+	✓
22.2	-	-	+	-	+	✓
22.3	-	-	+	-	+	✓
22.4	-	-	+	-	+	✓
22.5	-	-	+	-	+	✓
22.6	-	-	+	-	+	✓
23.1	-	-	+	-	+	✓
23.2	-	-	+	-	+	✓
23.3	-	-	+	-	+	✓
23.4	-	-	+	-	+	✓
23.5	-	-	+	-	+	✓
24.1	-	-	+	-	+	✓
24.2	-	-	+	-	+	✓
24.3	-	-	+	-	+	✓
24.4	-	-	-	-	+	✓
24.5	-	-	+	-	+	✓
24.6	-	-	+	-	+	✓
25.1	-	-	-	-	+	✓
25.2	-	-	-	-	+	✓
25.3	-	-	+	-	+	✓
25.4	-	-	-	-	+	✓
25.5	-	-	-	-	+	✓
26.1	-	-	+	-	+	✓
26.2	-	-	+	-	+	✓
26.3	-	-	+	-	+	✓
27.1	-	-	+	-	+	✓
27.2	-	-	+	-	+	✓
27.3	-	-	+	-	+	✓
27.4	-	-	+	-	+	✓
27.5	-	-	+	-	+	✓
28.1	-	-	+	-	+	✓
28.2	-	-	+	-	+	✓
28.3	-	-	+	-	+	✓
28.4	-	-	+	-	+	✓
28.5	-	-	+	-	+	✓
30.1	-	-	+	-	+	✓
30.2	-	-	+	-	+	✓
30.3	-	-	+	-	+	✓
30.4	-	-	+	-	+	✓

Nº de amostra	Citrato Simmons	VP	Mobilidade	H ₂ S	Indol	<i>E. coli</i>
30.5	-	-	+	-	+	✓
32.1	-	-	+	-	+	✓
32.2	-	-	+	-	+	✓
32.3	-	-	+	-	+	✓
32.4	-	-	+	-	+	✓
32.5	-	-	+	-	+	✓
33.1	-	-	+	-	+	✓
33.2	-	-	+	-	+	✓
33.3	-	-	+	-	+	✓
33.4	-	-	+	-	+	✓
33.5	-	-	+	-	+	✓
35.1	-	-	+	-	+	✓
35.2	-	-	+	-	+	✓
35.3	-	-	+	-	+	✓
35.4	-	-	+	-	+	✓
35.5	-	-	+	-	+	✓
36.1	-	-	+	-	+	✓
36.3	-	-	+	-	+	✓
36.4	-	-	+	-	+	✓

Resultados TSA

Nº de amostra	Diâmetro do halo (mm)					
	ENR	CN	AMC	TE	EFT	SXT
1.1	25	26	17	30	31	32
1.2	23	25	18	6	30	20
1.3	25	25	20	6	30	33
1.4	33	26	20	10	30	33
1.5	32	12	20	30	32	6
2.1	31	19	6	7	15	24
2.2	33	19	7	26	16	28
2.3	33	22	6	7	16	25
2.4	30	21	20	7	16	30
2.5	32	20	6	8	16	23
4.1	35	27	18	6	31	34
4.2	34	27	23	6	30	25
4.3	23	25	20	6	30	34
4.4	34	28	22	6	31	6
4.5	30	29	19	6	31	35
5.1	6	16	6	6	14	6
5.2	6	6	6	6	12	6
5.3	30	17	8	6	18	26
5.4	6	18	6	6	23	6
5.5	29	17	6	7	15	26
6.1	34	20	6	6	17	6
6.2	32	21	6	6	15	6
6.3	32	20	7	6	6	6
6.4	31	19	6	6	24	6
6.5	31	17	6	6	24	6
7.1	6	6	6	6	25	6
7.2	6	19	6	6	21	6
7.3	6	19	6	6	6	6
7.4	6	17	6	6	6	6
7.5	18	17	20	25	25	32
8.1	27	25	27	29	12	35
8.2	25	24	25	12	14	32
8.3	6	25	21	6		25
8.4	6	25	20	6	6	6
8.5	6	25	24	30	11	30
9.1	34	17	16	27	21	29
9.2	23	18	6	6	26	29
9.3	21	18	6	6	27	32
9.4	33	20	6	7	26	26
9.5	24	17	6	7	26	6
9.6	6	6	6	6	26	6
10.1	37	20	6	29	6	6
10.2	36	19	6	30	6	6
10.3	36	19	20	27	29	32
10.4	36	20	6	27	6	6
10.5	34	20	8	30	6	6

Nº de amostra	ENR	CN	AMC	TE	EFT	SXT
11.1	30	18	21	8	25	14
11.2	33	17	20	6	24	20
11.3	30	20	27	6	25	15
11.4	31	17	25	6	25	20
11.5	30	20	25	6	24	21
12.1	31	18	26	16	25	30
12.2	22	18	27	25	25	20
12.3	21	17	25	24	23	17
12.4	19	18	20	19	24	31
12.5	30	19	18	19	25	31
13.1	31	20	15	6	29	6
13.2	31	20	25	10	25	33
13.3	24	25	19	7	28	29
15.2	27	27	26	6	6	35
15.3	6	17	23	6	14	6
15.4	6	25	22	6	10	30
15.5	29	25	22	6	16	24
15.6	6	25	23	28	8	29
16.1	6	26	16	6	16	6
16.2	6	26	18	6	15	6
16.3	6	26	18	6	16	6
16.4	6	26	19	6	13	6
16.5	6	26	18	6	12	6
17.3	33	21	24	8	14	28
17.5	32	20	22	26	6	6
17.6	31	20	20	27	29	6
18.1	6	20	6	6	6	6
18.2	6	7	6	6	13	6
18.4	6	19	6	6	6	6
18.5	6	6	6	6	6	6
19.1	30	17	20	25	24	30
19.2	28	18	20	25	23	30
19.3	29	18	25	6	25	30
19.4	25	13	22	6	26	6
19.5	28	19	24	14	20	30
20.1	33	20	25	8	25	31
20.2	33	20	25	8	14	31
20.3	31	19	25	10	14	32
20.4	31	19	25	10	14	30
20.5	31	20	25	6	14	31
21.1	33	13	21	6	6	6
21.2	36	12	21	6	6	6
21.3	37	12	20	6	6	6
21.4	37	13	24	6	6	6
21.5	6	6	25	6	20	6
21.6	8	21	23	6	12	6
22.1	33	24	24	13	6	30
22.2	33	21	23	21	6	34
22.3	6	10	15	6	15	6

Nº de amostra	Diâmetro do halo (mm)					
	ENR	CN	AMC	TE	EFT	SXT
22.4	21	19	22	20	6	31
22.5	35	26	23	30	6	35
22.6	32	24	24	29	6	33
23.1	36	26	24	6	11	6
23.2	32	25	20	6	15	6
23.3	10	27	22	6	16	6
23.4	36	29	24	6	12	6
23.5	35	25	24	6	9	6
24.1	6	10	15	6	6	6
24.2	6	10	15	6	6	6
24.3	6	10	16	6	6	6
24.4	6	26	15	6	14	6
24.5	6	11	16	6	10	6
24.6	6	11	16	6	10	6
25.1	6	6	6	6	6	6
25.2	6	6	6	6	6	6
25.3	6	6	6	6	6	6
25.4	6	6	6	6	6	6
25.5	6	6	6	6	6	6
26.1	30	25	21	6	28	25
26.2	6	23	18	6	25	6
26.3	6	23	17	6	28	6
27.1	31	21	20	14	16	29
27.2	34	19	22	16	16	30
27.3	31	19	21	14	18	29
27.4	30	18	20	17	15	30
27.5	32	20	21	17	16	30
28.1	6	21	10	7	19	6
28.2	6	21	8	6	10	6
28.3	6	21	8	7	19	6
28.4	31	18	19	23	16	30
28.5	6	20	8	7	30	6
30.1	32	20	22	24	17	31
30.2	6	6	6	6	6	6
30.3	6	6	6	6	6	6
30.4	11	6	6	6	6	6
30.5	18	6	7	6	6	6
32.1	32	25	10	31	12	23
32.2	33	11	22	6	6	16
32.3	6	22	20	6	6	6
32.4	34	8	22	6	18	6
32.5	36	27	11	28	15	27

Nº de amostra	Diâmetro do halo (mm)					
	ENR	CN	AMC	TE	EFT	SXT
33.1	32	17	30	34	30	38
33.2	32	15	29	30	32	38
33.3	34	16	24	6	32	6
33.4	38	16	28	6	31	36
33.5	38	17	32	10	32	36
35.1	40	18	30	6	33	28
35.2	34	17	30	6	30	26
35.3	36	17	30	6	30	28
35.4	32	17	30	6	30	28
35.5	34	16	28	6	30	26
36.1	36	16	34	34	34	36
36.3	36	17	29	34	31	34
36.4	6	18	24	8	32	6

Anexo V. Resultados dos TSA's – suscetibilidades.

Resultados TSA

Nº de amostra	ENR	CN	AMC	TE	EFT	SXT	*
1.1	S	S	I	S	S	S	S
1.2	S	S	S	R	S	S	RS
1.3	S	S	S	R	S	S	RS
1.4	S	S	S	R	S	S	RS
1.5	S	R	S	S	S	R	RM
2.1	S	S	R	R	R	S	MR
2.2	S	S	R	S	R	S	RM
2.3	S	S	R	R	R	S	MR
2.4	S	S	S	R	R	S	RM
2.5	S	S	R	R	R	S	MR
4.1	S	S	S	R	S	S	RS
4.2	S	S	S	R	S	S	RS
4.3	S	S	S	R	S	S	RS
4.4	S	S	S	R	S	R	RM
4.5	S	S	S	R	S	S	RS
5.1	R	S	R	R	R	R	MR
5.2	R	R	R	R	R	R	MR
5.3	S	S	R	R	I	S	RM
5.4	R	S	R	R	S	R	MR
5.5	S	S	R	R	R	S	MR
6.1	S	S	R	R	R	R	MR
6.2	S	S	R	R	R	R	MR
6.3	S	S	R	R	R	R	MR
6.4	S	S	R	R	S	R	MR
6.5	S	S	R	R	S	R	MR
7.1	R	R	R	R	S	R	MR
7.2	R	S	R	R	R	R	MR
7.3	R	S	R	R	R	R	MR
7.4	R	S	R	R	R	R	MR
7.5	I	S	S	S	S	S	S
8.1	S	S	S	S	R	S	RS
8.2	S	S	S	R	R	S	RM
8.3	R	S	S	R	R	S	MR
8.4	R	S	S	R	R	R	MR
8.5	R	S	S	S	R	S	RM
9.1	S	S	I	S	S	S	S
9.2	S	S	R	R	S	S	RM
9.3	S	S	R	R	S	S	RM
9.4	S	S	R	R	S	S	RM
9.5	S	S	R	R	S	R	MR
9.6	R	R	R	R	S	R	MR
10.1	S	S	R	S	R	R	MR
10.2	S	S	R	S	R	R	MR
10.3	S	S	S	S	S	S	S
10.4	S	S	R	S	R	R	MR
10.5	S	S	R	S	R	R	MR

Nº de amostra	ENR	CN	AMC	TE	EFT	SXT	*
11.1	S	S	S	R	S	R	RM
11.2	S	S	S	R	S	S	RS
11.3	S	S	S	R	S	R	RM
11.4	S	S	S	R	S	S	RS
11.5	S	S	S	R	S	S	RS
12.1	S	S	S	I	S	S	S
12.2	S	S	S	S	S	S	S
12.3	S	S	S	S	S	S	S
12.4	I	S	S	S	S	S	S
12.5	S	S	S	S	S	S	S
13.1	S	S	I	R	S	R	RM
13.2	S	S	S	R	S	S	RS
13.3	S	S	R	S	S	S	RS
15.1	S	S	S	R	R	S	RM
15.2	R	S	S	R	R	R	MR
15.3	R	S	S	R	R	S	MR
15.4	S	S	S	R	R	S	RM
15.5	R	S	S	S	R	S	RM
15.6	R	S	I	R	R	R	MR
16.1	R	S	S	R	R	R	MR
16.2	R	S	S	R	R	R	MR
16.3	R	S	S	R	R	R	MR
16.4	R	S	S	R	R	R	MR
16.5	R	S	S	R	R	R	MR
17.3	S	S	S	R	R	S	RM
17.5	S	S	S	S	R	R	RM
17.6	S	S	S	S	S	R	RS
18.1	R	S	R	R	R	R	MR
18.2	R	R	R	R	R	R	MR
18.4	R	S	R	R	R	R	MR
18.5	R	R	R	R	R	R	MR
19.1	S	S	S	S	S	S	S
19.2	S	S	S	S	S	S	S
19.3	S	S	S	R	S	S	RS
19.4	S	I	S	R	S	R	RM
19.5	S	S	S	R	I	S	RS
20.1	S	S	S	R	R	S	RM
20.2	S	S	S	R	R	S	RM
20.3	S	S	S	R	R	S	RM
20.4	S	S	S	R	R	S	RM
20.5	S	S	S	R	R	S	RM
21.1	S	I	S	R	R	R	MR
21.2	S	R	S	R	R	R	MR
21.3	S	R	S	R	R	R	MR
21.4	S	I	S	R	R	R	MR
21.5	R	R	S	R	I	R	MR
21.6	R	S	S	R	R	R	MR
22.1	S	S	S	R	R	S	RM
22.2	S	S	S	S	R	S	RS
22.3	R	R	I	R	R	R	MR
22.4	S	S	S	S	R	S	RS
22.5	S	S	S	S	R	S	RS
22.6	S	S	S	S	R	S	RS
23.1	S	S	S	R	R	R	MR
23.2	S	S	S	R	R	R	MR
23.3	R	S	S	R	R	R	MR

Nº de amostra	ENR	CN	AMC	TE	EFT	SXT	*
23.4	S	S	S	R	R	R	MR
23.5	S	S	S	R	R	R	MR
24.1	R	R	I	R	R	R	MR
24.2	R	R	I	R	R	R	MR
24.3	R	R	I	R	R	R	MR
24.4	R	S	I	R	R	R	MR
24.5	R	R	I	R	R	R	MR
24.6	R	R	I	R	R	R	MR
25.1	R	R	R	R	R	R	MR
25.2	R	R	R	R	R	R	MR
25.3	R	R	R	R	R	R	MR
25.4	R	R	R	R	R	R	MR
25.5	R	R	R	R	R	R	MR
26.1	S	S	S	R	S	S	RS
26.2	R	S	S	R	S	R	MR
26.3	R	S	I	R	S	R	MR
27.1	S	S	S	R	R	S	RM
27.2	S	S	S	I	R	S	RS
27.3	S	S	S	R	I	S	RS
27.4	S	S	S	I	R	S	RS
27.5	S	S	S	I	R	S	RS
28.1	R	S	R	R	I	R	MR
28.2	R	S	R	R	R	R	MR
28.3	R	S	R	R	I	R	MR
28.4	S	S	S	S	R	S	RS
28.5	R	S	R	R	I	R	MR
30.1	S	S	S	S	R	S	RS
30.2	R	R	R	R	R	R	MR
30.3	R	R	R	R	R	R	MR
30.4	R	R	R	R	R	R	MR
30.5	I	R	R	R	R	R	MR
32.1	S	S	R	S	R	S	RM
32.2	S	R	S	R	R	S	MR
32.3	R	S	S	R	R	R	MR
32.4	S	R	S	R	I	R	MR
32.5	S	S	R	R	R	S	MR
33.1	S	S	S	S	S	S	S
33.2	S	S	S	S	S	S	S
33.3	S	S	S	R	S	R	RM
33.4	S	S	S	R	S	S	RS
33.5	S	S	S	R	S	S	RS
35.1	S	S	S	R	S	S	RS
35.2	S	S	S	R	S	S	RS
35.3	S	S	S	R	S	S	RS
35.4	S	S	S	R	S	S	S
35.5	S	S	S	R	S	S	RS
36.1	S	S	S	S	S	S	S
36.3	S	S	S	S	S	S	S
36.4	R	S	S	R	S	R	MR

Legenda:

R- *E. coli* resistente ao antibiótico; **I-** Sensibilidade intermédia; **S-** *E. coli* sensível ao antibiótico

***S-**suscetível; **RS**-resistência simples (1 AB);**RM**-resistência múltipla (2 AB);**MR**-Multirresistências (3ou +AB)