



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO DE VITELOS COM LEITE DE DESPERDÍCIO NA
EMERGÊNCIA DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

MANUEL PORTOCARRERO DE ALMADA DE BARROS CARDOSO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida
Doutor José Ricardo Dias Bexiga
Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de
Oliveira

ORIENTADOR

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

2017
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO DE VITELOS COM LEITE DE DESPERDÍCIO NA
EMERGÊNCIA DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

MANUEL PORTOCARRERO DE ALMADA DE BARROS CARDOSO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida
Doutor José Ricardo Dias Bexiga
Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de
Oliveira

ORIENTADOR

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

2017
LISBOA

“Em caso de dúvida ou persistência dos sintomas,
consulte o seu médico ou farmacêutico.”

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária, por todos os recursos e meios humanos e materiais que possibilitaram a realização deste estudo.

Ao Professor Ricardo Bexiga e à Mestre Carla Carneiro, em cujo apoio foram inextinguíveis.

À Mestre Inês Rebelo, por todo o trabalho em que pude alicerçar o meu projecto.

Ao Professor Telmo Nunes, pela indispensável ajuda no processamento da análise estatística.

À Doutora Lina Cavaco e ao Mestre Erik Gullberg, pela disponibilidade e prontidão que os tornam tão bons exemplos.

A toda a equipa dos laboratórios da faculdade, pelo acolhimento activo com que me receberam nas suas rotinas, partilhando material, equipamento e ensinamentos que tornaram a minha experiência mais profícua a nível académico e extra-académico.

À minha Família, cujo empenho e paciência superaram os meus.

A todos os amigos que me acompanharam ao longo deste trabalho, directa e indirectamente, figurando honradamente como co-autores subentendidos de todos os esforços empregues.

Resumo

Influência da Alimentação de Vitelos com Leite de Desperdício na Emergência de Bactérias Multirresistentes

A antibiorresistência é uma ameaça global para a saúde pública e individual: no presente, pela crescente ineficiência da maior arma de que dispomos contra as doenças infecciosas, mas igualmente no futuro, pelo agravamento do problema, que ameaça regredir a prática clínica à era pré-biótica, quando as doenças infecciosas dizimavam populações.

Através da determinação de produção de β -lactamases de largo espectro (ESBL) por isolados de *Escherichia coli* (*E. coli*) de 32 explorações leiteiras representativas de três áreas geográficas (Centro Litoral, Ribatejo e Alto Alentejo), este estudo pretende averiguar a relação causal entre a alimentação de vitelos com leite de desperdício (LD) e a ocorrência de multirresistência antibiótica por ESBL. As explorações foram caracterizadas por um questionário anteriormente apresentado em Rebelo (2014), possibilitando cruzar dados relevantes sobre práticas de manejo (como alimentar os vitelos com LD e a natureza da sua composição, por exemplo) e a prevalência de *E. coli* produtora de ESBL.

Para determinar fenotipicamente a produção de ESBL, foi realizado um teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) pelo método Kirby-Bauer, utilizando os antibióticos cefotaxima (CTX) e ceftazidima (CAZ). Foi presumida a produção de ESBL (n=15) quando um isolado resistente a CTX e/ou CAZ teve um aumento diametral do halo de inibição de pelo menos 5mm num segundo TSA com adição de ácido clavulânico (inibidor enzimático das β -lactamases).

A genotipagem da produção de ESBL dos grupos CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CMY-2 envolveu a pesquisa de um gene codificador de cada grupo, por PCR convencional.

A ocorrência de *E. coli* produtora de ESBL manifestou-se fenotipicamente em 15 explorações (48,4%) e genotipicamente em 20 explorações (64,5%). O grupo CTX-M-1 foi o mais frequentemente encontrado, estando presente em 12 explorações (38,7%). O recurso ao LD para alimentar os vitelos verificou-se em 28 explorações (90,3%), incluindo leite proveniente de vacas mastíticas e/ou em intervalo de segurança em todos os casos.

Apesar de inconclusivo no relacionamento de ESBL e administração de LD a vitelos, antibiótico (AB) aditivado na alimentação de vitelos e número de AB usado no tratamento de mastites ($p \geq 0,05$ pelo teste exacto de Fisher), o estudo sugere o aprofundamento da dimensão e impacto destas associações. Ao abordar a questão com perspectivas críticas multidisciplinares, poderemos (i) definir a dimensão prática do problema teórico exposto, (ii) implementar medidas de resolução e/ou redução do problema (transversalmente aos níveis legislativo e executivo), protegendo a Saúde Pública e os interesses dos produtores e (iii) prevenir potenciais situações de crise advindas da ineficiência crescente de um conjunto cada vez mais vasto de AB, ao prolongar a sua vida útil pela gestão responsável da sua utilização.

Palavras-chave: resistência antimicrobiana, antibióticos, *E. coli*, leite de desperdício, ESBL, CTX-M, CMY-2

Abstract

Influence of Feeding Calves with Waste Milk on the Emergence of Multi-Resistant Bacteria

Antimicrobial resistance is a global menace for both public and individual health: in the present, through weakening the major weapon against infectious diseases, but also in the future, threatening to reduce clinical practice to a pre-biotic era, when infectious diseases devastated entire populations.

This study aims to evaluate the association between feeding waste milk (WM) to calves and the occurrence of antibiotic (AB) multi-resistance by extended spectrum β -lactamase enzymes (ESBL) through determining ESBL production by *Escherichia coli* (*E. coli*) isolates from 32 dairy farms representative of three geographic areas (Centro Litoral, Ribatejo and Alto Alentejo). These farms were characterized through a questionnaire previously presented in Rebelo (2014), allowing the data analysis regarding animal husbandry (such as feeding WM to calves and the nature of its composition, for instance) and the prevalence of ESBL producing *E. coli*.

To phenotypically determine the production of ESBL, a disk-diffusion AB susceptibility test (TSA) was carried out using Kirby-Bauer method, with cefotaxime (CTX) and ceftazidime (CAZ) disks. ESBL production was considered positive ($n=15$) when an isolate resistant to CTX and/or CAZ showed an increase of at least 5mm of its inhibition halo in a second TSA with the addition of clavulanate (enzymatic inhibitor of β -lactamases).

Genotypical determination of ESBL production of CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 and CMY-2 groups involved the search of a specific gene for each group through conventional PCR.

ESBL-producing *E. coli* phenotype was found in 15 farms (48,4%) and its genotype in 20 (64,5%). CTX-M-1, the most frequently detected ESBL group, was found in 12 farms (38,7%). Feeding WM to calves was observed in 28 farms (90,3%) and all of them used mastitic milk and milk collected during withdrawal time.

Even though this study is inconclusive regarding the association between ESBL and feeding calves with WM, adding AB to calves feed and the number of AB used to treat mastitis ($p \geq 0,05$, Fisher's exact test), it shows the need to deepen both theoretical and practical knowledge of the dimension and impact of these associations. Approaching this subject with critical and multidisciplinary perspectives, one will be able to (i) define the practical dimension of the exposed theoretical problem, (ii) implement measures of resolution and/or reduction of the problem (in regulatory and governmental terms), protecting both Public Health and the farmers' interests, and (iii) prevent potential crisis situations due to growing inefficiency of a progressively wider group of AB, extending their clinical life through a responsible management of their usage.

Key-words: antimicrobial resistance, antibiotic, *E. coli*, waste milk, ESBL, CTX-M, CMY-2

Índice

I. Relatório de Estágio.....	1
II. Introdução.....	2
III. Revisão Bibliográfica	
<i>Escherichia coli</i>	5
Antibioterapia.....	7
Antibiorresistência.....	12
Mecanismos de Resistência a Antibióticos.....	16
β -lactamases.....	17
ESBL.....	19
CTX-M.....	21
Leite de Desperdício.....	25
IV. Objectivos.....	31
V. Materiais e Métodos.....	32
VI. Resultados.....	36
VII. Discussão.....	43
VIII. Conclusão.....	49
IX. Bibliografia.....	50

Lista de Figuras

Figura 1 - <i>Mecanismos de antibiorresistência por microrganismos de Gram-negativo</i>	16
Figura 2 - <i>Esquematização de ocorrência de antibiorresistências</i>	27
Figura 3 - <i>Exemplo de leitura ao transiluminador de resultados da amplificação do gene 16S rRNA por PCR, após corrida em gel de agarose</i>	36

Lista de Tabelas

Tabela 1 - <i>Classificação de β-lactamases</i>	20
Tabela 2 - <i>Primers utilizados, características gerais e respectiva referência</i>	35
Tabela 3 - <i>Frequências absoluta e relativa de ensaios fenotípicos e genotípicos concordantes e discordantes</i>	39
Tabela 4 - <i>Frequências absoluta e relativa de E. coli produtora de ESBL nas explorações em função da prática da utilização de LD na alimentação de vitelos</i>	40
Tabela 5 - <i>Distribuição de frequências absolutas e relativas de ocorrência de ESBL mediante a prática de aditivar AB à alimentação dos vitelos</i>	41

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - <i>Vendas de AB reportadas entre 2011 e 2014 pelos 25 EM</i>	11
Gráfico 2 - <i>Frequências relativa e absoluta de identificação fenotípica de E. coli produtora de ESBL</i>	37
Gráfico 3 - <i>Resultado indiferenciado de genotipagem de ESBL</i>	38
Gráfico 4 - <i>Número de grupos genotípicos distintos em cada exploração</i>	38
Gráfico 5 - <i>Frequência relativa e respectivo erro-padrão da proporção de cada grupo de ESBL pesquisado</i>	39
Gráfico 6 - <i>Comparação da frequência relativa de detecção de ESBL em explorações que usam LD na alimentação de vitelos com a de explorações que não o fazem</i>	40
Gráfico 7 - <i>Comparação dos rácios de positividade e negatividade entre explorações com e sem AB aditivado à alimentação de vitelos</i>	41
Gráfico 8 - <i>Frequências relativas de ocorrência de antibiorresistência por ESBL em explorações com protocolos de antibioterapia de 1 a 2, 3 a 4 e 6 a 7 AB aplicados em mastites</i>	42

Lista de Abreviaturas

AB – Antibiótico
ADN – Ácido Desoxirribonucleico
AHDC – Animal Health Diagnostic Center
AIEC – *Escherichia coli* Adero-Invasiva
AMEG – Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group
ARN – Ácido Ribonucleico
BHib – Brain Heart Infusion broth
BIOHAZ – Biological Hazard
CAZ – Ceftazidima
CCS – Contagem de Células Somáticas
CDC – Centers for Disease Control and Prevention
CE – Comissão Europeia
CIA – Antibióticos de Importância Crítica
CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute
CMI – Concentração Mínima Inibitória
CMS – Concentração Mínima Selectiva
CTX – Cefotaxima
DL – Decreto-lei
DNTP – Deoxynucleotide Triphosphate
DWD – Drinking Water Directive
E. coli – *Escherichia coli*
EAEC – *Escherichia coli* Enteroagregativa
ECDC – European Center for Disease Control and Prevention
EEE – Espaço Económico Europeu
EFSA – Autoridade Europeia de Segurança Alimentar
EHEC – *Escherichia coli* Enterohemorrágica
EIEC – *Escherichia coli* Enteroinvasiva
EM – Estado Membro
EMA – Agência Europeia de Medicamentos
EPEC – *Escherichia coli* Enteropatogénica
EPP – Erro-padrão da proporção
EPRUMA – European Platform for Responsible Use of Medicines in Animals
ESBL – β -lactamases de Largo Espectro
ESVAC – Supervisão Europeia de Consumo de Antimicrobianos em Veterinária
ETEC – *Escherichia coli* Enterotoxinogénica
ExPEC – *Escherichia coli* Patogénica Extra-Intestinal
gene *bla* – gene codificador de β -lactamases

IMViC – Indole, Methyl red, Voges-Proskauer, Citrate tests
InPEC – *Escherichia coli* Patogénica Intestinal
IS – Sequências de Inserção
ITU – Infecção do Tracto Urinário
K. pneumoniae – *Klebsiella pneumoniae*
kg – Quilograma
LD – Leite de Desperdício
M – molar
MARAN – Monitoring Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in the Netherlands
mg – miligrama
min – minutos
mm – milímetro
mM – milimolar
MKA – MacConkey Agar
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina
NICE – Instituto Nacional de Saúde e Cuidados de Excelência
NMEC – *Escherichia coli* associada a Meningite Neonatal
OMS – Organização Mundial de Saúde
PBP – Proteína de Ligação da Penicilina
PBS – Phosphate Buffered Saline
PCR – Reacção em Cadeia da Polimerase
PCU – Population Correction Unit
PUAVM – Uso Prudente de Antibióticos em Medicina Veterinária
Reg – Regulamento
rpm – rotações por minuto
s – segundo
S. auerus – *Staphylococcus aureus*
SCENIHR – Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks
SEPEC – *Escherichia coli* associada a Sepsis
TAE – Tris-acetate-EDTA
TGI – Tracto Gastrointestinal
TSA – Teste de Sensibilidade a Antibióticos
UE – União Europeia
UFC – Unidades Formadoras de Colónias
UPEC – *Escherichia coli* Uropatogénica
UV – Ultravioleta
V – volt
WM – Waste Milk

Lista de Símbolos

°C – Grau Centígrado

μl – microlitro

μM – micromolar

I. Relatório de Estágio

A componente prática do estágio curricular de que resultou o presente estudo decorreu entre 8 de Fevereiro e 8 de Novembro de 2016. O período referido foi antecedido de uma fase de planeamento e delineamento protocolar, sucedendo-lhe a fase de tratamento e processamento de dados (em que se inclui a sua análise estatística).

A componente supracitada teve lugar no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV – ULisboa) e consistiu na aplicação de práticas laboratoriais e na aprendizagem de técnicas de microbiologia clássica, extracção de material genético, realização de reacções em cadeia da polimerase (convencional e *multiplex*). As actividades foram realizadas sob orientação e supervisão da Mestre Carla Carneiro e do Professor Doutor Ricardo Bexiga.

Os procedimentos contaram com a complementaridade de instalações e equipamentos de laboratórios adjacentes (nomeadamente do CIISA), cujas colaboração e disponibilidade foram cruciais à concretização do estudo.

O estágio curricular ultrapassou o número mínimo de horas regulamentares (estimando-se, aproximadamente, 1576 horas dedicadas à prática laboratorial).

Os objectivos de familiarização com as técnicas laboratoriais (através da aquisição, aprofundamento e aplicação de conhecimento específico) foram atingidos gradual e constantemente, não só pelo envolvimento integral na realização das próprias técnicas, mas igualmente pelas actividades inespecíficas a que a rotina de investigação laboratorial obriga (reposição de stocks, elaboração de meios de cultura, protocolos de armazenamento ou manutenção de equipamentos, por exemplo).

II. Introdução

Em regime hospitalar, a mortalidade de pacientes com infecções graves causadas por agentes bacterianos resistentes supera consideravelmente a de pacientes infectados pelos mesmos agentes não-resistentes (Organização Mundial de Saúde [OMS], 2016).

Em Portugal, em Janeiro de 2016, no Hospital Universitário de Coimbra, a infecção por *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) multirresistente provocou a morte de três doentes (Público, 2016). O mesmo agente, três meses antes, foi responsável pela morte de três pacientes no Hospital de Vila Nova de Gaia (Público, 2015). Nos Estados Unidos da América, em Maio do mesmo ano, foi registada a transmissão plasmídica do gene *mcr-1* em *Escherichia coli* (*E. coli*) e outras Enterobacteriaceae, que confere resistência a colistina, o antimicrobiano mais recentemente desenvolvido para tratar infecções por microrganismos multirresistentes e catalogado pela OMS como antibiótico de importância crítica (Categoria 2 – risco elevado para a saúde pública) (McGann *et al.*, 2016; OMS, 2016, 2017). Tais ocorrências provam a importância do tema e a pertinência do estudo e combate de multirresistências bacterianas pelo impacto crescente que estas operam na saúde pública a nível mundial.

Atendendo a ubiquidade, a ecorresistência, o espectro alargado de resistências naturais e adquiridas e a facilidade de as transmitir horizontalmente por conjugação de *E. coli*, este bacilo de Gram negativo foi utilizado neste estudo para determinar a prevalência de ocorrência de multirresistências por produção de β -lactamases de largo espectro (ESBL) em explorações leiteiras. Estas bactérias integram a microbiota comensal da maioria dos mamíferos homeotérmicos e persistem consideravelmente no meio que contaminam, o que as torna um bom indicador de prevalência das antibiorresistências em estudo. O mecanismo de resistência em análise neste trabalho é a alteração enzimática do composto antibiótico (AB), mas deve ser tido em conta que este pode co-existir com outros mecanismos, como bombas de efluxo, via metabólica alternativa ou métodos de barreira.

Actualmente, a utilização de antibióticos é transversal ao sector primário, concretizando-se em formas distintas, com objectivos e impactos inerentes a cada aplicação. O tratamento de doenças infecciosas é o motivo base da antibioterapia, mas segue-se do uso preventivo ou mesmo não-terapêutico (como promotor de crescimento ou desinfecção de instalações e equipamentos, por exemplo), facto motivado pela produção massiva de substâncias AB com um preço final reduzido.

O banalizar dos compostos com propriedades AB tornou-os frequentemente encontrados nos compartimentos humano, animal e ambiental em concentrações que chegam, em certos casos, a ultrapassar o limiar residual. A sua presença nesses meios cria condições de pressão selectiva, desencadeando uma reacção que culmina no surgimento e proliferação de resistências antimicrobianas: (i) contacto do microrganismo com o(s) antimicrobiano(s); (ii) morte das estirpes sensíveis ao(s) antimicrobiano(s) presente(s) e sobrevivência das estirpes resistentes; (iii) proliferação generalizada das estirpes resistentes, tornando-se dominantes

por perda de competidores pelos recursos do meio, podendo transferir horizontalmente os genes que conferem resistência.

As β -lactamases, enzimas capazes de hidrolisar os AB β -lactâmicos, constituem o mais importante mecanismo de resistência dos bacilos de Gram negativo e têm sido dadas como exemplo da evolução acelerada de acordo com o paradigma darwiniano, segundo o qual a pressão selectiva exercida pela presença de um AB favorece a sobrevivência das estirpes melhor adaptadas. Paralelamente à utilização generalizada de AB β -lactâmicos, os genes codificadores de β -lactamases (genes *bla*) são, provavelmente, os que apresentam uma distribuição geográfica mais universal. Dado o uso frequente de β -lactâmicos no tratamento de bovinos, as β -lactamases estão quase sempre presentes na microbiota intestinal dos vitelos.

De entre as β -lactamases, as ESBL destacam-se pela capacidade de conferir resistência a uma vasta gama de antibióticos β -lactâmicos (por hidrólise de oxi-imino-cefalosporinas, incluindo penicilinas e cefalosporinas de 2^a, 3^a e 4^a geração) e a monobactâmicos (como aztreonam), mas normalmente não a carbapenemos ou cefamicinas (como cefoxitina). Durante a primeira década do século XXI, um grupo específico de ESBL (família CTX-M) ganhou hegemonia ao exibir uma evolução acelerada e uma dispersão generalizada, sendo presentemente observada em meio hospitalar e comunitário, ao ser veiculada pela ubiquidade de *E. coli*, seu principal produtor. Trata-se de um grupo heterogéneo, cujo fenótipo característico (capacidade de hidrolisar a cefotaxima (CTX), mas com perfil hidrolítico de ceftazidima (CAZ) muito reduzido ou nulo) sofreu uma evolução no sentido de apresentar com frequência crescente um espectro de acção duplo para CTX e CAZ.

O leite de desperdício (LD) – leite não comercializável produzido numa exploração –, por poder ter origem em vacas em antibioterapia ou dentro do intervalo de segurança, é um potencial veículo de AB em concentrações residuais ou sobre-residuais. A sua utilização na alimentação de vitelos expõe a microbiota intestinal a um factor de pressão selectiva, promovendo a proliferação de microrganismos resistentes aos AB com que contactam. Com o objectivo de averiguar a relação causal entre a alimentação de vitelos com LD e a prevalência de *E. coli* produtora de ESBL, foram processados 156 isolados provenientes de amostras fecais de vitelos de 32 explorações leiteiras. Cada isolado foi testado fenotípica e genotipicamente para a produção de ESBL, procedendo-se posteriormente ao cruzamento de informação com a caracterização de cada exploração de origem, afim de analisar estatisticamente a potencial associação factorial.

Ao abordar esta questão com perspectivas críticas multidisciplinares, poderemos (i) definir a dimensão prática do problema teórico exposto, (ii) implementar medidas de resolução e/ou redução do problema (transversalmente aos níveis legislativo e executivo), protegendo a Saúde Pública e os interesses dos produtores e (iii) prevenir potenciais situações de crise

II. Introdução

advindas da ineficiência crescente de um conjunto cada vez mais vasto de AB, ao prolongar a sua vida útil pela gestão responsável da sua utilização.

III. Revisão Bibliográfica

1. *Escherichia coli*

Designam-se de Gram negativo os microrganismos com membrana celular externa lipídica que, ao ser removida juntamente com o corante Cristal Violeta por álcool-acetona no processo de coloração pelo método de H. C. J. Gram (1853-1938), confere a estes microrganismos uma tonalidade rosada (conferida por safranina ou fucsina) em observação microscópica (Hardy, 2016). A família das Enterobacteriaceae é composta por bacilos (bactérias de morfologia alongada) de Gram negativo, constituintes da microbiota intestinal do Homem e mamíferos domésticos em regime de simbiose ou oportunismo patogénico (Guentzel, 1996; van den Bogaard, Willems, London, Top & Stobberingh, 2002; Johnson, 2002).

Escherichia coli (*E. coli*) é o organismo infectante mais prevalente (e o mais exaustivamente estudado) da família Enterobacteriaceae (Eisenstein & Zaleznik, 2000). Sendo ubiquitário, chega a constituir 0,1% da microbiota de um indivíduo são (Todar, 2002). É um bacilo de Gram negativo, não esporulado, oxidase negativo, catalase positivo, anaeróbio facultativo, capaz de fermentar açúcares simples (como glucose) e compostos (como lactose) – do que resulta a acidificação do meio – e de reduzir nitratos (Baylis *et al.*, 2006). Superficialmente, apresenta uma cápsula (antigénio K), um flagelo (antigénio H) que lhe confere mobilidade, e fímbrias (pili, antigénio F) com três classes funcionais de adesinas especializadas que permitem a justaposição celular e a partilha de material genético por conjugação (nomeadamente, transmissão horizontal de genes de resistência antibiótica localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos) (Hacker, 1992; Boyer, 1966; Tenover, 2006; Woodford, Turton & Livermore, 2011). Sob a cápsula, a parede celular é composta por três camadas: (i) membrana externa (onde se localizam os antigénios O somáticos, nos lipopolissacarídeos), (ii) membrana interna e, entre ambas, (iii) periplasma composto por peptidoglicanos (Alexander & Rietschel, 2001; Hirsh, MacLachlan & Walker, 2004).

E. coli integra a microbiota comensal dos mamíferos homeotérmicos e, ao competir por nutrientes e demais recursos do meio, desempenha um papel fulcral tanto na manutenção do equilíbrio inter-específico com outros comensais, patogénicos ou oportunistas (*Klebsiella* sp. ou *Enterobacter* sp., por exemplo), como na protecção contra espécies patogénicas invasoras e/ou oportunistas (como *Salmonella* sp.) (Pupo, Karaolis, Lan & Reeves, 1997; Sousa, 2000; Todar, 2002; European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC], European Food Safety Authority [EFSA], European Medicines Agency [EMA], 2015). Contudo, certas estirpes de *E. coli* são patogénicas, com factores de virulência próprios, capazes de provocar doença no tracto gastrointestinal e de causar infecções em sistemas distintos, como infecção do tracto urinário (ITU), mastite, sepsis ou meningite neonatal (Orskov & Orskov, 1992). As estirpes patogénicas classificam-se funcionalmente, de acordo com o local onde causam doença em intestinais (InPEC) ou extra-intestinais (ExPEC). O primeiro grupo, cujo quadro clínico é

III. Revisão Bibliográfica

predominantemente diarreico, subdivide-se em estirpes enteropatogénicas (EPEC), enterotoxinogénicas (ETEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroagregativas (EAEC), enteroinvasivas (EIEC) e adero-invasivas (AIEC). São exemplos de ExPEC as estirpes uropatogénicas (UPEC) e as estirpes associadas a meningite neonatal (NMEC) ou a sepsis (SEPEC) (Moriel *et al.*, 2012).

A ubiquidade, a sua ecorresistência, o seu espectro alargado de resistências naturais e adquiridas e a facilidade de as transmitir horizontalmente por conjugação tornam *E. coli* um bom indicador de (i) prevalência de antibiorresistências (inferindo, por exemplo, a pressão selectiva devida à administração de AB nas populações em estudo), (ii) de contaminação fecal de água e (iii) de biossegurança, tanto de géneros alimentícios como de controlo de processamento de alimentos (como carne e derivados, lacticínios ou produtos de pesca) (Drinking Water Directive [DWD], 1998; Martins da Costa & Vaz Pires, 2006; DL243/2001; Reg CE 1441/2007).

2. Antibioterapia – Utilização de Antibióticos

A definição de antibiótico (AB) inicialmente proposta por Selman Waksman (responsável pela descoberta da estreptomicina) centra-se no uso, efeito ou acção do composto químico (Waksman & Flynn, 1973). Uma definição prática adoptada por Davies & Davies (2010) considera qualquer classe de molécula orgânica que iniba ou mate microrganismos por interacções específicas com alvos bacterianos. Para efeitos do presente estudo, considera-se, quando nominal, “qualquer substância que destrói ou inibe a multiplicação de microrganismos selectivamente” (ECDC/Autoridade Europeia de Segurança Alimentar [EFSA]/Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks [SCENIHR], 2009), aludindo à sua acção ou capacidade inibitória quando adjetivo.

As componentes estruturais dos AB existem na biosfera há milhões de anos – prova-o o número de derivativas primordiais de aminoácidos encontrados em meteoritos e produtos de reacção da era pré-biótica (Davies, 1990). A descoberta do AB é considerada um dos acontecimentos mais relevantes da história moderna na área da saúde, não apenas devido ao impacto no tratamento de doenças infecciosas mas também pelos efeitos “além-antibioterapia” indicadores de outras actividades biológicas e consequentes aplicações adicionais, como antiviral, antitumoral, tratamento de doenças cardiovasculares, imunossupressão ou promoção de crescimento no sector primário (Demain & Sanchez, 2009). Na União Europeia (UE), a utilização de AB como promotores de crescimento está proibida desde 1 de Janeiro de 2006 (Regulamento 1831/2003/EC de aditivos em nutrição animal). Desde então, em animais e humanos, foi registada uma diminuição da presença de bactérias resistentes às substâncias anteriormente usadas como promotores de crescimento, por exemplo, em alguns países escandinavos (European Medicines Agency [EMA] EFSA, 2017). Melhoramentos na produção de AB levaram ao desenvolvimento de compostos com um preço final cada vez menor, de acesso fácil, promovendo a vulgarização da sua utilização não prescrita e “off-label” (Davies & Davies, 2010). Uso “off-label” é qualquer utilização não prevista pela bula do medicamento, incluindo uso indevido e abusivo (Directiva 2004/28/EC). Há situações previstas no Artigo 11º da Directiva 2004/28/EC em que a utilização “off-label” é necessária, sempre em regime de excepção e sem alternativas convencionais. A utilização “off-label” prevista por esta Directiva deve seguir sequencialmente os seguintes princípios: (i) utilização de um produto autorizado para outra espécie ou para outra condição na mesma espécie; (ii) recurso a um medicamento autorizado em medicina humana ou em medicina veterinária autorizado noutro estado membro (EM), na mesma ou numa espécie diferente; (iii) utilização de um produto de medicina veterinária de preparação extemporânea.

A consequência mais grave da presença excessiva ou na utilização de AB é o concomitante desenvolvimento de estirpes resistentes – capazes de sobreviver ou mesmo crescer na presença de um AB numa determinada concentração, que normalmente seria suficiente para

matar ou inibir microrganismos da mesma espécie (ECDC/EFSA/EMA/SCENIHR, 2009; EMA EFSA, 2017) – o que gerou esforços para controlar a mesma utilização. Um exemplo antigo de controlo da utilização de AB envolve a eritromicina: foi introduzida como alternativa à penicilina no tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) no hospital de Boston, no princípio da década de 1950; menos de um ano após a sua introdução, o seu uso foi abolido por se verificar uma taxa de resistência superior a 70% dos *S. aureus* isolados em ambiente hospitalar (Wise, Viogt, Collin & Cranny, 1955). Algo semelhante foi observado com clortetraciclina e cloranfenicol e, subseqüentemente, com outros AB (Finland, 1979).

A primeira tentativa documental de diminuição da utilização não terapêutica de AB em animais e no sector primário foi publicada há quase meio século, sob o título “As Recomendações de Swann” (Swann, Baxter & Field, 1969). Este relatório, cuja origem remonta a uma conjuntura de tensão no sector de saúde devida à dominância de *S. aureus* resistente à penicilina e, posteriormente, de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), incidiu no problema vigente de desenvolvimento de antibiorresistências a AB usados em medicina humana e em medicina veterinária. Foi recomendado que os AB de medicina humana não pudessem ser usados como promotores de crescimento e que fosse criado um comité de revisão e recomendação de AB usados em humanos, animais e horticultura (“Swann Committee”, fundado em 1998), afim de regularizar o acesso e a aplicação de AB nos diferentes sectores (Soulsby, 2007). A UE publicou directrizes para o uso prudente de AB em medicina veterinária, orientadas para o desenvolvimento e implementação de estratégias de antibioterapia sustentável, implementáveis a todos os níveis pelos produtores dos EM (Prudent Use of Antibiotics in Veterinary Medicine [PUAVM], 2015). Em Março de 2016, o Parlamento Europeu e o Conselho adoptaram o Regulamento “Lei da Saúde Animal”, relativo a doenças transmissíveis. O objectivo do regulamento é o estabelecimento de regras e procedimentos para prevenção e controlo de zoonoses e doenças transmissíveis entre animais (Regulamento 429/2016/EC). Foi o primeiro elo de ligação entre saúde e bem-estar animal e saúde pública, na legislação europeia, e promete ser uma importante ferramenta no combate à disseminação de bactérias resistentes em humanos, animais e no ambiente (EMA EFSA, 2017).

Na prática de antibioterapia, destacam-se como factores promotores de resistência (i) a dosagem, incluindo subdosagem (Kohanski, DePristo & Collins, 2010; van der Horst, Schuurmans, Smid, Koenders & ter Kuile, 2011; Callens *et al.*, 2012; Pardon *et al.*, 2012), (ii) regime de utilização (Chantziaras, Boyen, Callens & Dewulf, 2014), (iii) vias de administração (Burow & Käsbohrer, 2017) e (iv) condições de manejo (Catry *et al.*, 2016).

Ainda que não presentemente quantificável, há um impacto na saúde humana decorrente da utilização de AB em animais de produção. Verifica-se uma correlação quantitativa entre a utilização de AB em diferentes tipos de produção de ruminantes e os níveis de antibiorresistência em *E. coli* (Catry *et al.*, 2016). Os riscos para a saúde pública de estirpes bacterianas multirresistentes em alimentos e animais de produção foram publicados pela

EFSA, que sublinha a necessidade de restringir o uso de cefalosporinas de 3ª e 4ª geração ao estritamente necessário, dado verificarem-se frequentemente fenómenos de co-resistência nas estirpes em causa (EFSA BIOHAZ Panel, 2011). A redução da utilização de AB em produção animal pode passar pela promoção do uso prudente e responsável, bem como pela implementação de medidas alternativas aos AB que os prescindam ou minimizem a sua necessidade. Alguns exemplos de medidas alternativas à utilização de AB em animais de produção incluem probióticos, prebióticos, compostos fitoderivados (como ácidos orgânicos, peptídeos antimicrobianos e agentes imunomoduladores) (EMA EFSA, 2017). Um ponto crucial nas políticas de redução da utilização de AB em produção animal é a sensibilização do consumidor final através de campanhas de divulgação de informação, levando os produtores a estabelecer medidas de redução voluntariamente (O'Neill, 2016). A erradicação de uma doença clinicamente relevante ou produtivamente limitante resulta em benefícios económicos, conjugados com uma diminuição da necessidade de utilização de AB no futuro (Sasaki, Sekiguchi, Uemura & Sueyoshi, 2015). A implementação de protocolos vacinais (particularmente os que permitam a distinção entre animais vacinados e infectados) ou de antibioterapia antes da introdução de uma campanha de erradicação pode contribuir para a redução da população susceptível e aumentar a probabilidade de sucesso da campanha (Dieste-Pérez, Frankena, Blasco, Muñoz & de Jong, 2016).

Apesar da centralidade dos programas de supervisão e gestão de AB em medicina humana (Goff, 2011; National Institute for Health and Care Excellence [NICE], 2015), o estudo das necessidades de programas análogos em medicina veterinária é escasso. Um estudo norueguês revelou que veterinários que lidam com várias espécies ou apenas com ruminantes agem independentemente das exigências dos produtores, mas essa independência não é tão clara para os veterinários que lidam exclusivamente com animais em criação intensiva (porcos, frangos ou vitelos de carne) (Speksnijder, Jaarsma, Verheij & Wagenaar, 2015). Na UE, foram publicados vários estudos de utilização em exploração de AB em diferentes EM (Bos *et al.*, 2015; Postuma *et al.*, 2015). Também a nível da UE, a Comissão de Implementação Decisora 2013/652/EU determinou que, para a vigilância harmonizada de antibiorresistência na produção animal entre os EM, isolados de *E. coli* comensal e de *E. coli* produtora de ESBL, AmpC ou carbapenemase (ver abaixo) colhidos de amostras de carcaças de bovinos com menos de um ano de idade deveriam ser comunicados. Contudo, a falta de estandarização processual de recolha e processamento de amostras em países externos à UE complica a análise comparativa entre dados fornecidos por países diferentes (ECDC EFSA, 2016).

Os AB são usados no tratamento e prevenção de doenças infecciosas em animais de produção de todas as espécies, nos países da UE e Espaço Económico Europeu (EEE) (EMA EFSA, 2017). Relativamente à prevenção, profilaxia (ou tratamento preventivo) refere-se ao tratamento de um animal ou grupo de animais antes do surgimento de sinais clínicos de

doença (European Platform for Responsible Use of Medicines in Animals [EPRUMA], 2013). A definição de metafilaxia consiste no tratamento de um grupo clinicamente saudável, mas presumivelmente infectado e mantido em proximidade de indivíduos clinicamente doentes, pressupondo o tratamento simultâneo destes últimos (EMA, 2016). Uma situação comum de antibioterapia preventiva em bovinos leiteiros prende-se com procedimentos cirúrgicos como cesarianas ou deslocamento do abomaso. O risco de infecção incrementa pelas condições não ideais do meio, pelo estado de imunossupressão no periparto e pelo elevado potencial de infecção pós-cirúrgica (Dumas *et al.*, 2016). Contudo, o risco e consequentes medidas preventivas devem ser sempre ponderados caso-a-caso.

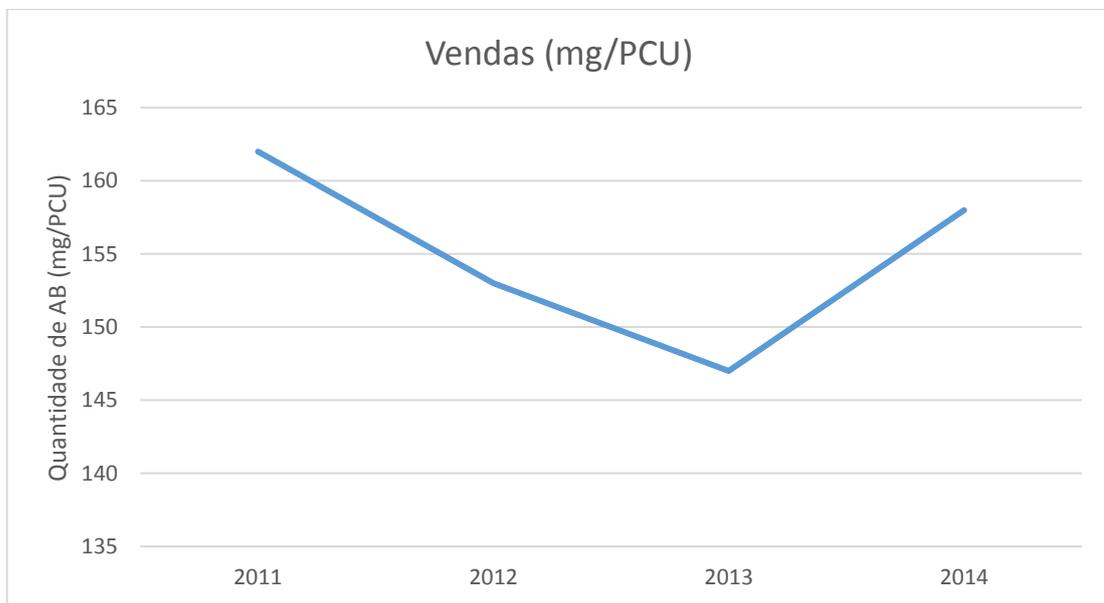
Sistemática e rotineiramente, a aplicação preventiva de AB intramamário em tratamentos de secagem foi generalizada e indiscriminada durante anos (EMA EFSA, 2017). No seguimento da tendência de redução da utilização de AB, a prática de “varrimento” (tratamento de antibioterapia de secagem nos quatro quartos de todas as vacas, indiscriminadamente) foi repensada e gradualmente substituída pelo tratamento selectivo baseado na avaliação individual do risco de infecção (Biggs *et al.*, 2016). A recomendação de tratamento de secagem em varrimento foi recentemente reavaliada em alguns EM e, em concordância com uma utilização de AB mais restritiva, os tratamentos de secagem selectivos e individuais são a recomendação actual (Scherpenzeel *et al.*, 2016). Nos Países Baixos, onde a antibioterapia preventiva em tratamentos de secagem está proibida desde 2011, verificou-se um decréscimo da utilização de AB na produção leiteira, bem como a tendência para evitar o uso de AB de importância crítica (CIA, ver abaixo) em antibioterapia de secagem, entre 2012 e 2013, além de uma redução geral da antibioterapia de secagem em 2014 (Monitoring Antimicrobial Resistance and Antibiotic Use in the Netherlands [MARAN], 2015). Um estudo conduzido em 2013 demonstrou que a saúde do úbere não sofreu qualquer deterioração derivada da restrição da utilização preventiva de AB (Santman-Berends, Swinkels, Lam, Keurentjes & van Schaik, 2016). A antibioterapia selectiva, por oposição ao tratamento em varrimento, resulta numa menor utilização de AB e, dependendo do critério de selecção, num menor impacto negativo na saúde do úbere, de acordo com parâmetros baseados em contagem de células somáticas (CCS) para selecção de vacas a submeter a antibioterapia de secagem (Scherpenzeel *et al.*, 2016).

A OMS desenvolveu e aplicou critérios para classificar a importância relativa dos AB em medicina humana, disponibilizando um meio de análise de risco e gestão estratégica da utilização de AB em produção animal. Os AB foram catalogados de acordo com a sua relevância para a saúde humana, destacando-se os de importância crítica (CIA) e de alta prioridade (Collignon, Conly, Audermont, McEwen & Aidara-Kane, 2016; OMS, 2017). Um CIA é um AB que obedece aos seguintes critérios: (i) a sua classe é a única (ou uma de um número limitado) utilizável no tratamento de infecções bacterianas graves em humanos; (ii) a sua classe é usada, em medicina humana, no tratamento de infecções causadas por bactérias

transmissíveis a humanos a partir de fontes não-humanas, ou por bactérias passíveis de adquirir genes de resistência a partir de fontes não-humanas (Collignon *et al.*, 2016; OMS, 2016). Em 2013, o *Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group* (AMEG) atribuiu uma ordem aos CIA de acordo com o risco que estes representam para a saúde pública e sublinhou ser imperativo que as fluoroquinolonas e as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração sejam utilizadas apenas como último recurso em medicina veterinária (EMA, 2013), dado o risco de co-resistência inerente à utilização destes compostos. Antibióticos classificados como CIA pela OMS, como cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e polimixinas, são vendidos substancialmente em alguns EM, para utilização em animais.

Prever a resistência com acuidade e agir preventivamente seria uma forma viável de aumentar consideravelmente a vida útil de um AB (Martinez, Baquero & Andresson, 2007). O relatório conjunto EMA e Supervisão Europeia de Consumo de Antimicrobianos em Veterinária [ESVAC] (2016) referente a 2014 enumera, por ordem decrescente de volume de vendas expresso em miligramas (mg) de princípio activo vendido por unidade de correcção populacional (PCU), os AB mais utilizados: tetraciclina (33,4%), penicilinas (25,5%), e sulfonamidas (11,0%). Nos 25 EM que reportaram dados à ESVAC entre 2011 e 2014, verificou-se uma descida geral de vendas de 2,4%, ainda que a tendência decrescente tenha sofrido uma inversão entre 2013 e 2014 (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Vendas de AB reportadas entre 2011 e 2014 pelos 25 EM (ESVAC, 2016).



3. Antibiorresistência

A resistência antimicrobiana de um microrganismo (bactéria, fungo, vírus ou parasita) a determinado composto define-se pela sua capacidade de multiplicação na presença da substância em causa (por exemplo, AB, antifúngicos ou antivirais), cuja eficácia terapêutica inicialmente verificada deixou de acontecer (por mutação, regulação diferencial de sobre-expressão genética ou por transferência horizontal de genes) – resistência adquirida (OMS, 2015; EFSA BIOHAZ Panel, 2017) – ou nunca foi observada (pela capacidade inata conferida pela sua estrutura ou características funcionais inerentes) – resistência ou insensibilidade intrínseca (EMA EFSA, 2017). O conceito de resistência a AB (ou antibiorresistência) alude à mesma capacidade, mas especificamente em relação aos AB e apenas por parte de bactérias infectantes, prolongando a infecção, tornando-a persistente e inviabilizando os protocolos terapêuticos convencionais (OMS, 2015). O desenvolvimento de novo de antibiorresistência numa população microbiana pode ocorrer por três mecanismos principais: (i) adaptação dos processos de expressão genética (Händel, Schuurmans, Brul & ter Kuile, 2013); (ii) mutações no ácido desoxirribonucleico (ADN) do organismo-alvo (Händel, Schuurmans, Feng, Brul & ter Kuile, 2014); e (iii) transferência horizontal de genes de resistência (Andersson & Hughes, 2014; Händel *et al.*, 2015).

A resistência de uma estirpe microbiana pode abranger mais de uma classe de AB (co-resistência) (EMA EFSA, 2017). Mutações cromossomais ocorrem aleatoriamente e apenas uma basta para conferir resistência a diferentes AB de uma determinada classe ou de classes diferentes (resistência cruzada). Os genes de resistência não cromossomais podem ser transferidos horizontalmente, entre bactérias da mesma espécie ou de espécies distintas (EMA, 2014), por exemplo, por transferência de plasmídeos que contêm esses genes. A ocorrência de tal transmissão pressupõe dois acontecimentos: a passagem do plasmídeo de uma bactéria para outra e, uma vez integrado na célula receptora, a replicação da célula recém-resistente adjuvada pela pressão selectiva na presença de AB. A frequência da transferência de plasmídeos contendo genes de resistência e a concentração de AB presente no meio relacionam-se inversamente (Schuurmans *et al.*, 2014; Händel, Otte, Jonker, Brul & ter Kuile, 2015), sendo que baixas concentrações de AB possam estimular o processo (Davies and Davies, 2010; Andersson & Hughes, 2014). A exposição a concentrações sub-letais ou sub-inibitórias de AB é selectiva para resistência (Andersson & Hughes, 2014). O conceito de Concentração Mínima Selectiva (CMS) foi proposto para designar a mínima concentração de um AB capaz de seleccionar para uma dada resistência (Sandegren, 2014). No caso das fluoroquinolonas, níveis 230 vezes inferiores à Concentração Mínima Inibitória (CMI) podem resultar num aumento da resistência (Gullberg *et al.*, 2011). Os efeitos da exposição a baixas concentrações de AB dependem da combinação do composto AB e da espécie microbiana envolvidos, podendo variar consideravelmente (Andersson & Hughes, 2014; Sandegren,

2014). O passo de selecção para as células recombinantes não ocorre sem a exposição ao AB (Davies and Davies, 2010). Assim, os níveis de AB que causam um maior risco de disseminação de determinantes de resistência são aqueles que não inibem consideravelmente a transferência plasmídica, mas provocam selecção para a resistência.

Considera-se resistência clínica quando se verifica resistência a um AB particular que resulta no insucesso terapêutico de uma infecção, mesmo que ocorra exposição máxima àquele AB específico (EMA EFSA, 2017). Dado estarem frequentemente contidos em elementos genéticos maiores (como integrões, transposões ou plasmídeos), os genes que conferem antibiorresistência podem estar ligados a outros genes de resistência não relacionados (co-resistência). Nestes casos, diferentes genes de resistência podem ser transferidos no mesmo processo e, conseqüentemente, a selecção para um desses genes implicar a selecção para o(s) gene(s) a ele ligado(s), ocorrendo co-selecção (ECDC/EFSA/EMA/SCENIHR, 2009; Nhung *et al.*, 2015; Wales & Davies, 2015). Considera-se selecção o processo de uma bactéria antibiorresistente se tornar prevalente por destruição ou supressão das populações sensíveis previamente dominantes.

A primeira identificação de uma resistência antimicrobiana data de 1940, doze anos após a descoberta da penicilina por Alexander Fleming (nove anos antes da divulgação da sua estrutura molecular, dada a complexidade do composto e a tecnologia necessária para proceder à sua análise estrutural) (Hodgkin, 1949) e realizada por dois membros da sua equipa (Abraham & Chain, 1940). Tal resistência devia-se a uma enzima capaz de cindir a penicilina, prevenindo a sua acção, e a sua detecção desencadeou tentativas de modificação molecular do AB, objectivando prevenir a sua acção e, assim, manter a sua eficácia (Davies & Davies, 2010). O facto de a descoberta de uma penicilinase bacteriana anteceder a utilização massiva da penicilina está em conformidade com a constatação recente de que um grande número de genes de resistência AB são componentes naturais de populações microbianas (D'Costa, McGrann, Hughes & Wright, 2006). Concordantemente, foram identificados genes de resistência na microbiota intestinal de povos isolados em áreas desconectadas da civilização moderna e, logo, não expostos à utilização de AB (Pallecchi *et al.*, 2007; Pallecchi, Bartoloni, Paradisi & Rossolini, 2008; Bartoloni *et al.*, 2009). No entanto, o rápido surgimento de estirpes antibiorresistentes e a sua distribuição nas populações microbianas pela biosfera são resultado de anos sucessivos de pressão selectiva decorrente da subutilização, sobreutilização e utilização indevida de AB pela mão humana, continuamente, nas últimas seis décadas (Davies & Davies, 2010). Nos 60 anos seguintes à introdução dos AB no mercado, produziram-se milhões de toneladas de AB, usados para os mais variados fins. Numerosas actividades antropogénicas, incluindo a utilização de AB em clínica, veterinária, agricultura, pecuária e aquacultura, bem como outras aplicações de AB e eliminação de resíduos provocam grandes reservatórios de resistências no ambiente (Doyle, 2006) e, muito provavelmente, de genes de virulência e dos organismos que os detêm (Moura, Henriques,

Smalla & Correia, 2010). São exemplo de uso alternativo de AB (i) promoção de crescimento/uso profilático em animais de produção; (ii) uso terapêutico/profilático em humanos; (iii) uso terapêutico/profilático em aquacultura; (iv) uso terapêutico/profilático em animais de companhia; (v) controlo de pragas em fitocultura e agricultura; (vi) uso como biocidas em produtos de higiene e produtos de limpeza; e (vii) esterilidade, clonagem e selecção nos sectores industrial e de investigação (Davies & Davies, 2010). Um exemplo de descarte irresponsável de resíduos antibióticos teve lugar em Hyderabad, Índia, onde chegaram a ser despejados em rios mais de 50kg/dia de ciprofloxacina (Fick *et al.*, 2009). A presença de AB no meio, especialmente em concentrações subinibitórias, facilita e promove o desenvolvimento de antibiorresistências (Davies, Spiegelman & Yim, 2006). Foi demonstrado que a mesma presença intensifica a frequência de transferência genética e de fenómenos de recombinação genética (Couce & Blazquez, 2009; Guerin *et al.*, 2009; Guerin, Cambray, Da Re, Mazel & Ploy, 2010).

A utilização de AB, além de vasta, é transversal e abrange múltiplos sectores a vários níveis (desde o uso convencional, em clínica de humanos e animais, à desinfecção de equipamentos e instalações industriais). Como tal, verificam-se quantidades excessivas de AB no meio ambiente por descarte irresponsável. Dado o papel diminuto das estirpes produtoras de AB que ocorrem na natureza (Gottlieb, 1976), é lógico assumir o protagonismo da produção comercial de AB na quantidade destes compostos encontrados na biosfera.

A microbiota intestinal é considerada o maior reservatório de genes de resistência em animais (Looft *et al.*, 2012) e em humanos (Sommer, Church & Dantas, 2010). Neste ambiente, as bactérias podem ser dadoras, vectores e receptoras de genes de resistência (EMA EFSA, 2017). Além dos agentes patogénicos, a microbiota antibiorresistente inclui numerosos microrganismos comensais e simbióticos que constituem um reservatório de genes de resistência e determinantes relacionados, chamados de “resistoma” (D’Costa *et al.*, 2006; Martinez, Coque & Baquero, 2015). Define-se por resistoma o conjunto de todos os genes de resistência e seus precursores presentes numa bactéria ou população, patogénica ou não patogénica (Wright, 2007). A exposição a um AB tem o potencial de aumentar o reservatório de genes codificadores de resistência na microbiota fecal e do cólon. A transferência genética horizontal ocorre intensamente no rúmen e no intestino, entre bactérias de origens filogenéticas diferentes (Shterzer & Mizrahi, 2015). Este processo está implicado na evolução de estruturas genéticas complexas amplamente dispersas entre bactérias celulolíticas (Ben David *et al.*, 2015) e na disseminação de genes de resistência (Shterzer & Mizrahi, 2015).

Estão descritos mais de 20.000 potenciais genes de resistência de aproximadamente 400 tipos diferentes (Liu & Pop, 2009). A disseminação de genes de resistência é uma consequência de um conjunto de interacções entre veículos biológicos, como transmissão vertical, fenómenos de recombinação, conjugação, transformação ou transdução (ECDC/EFSA/EMA, 2015). As vias de transmissão de genes de resistência entre animais,

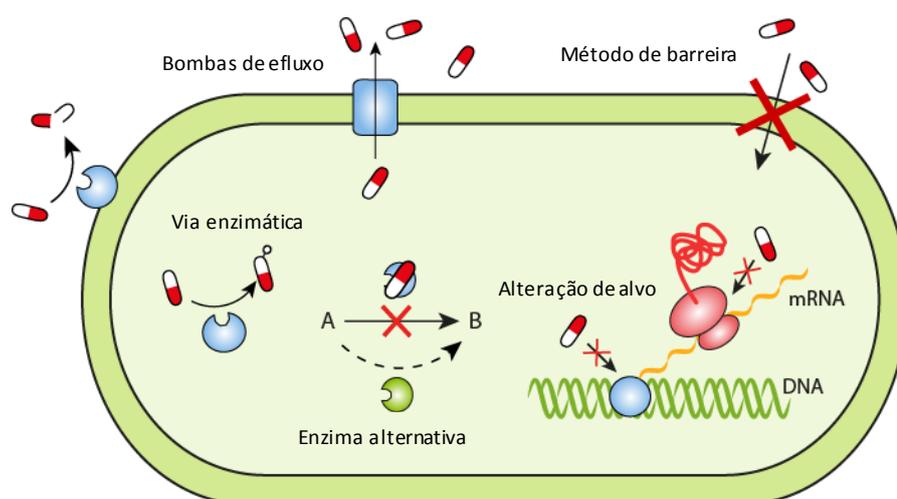
humanos e o meio ambiente são numerosas (Landers, Cohen, Wittum & Larson, 2012). O sentido da transmissão é sempre duplo entre cada par de compartimentos, embora a transmissão de humanos para animais seja menos frequente, acontecendo principalmente por contacto directo (Bal *et al.*, 2016). A transferência de genes de resistência ESBL (ver abaixo) de animais de produção para humanos pode ocorrer directamente, pela cadeia alimentar, uma das principais vias de disseminação (EFSA BIOHAZ Panel, 2011; Maciuca *et al.*, 2015). A disseminação de genes de resistência de hospitais e esgotos para o ambiente através de lixo e produtos de excreção de pacientes tratados é considerada uma ameaça crescente para a saúde pública, podendo espalhar-se por animais expostos a água contaminada, por exemplo (Acar & Rostel, 2001). Um potencial foco de disseminação de genes de resistência (e agentes patogénicos) advém do contacto entre animais vivos de diferentes proveniências em centros de distribuição como mercados (Marquetoux, Stevenson, Wilson, Ridler & Heuer, 2016).

4. Mecanismos de Resistência a Antibióticos

Os mecanismos de resistência são múltiplos e multifactoriais. Podem co-existir e actuar simultaneamente, embora apenas um possa ser suficiente para conferir resistência a diferentes classes de antibióticos (Peleg & Hooper, 2010; EMA EFSA, 2017). As quatro principais vias de resistência são i) via enzimática (destruição ou inibição do composto antimicrobiano, prevenindo a sua acção); ii) efluxo (bombeamento activo do composto antimicrobiano para o meio extracelular, diminuindo a sua concentração junto à(s) estrutura(s) alvo); iii) via metabólica alternativa, deixando de exhibir os locais de ligação na parede celular; iv) barreira (redução da permeabilidade membranar por hipoprodução de porinas) (Tenover, 2006) (Figura 1).

Os genes que conferem resistência a determinado antibiótico tornam os microrganismos que os detêm selectivamente preferenciais (relativamente aos sensíveis), na presença da substância em causa, propiciando um ambiente de pressão selectiva que favorece não só a transmissão vertical da(s) resistência(s) pelo modelo darwiniano (aquisição dos genes de resistência por replicação do organismo resistente), mas igualmente a transmissão horizontal de tais genes (em plasmídeos – por conjugação ou transformação –, em transposões – por conjugação – e em integrões ou bacteriófagos – por transdução), acelerando e intensificando o processo de dispersão de resistência(s) (Giedraitienė, Vitkauskienė, Naginienė & Pavilonis, 2011; EMA EFSA, 2017).

Figura 1 - Mecanismos de antibiorresistência por Gram-negativos (gentilmente cedido por Gullberg, E.).



5. β -lactamases

As bactérias patogénicas de Gram negativo de maior prevalência, como *E. coli*, *S. enterica* e *K. pneumoniae*, são causadoras de uma grande variedade de doenças em humanos e animais. Observa-se uma associação evidente entre a utilização de antibióticos no tratamento dessas doenças e o desenvolvimento de resistências aos compostos usados (Davies & Davies, 2010; Catry *et al.*, 2016). Um exemplo claro desta correlação prende-se com os AB β -lactâmicos e as enzimas que os inactivam: as β -lactamases. Os β -lactâmicos são uma classe de antibióticos que exhibe uma estrutura molecular característica: um centro anelar tetra-membranar β -lactâmico contendo azoto (EFSA BIOHAZ Panel, 2017). O seu modo de acção consiste na inibição metabólica a nível da parede celular, através da ligação do anel às proteínas de ligação da penicilina (PBPs), enzimas (transpeptidases) existentes na membrana celular das quais depende a síntese de peptidoglicano (Seiffert, Salome, Hilty, Perreten & Endimiani, 2013), levando à lise membranar e consequente morte celular (Zeba, 2005). Nas duas últimas décadas, a utilização massiva e indiscriminada destes antibióticos contribuiu para a selecção e disseminação de microrganismos produtores de ESBL (Paterson & Bonomo, 2005; Seiffert *et al.*, 2013; Randall *et al.*, 2014; Horton *et al.*, 2016). As β -lactamases são moléculas enzimáticas produzidas por bactérias de Gram negativo, capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico, conferindo à bactéria resistência a β -lactâmicos específicos (EMA EFSA, 2017). Tais enzimas têm sido dadas como exemplo da evolução acelerada de acordo com o paradigma darwiniano, segundo o qual a pressão selectiva exercida pela presença de um AB favorece a sobrevivência das estirpes melhor adaptadas (por exemplo, as que apresentam resistência ao AB em causa). As β -lactamases constituem o mais importante mecanismo de resistência dos bacilos de Gram negativo. Nestes microrganismos, é comum verificar-se a expressão induzível de β -lactamases cromossomais, por oposição às β -lactamases mediadas por plasmídeos, que revelam uma expressão constitutiva (Cantón, González-Alba & Galán, 2012; EMA EFSA 2017).

Os genes codificadores de β -lactamases (genes *bla*) não são recentes (Barlow & Hall, 2002) e foram encontrados em meios remotos e inóspitos (Allen, Moe, Rodbummer, Gaarder & Handelsman, 2009), existindo independentemente da acção humana e dos efeitos desta através da utilização de AB, o que implica a existência de novas β -lactamases no ambiente. Os genes *bla* são, provavelmente, os que apresentam uma distribuição geográfica mais universal. Mutações aleatórias de genes codificadores de enzimas promoveram a ocorrência de catálise modificada, com um espectro de resistência crescente (Gniadkowski, 2008). Os genes *bla* cromossomais têm uma taxa de expressão baixa, requerendo a presença de um promotor influente a montante – como sequências de inserção (IS) – para ser observado um aumento da CMI e exhibir um fenótipo resistente (Cantón *et al.*, 2012). O aumento da temperatura no lúmen intestinal de um animal ou a presença de AB como CTX ou CAZ são

factores que poderão ter contribuído para a intensificação da mobilização de sequências de inserção e, indirectamente, para o aumento e disseminação de genes *bla* apostos às IS (Lartigue, Poirel, Aubert & Nordmann, 2006; Nordmann, Lartigue & Poirel, 2008). Não serem detectados β -lactâmicos em amostras fecais não significa que estes não estejam presentes no tracto gastrointestinal (TGI), uma vez que as β -lactamases são frequentemente induzidas aquando da exposição das bactérias aos β -lactâmicos (Händel *et al.*, 2013, 2014). Dado o uso abundante e recorrente de β -lactâmicos no tratamento de bovinos, as β -lactamases estão frequentemente presentes na microbiota intestinal dos vitelos. Provavelmente, os β -lactâmicos sofrem lise enzimática no lúmen do TGI, não sendo por isso detectados nas fezes (Berendsen, Wegh, Memelink, Zuidema & Stolker, 2015), embora o sejam os produtos da sua degradação (como, no exemplo das cefalosporinas, ácido cefalospórico).

6. ESBL

Variados grupos e classes de ESBL foram identificados, produzindo mais de 1000 β -lactamases associadas a resistência (Livermore *et al.*, 2007; Queenan & Bush, 2007; Jacoby, 2009; Bush & Jacoby, 2010; Poirel, Naas & Nordmann, 2010). A transmissão genética horizontal em geral, e a mediada por plasmídeos em particular (Norman, Hansen & Sorensen, 2009), desempenharam um papel predominante na evolução e transmissão de resistência a AB β -lactâmicos entre enterobactérias, a nível comunitário como em infecções hospitalares (Davies & Davies, 2010). O microbioma do TGI humano inclui uma vasta gama de genes de resistência antibiótica (Sommer, Dantas & Church, 2009) e as condições verificadas nesse meio, em humanos e em animais, permite a ocorrência de transmissão genética *ad libitum* (Shoemaker, Vlamakis, Hayes & Salyers, 2001).

A classificação das β -lactamases recorre ao esquema de Ambler, contemplando quatro classes moleculares (de A a D), bem como grupos funcionais que consideram, entre outros, o perfil hidrolítico de substrato de cada enzima e a resposta a factores inibitórios (Tabela 1) (Bush & Jacoby, 2010). A localização genética (cromossomal ou plasmídica) já não constitui um factor de diferenciação das β -lactamases, uma vez que a mobilização e integração bidireccionais dos genes entre os compartimentos cromossomal e extracromossomal (plasmídeos ou transposões) têm sido verificadas crescentemente (Bradford, 2001; Toleman, Bennet & Walsh, 2006).

Nas classes A e D incluem-se as de largo espectro (ESBL) – enzimas codificadas principalmente por ADN plasmídico em *Enterobacteriaceae*, encontradas frequentemente em *E. coli* e *K. pneumoniae*, mas também presentes noutros membros desta família. Caracterizadas pelo “fenótipo ESBL”, conferem resistência a uma vasta gama de antibióticos β -lactâmicos (por hidrólise de oxi-imino-cefalosporinas, incluindo penicilinas e cefalosporinas de 2ª, 3ª e 4ª geração) e a monobactâmicos (como aztreonam), mas normalmente não a carbapenemos ou cefamicinas (como cefoxitina) (Philippon, Labia & Jacoby, 1989; Jacoby & Muñoz-Price, 2005; Paterson & Bonomo, 2005; Bush & Fisher, 2011; EFSA BIOHAZ Panel, 2011).

Tabela 1: Classificação de β -lactamases (adaptado de Sidjabat, Kamolvit, Wailan & Paterson, 2013; Ghafourian *et al.*, 2014; Lahey Clinic, 2016).

Classificação de Ambler	Grupo de Bush	Descrição ou Características	Exemplos de enzimas	Bactérias
Classe A	2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e, 2f	Cefalosporinasas (ESBL). Normalmente susceptíveis a ácido clavulânico.	TEM, SHV, CTX-M, GES, VEB	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.
Classe B	3	Carbapenemases. Inibidas por aztreonam, não por ácido clavulânico.		<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
Classe C	1	Resistentes a ácido clavulânico. Intrínsecas a certas bactérias de Gram negativo.	CMY, DHA	<i>Enterobacteriaceae</i>
Classe D	4	Oxacilinasas. Susceptíveis a ácido clavulânico. Carbapenemases.		<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Acinetobacter</i> spp.

7. CTX-M

O maior número de variantes de ESBL da classe A (que engloba as enzimas TEM, SHV, CTX-M, VEB e GES) pertence à família das CTX-M (Lahey Clinic, 2016), cuja disseminação generalizada e epidemiologicamente instantânea mereceu a designação de “pandemia CTX-M” (Cantón & Coque, 2006).

A primeira descrição de uma CTX-M refere-se a 1989 (Bauernfeind, Grimm & Schweighart, 1990; Bauernfeind *et al.*, 1992) e foi na primeira década do século XXI que esta família ganhou hegemonia sobre as restantes ESBL, por apresentar uma evolução acelerada, uma dispersão generalizada (Cantón *et al.*, 2008) e ser observada em meio hospitalar e comunitário, ao ser veiculada pela ubiquidade de *E. coli*, seu principal produtor (Cantón & Coque, 2006; Coque *et al.*, 2008).

A família CTX-M é um grupo de enzimas heterogéneo. A primeira sequenciação de aminoácidos de diferentes variantes de CTX-M permitiu classificar as enzimas em cinco grupos (Bonnet, 2004), tendo sido posteriormente acrescentados dois grupos (Rossolini, D’Andrea & Mugnaioli, 2008). Provavelmente, teve origem pela incorporação de genes *bla* cromossomais de *Kluyvera* spp. em elementos móveis (como plasmídeos), como sugere a análise filogenética, e não por mutações de enzimas já previamente mediadas por plasmídeos (Cantón *et al.*, 2008).

Até 2010, no intervalo de apenas uma década, as enzimas da família CTX-M sobrepuseram-se às restantes ESBL nas Enterobacteriaceae, incluindo as variantes TEM e SHV (Cantón *et al.*, 2008; Coque, Baquero & Cantón, 2008; Angel Díaz *et al.*, 2009; Hawkey & Jones, 2009; Bush & Jacoby, 2010; Rodriguez-Villalobos *et al.*, 2011). Tal acontecimento pode ter-se devido à disseminação dos genes incorporados em elementos genéticos móveis e à inclusão das mesmas em microrganismos com multiplicação rápida e intensa (Cantón & Coque, 2006; Rogers, Sidjabat & Paterson, 2011; Woodford *et al.*, 2011). Outro factor adjuvante reside no processo de co-selecção dos mesmos organismos, através da co-resistência de produtores de CTX-M a aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (Morosini *et al.*, 2006; Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2011; EMA, 2016; EMA EFSA, 2017).

As enzimas CTX-M são universais, transversais a humanos, animais e ambiente em todo o mundo (Cantón *et al.*, 2008, Hawkey & Jones, 2009; Hiroi *et al.*, 2012; Bal *et al.*, 2016).

Podem distinguir-se três períodos fundamentais na história evolutiva das CTX-M: (i) surgimento de diferentes β -lactamases CTX-M em regiões geográficas distantes, até meados da década de '90; (ii) emergência das variantes de CTX-M com maior grau de expansão (incluindo CTX-M-3, -9, -14 e -15), entre 1994 e 2000; e (iii) dispersão universal e globalização destas β -lactamases, a partir de 2000 (Cantón *et al.*, 2012).

Em 1986, previamente à primeira descrição de CTX-M, foi isolada uma estirpe de *E. coli* resistente à CTX, a partir de uma amostra fecal proveniente de um cão utilizado em estudos

de farmacocinética de β -lactâmicos, no Japão (Matsumoto, Ikeda, Kamimura, Yokota & Mine, 1988). Foi designada FEC-1 (“Fecal *E. coli*”), sendo depois estudado o seu relacionamento com a enzima CTX-M-3, descoberta na Polónia (Bonnet, 2004). Três anos depois, uma estirpe de *E. coli* com um fenótipo semelhante foi isolada de um paciente italiano, em França. A enzima foi denominada MEN-1 (designação do paciente de quem proveio) e foi a primeira β -lactamase sequenciada (Barthélémy, Peduzzi, Bernard, Tancrede & Labia, 1992).

A primeira referência a uma CTX-M foi publicada em 1990, em Munique, quando Bauernfeind e colaboradores (1990) isolam uma *E. coli* resistente a cefotaxima e sensível a ceftazidima, de uma otite média de uma criança de quatro meses. Dado o fenótipo particular desta ESBL, a enzima foi nomeada CTX-M-1 (sendo CTX o acrónimo de cefotaxima e M referente a Munique). Deu-se a inauguração de um grupo de enzimas designadas cefotaximases, pelo fenótipo que exibiam e pelo seu perfil hidrolítico (Bonnet, 2004).

Na América do Sul, enzimas obtidas de *Salmonella typhimurium* que exibiam um padrão de cefotaximase mas tinham um ponto isoeléctrico diferente de CTX-M-1 foram designadas CTX-M-2 (Bauernfeind *et al.*, 1992; Bauernfeind, Stemplinger, Jungwirth, Ernst & Casellas, 1996). Em 1993, no Japão, foi isolada uma estirpe de *E. coli* resistente a cefotaxima a partir de uma cistite de uma criança de um ano de idade. A enzima foi nomeada Toho-1 (referente à Universidade de Medicina de Toho, Hospital Omori, Tóquio) (Ishii *et al.*, 1995). Passados três anos, Toho-2 (também de uma estirpe de *E. coli* resistente a cefotaxima) foi obtida a partir de urina de um paciente de 69 anos com diagnóstico de cancro do cólon (Ma, Ishii, Ishiguro, Matsuzawa & Yamaguchi, 1998). Mais tarde, Toho-1 e Toho-2 foram sequenciadas e passaram a designar-se CTX-M-44 e -45, respectivamente (Lahey Clinic, 2016).

A sequenciação de CTX-M-1 e -2, em 1996, revelou a igualdade entre CTX-M-1 e MEN-1 (Bauernfeind *et al.*, 1996).

As relações de clonalidade dos primeiros isolados produtores de CTX-M e a caracterização plasmídica não foram realizadas, tornando impossível traçar a emergência e disseminação das primeiras ESBL desta família. Estudos epidemiológicos, como a caracterização molecular, eram inexistentes em áreas como o sudeste asiático, no final dos anos '80. Tais informações teriam sido cruciais para um conhecimento mais aprofundado e uma melhor compreensão da epidemiologia actual, bem como para a contextualização dos registos da disseminação descrita em 1994 de CTX-M importantes (Cantón *et al.*, 2012).

Durante a década de '90, registos de CTX-M temporalmente coincidentes mas distanciados geograficamente sugerem emergência independente da(s) enzima(s) e/ou a sua rápida disseminação (Cantón *et al.*, 2012). A diversificação de CTX-M-1 está patente no crescente número de variantes descritas ao longo dessa década. CTX-M-10 foi descrita na região mediterrânea (Espanha e França: Oliver, Pérez-Díaz, Coque, Baquero & Cantón, 2001; Leavitt *et al.*, 2009), enquanto CTX-M-15, inicialmente identificada em amostras entéricas de pacientes de um hospital de Nova Deli (Índia) (Karim, Poirel, Nagarajan & Nordmann, 2001),

agora encontra-se disseminada globalmente (Hawkey & Jones, 2009; Rogers *et al.*, 2011). Ambas deverão provir de um ancestral comum (Novais *et al.*, 2010). Durante 1994, CTX-M-9 tornou-se uma das ESBL mais prevalente em Espanha (Cantón *et al.*, 2012), emergiu na Coreia em 1995 (Pai, Choi, Lee, Hong & Jacoby, 2001) e rapidamente se disseminou generalizadamente. Foi detectada na China em 1997-98 (Chanawong, M'Zali, Heritage, Lulitanond & Hawkey, 2002), em Taiwan em 1998-99 (Yu *et al.*, 2002), em França em 1999 (Dutour *et al.*, 2002) e no Brasil em 1999 (Bonnet, 2004).

Factores como a imigração e a mobilidade internacional e transcontinental de pessoas, animais e bens contribuem para a rápida emergência e disseminação de enzimas CTX-M, cuja presença em animais e, sobretudo, em alimentos não processados de origem animal permite traçar potenciais rotas de disseminação (Matsumoto *et al.*, 2007; Warren *et al.*, 2008; Dhanji *et al.*, 2010). A globalização destas enzimas está patente na sua presença em animais de produção, de companhia e espécies selvagens (Bonnedahl *et al.*, 2010; Literak *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2012), bem como no meio ambiente (Chen *et al.*, 2010; Dhanji *et al.*, 2011).

A análise filogenética de todas as β -lactamases CTX-M descritas levou ao seu agrupamento em cinco grupos principais. Cada grupo deriva de genes *bla* de uma *Kluyvera* sp. diferente. Este microrganismo, considerado saprófita e patogénico oportunista, pertence à microbiota intestinal humana e pode ser encontrado no meio ambiente (vivendo independentemente em água, solo, esgotos e alimentos de origem animal) (Farmer *et al.*, 1981). As variantes CTX-M-1, -2, -8 e -9 derivaram dos genes cromossomais *kluC*, de *Kluyvera cryocrescens* (Decousser, Poirel & Nordmann, 2001), *kluA*, de *K. ascorbata* (Humeniuk *et al.*, 2002), *kluG* (Poirel, Gniadkowski & Nordmann, 2002) e *kluY* (Olson *et al.*, 2005), de *K. georgiana*, respectivamente. É, no entanto, possível relacionar a mesma variante com espécies diferentes de *Kluyvera*, do que é exemplo a relação de CTX-M-1 com *K. ascorbata* e *K. cryocrescens* (Decousser *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2004).

Como anteriormente referido, a capacidade de hidrólise de CAZ das primeiras CTX-M identificadas era muito baixa ou nula. Contudo, em 2012 já mais de 60% das variantes revelavam um perfil hidrolítico duplo para CTX e CAZ, levando à consideração de CTX poder tratar-se de uma das principais fontes de pressão selectiva que contribui para a diversificação da família CTX-M (Cantón *et al.*, 2012). Os genes mobilizados originalmente afectavam a CTX em maior grau do que a CAZ. A divergência por mutações pontuais incentivada por pressão selectiva induzida por AB, posterior à incorporação dos genes em elementos móveis, conferiu às enzimas a capacidade de hidrolisar CAZ, dando origem a novas variantes (Bonnet, 2004; Poirel, Naas & Nordman, 2008; Andersson & Hughes, 2014; Händel *et al.*, 2013, 2014, 2015; EMA EFSA, 2017). A presença simultânea de CTX e CAZ num determinado meio promoveu a evolução tendenciosa de CTX-M para uma diversidade crescente (ECDC/EFSA/EMA/SCENIHR, 2009; Novais *et al.*, 2010). Dado ser frequente encontrar-se

diferentes variantes de CTX-M na mesma bactéria, torna-se expectável que outras enzimas recombinantes surjam no futuro (Cantón *et al.*, 2012).

Djamdjian e colaboradores (2011) compararam o perfil hidrolítico de uma nova variante (CTX-M-93) com o da variante que lhe deu origem (CTX-M-27). Mesmo diferindo em apenas uma mutação – L169Q –, a nova variante apresentava um menor grau de hidrólise de CTX mas uma acção hidrolítica mais intensa de CAZ, levando os investigadores a concluir que mutações localizadas na posição 169 conferem um aumento da capacidade de hidrólise de CAZ.

Alguns elementos genéticos móveis contendo genes *bla* CTX-M também contêm genes que codificam para outros mecanismos de resistência, como os que codificam β -lactamases AmpC e carbapenemases, quinolonas mediadas por plasmídeos ou metilases que afectam aminoglicosídeos. Tais emparelhamentos poderão acentuar a vantagem da manutenção de *bla* CTX-M através de processos de co-selecção (ECDC/EFSA/EMA/SCENIHR, 2009; Cantón *et al.*, 2012; EMA EFSA, 2017). A sequência de inserção (IS, ver abaixo) mais frequentemente encontrada a montante de diferentes genes *bla* CTX-M designa-se ISEsc1. Foi primeiramente descrita em 1999, associada a *bla* CTX-M-15, mas o seu registo foi posteriormente alargado a todas as variantes de CTX-M, excepto CTX-M-8 (Cantón *et al.*, 2012).

A importância dos plasmídeos na disseminação dos genes *bla* CTX-M está patente no estudo epidemiológico de certas β -lactamases CTX-M e foi expressa em numerosas publicações (Carattoli, 2009). Alguns plasmídeos podem ter microbiota comensal, oportunista e/ou patogénica de animais como reservatório, visto terem sido identificados em *Salmonella* spp. e *E. coli* isoladas a partir de animais de produção (Carattoli, 2011; Looft *et al.*, 2012). Há variantes de CTX-M obtidas *in vitro* sob pressão selectiva exercida por AB que ainda não foram encontradas em isolados clínicos (Novais *et al.*, 2008; Ripoll *et al.*, 2011).

Os “clones de alto risco” que expressem enzimas CTX-M são mais favoráveis à aquisição de outros mecanismos de resistência, como os que afectam aminoglicosídeos, trimetoprim-sulfametoxazole e fosfomicina. A resistência a aminoglicosídeos ocorre essencialmente por dois mecanismos: alteração enzimática e metilases (Mushtaq *et al.*, 2011). Por outro lado, a multiplicidade de mecanismos da resistência à fosfomicina foi descrita no meio comunitário de países com uma utilização crescente deste antibiótico (Oteo *et al.*, 2009). Os “clones de alto risco” de *E. coli* associados a CTX-M são altamente virulentos, facilmente transmissíveis entre membros da família de pacientes infectados (Mihaila *et al.*, 2010) e foram encontrados em animais selvagens, de companhia e de produção (Mora *et al.*, 2010; Platell, Johnson, Cobbold & Trott, 2011).

8. Leite de Desperdício

Dado o potencial da presença de AB desencadear a emergência de antibiorresistências, foi considerado um cenário que a favorecesse. O estudo previu a observação no terreno de uma situação de exposição de microbiota – do TGI de vitelos – a diversos AB, em concentrações diferentes (e, neste caso, desconhecidas), objectivando verificar se tal exposição era inconsequente no que respeita a ocorrência de antibiorresistências.

Há três causas possíveis para o aumento de microbiota fecal antibiorresistente: (i) bactérias previamente resistentes veiculadas pelo alimento; (ii) resíduos AB que provocam selecção de estirpes resistentes na microbiota do TGI do vitelo; e (iii) resíduos AB que levam ao desenvolvimento de novo de antibiorresistência de baixo nível pela regulação diferencial de sobre-expressão genética e selecção de mutações pontuais espontâneas.

Leite de desperdício (LD) é uma designação primeiramente usada por Chik e colaboradores (1975) para a fracção de leite produzido que não é comercializável, ou seja, que não pode ser destinada ao consumo humano. Para este subproduto contribuem (i) colostro e leite de transição (das primeiras seis ordenhas pós-parto ou até três dias pós-parto); (ii) leite proveniente de vacas mastíticas, em terapia ou dentro do intervalo de segurança; (iii) leite com contagem de células somáticas demasiado elevada (ou considerado inapto pelo produtor) (Godden, 2007; Moore, Taylor, Hartman & Sisco, 2009; Aust *et al.*, 2013; Jorgensen & Hoffman, 2015; EFSA BIOHAZ Panel, 2017).

Quantitativamente, estima-se que o LD de uma exploração seja suficiente para alimentar a totalidade dos vitelos até ao desmame (Kesler *et al.*, 1981; Schaeren, 2006; Statistisches Bundesamt, 2008). Por não estar abrangido pelo regulamento de eliminação de resíduos de origem animal (Regulamento Animal By-Products (CE) n.º 1069/2009) na União Europeia, cujo Artigo 2(2)(e) exclui o leite, colostro e produtos derivados obtidos, mantidos, descartados ou usados na exploração de origem), a utilização do LD na exploração de origem apenas depende do critério e da consideração do produtor. Dada a premência do assunto, a Comissão Europeia (CE) pediu uma avaliação pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) relativamente ao risco de emergência e disseminação de bactérias antibiorresistentes derivadas da alimentação de vitelos com colostro potencialmente contendo resíduos antibióticos e com leite proveniente de vacas em antibioterapia durante a lactação (EFSA BIOHAZ Panel, 2017).

As vacas leiteiras, lactantes ou não, são sujeitas a antibioterapia por diversos motivos. A maioria dos tratamentos são associados não apenas a mastites, mas também a infecções do tracto genital, respiratório e do aparelho locomotor (por exemplo, afecções podais) (Kreusikon, 2011; Växa Sverige, 2014; Kuipers, Koops & Wemmenhove, 2016; Stevens, Piepers, Supre, Dewulf & De Vlieghe, 2016). Atendendo à elevada frequência de antibioterapia em vacas leiteiras, tanto no período de secagem como durante a lactação, a

quantidade de leite com potencial de conter resíduos AB é abundante (EFSA BIOHAZ Panel, 2017).

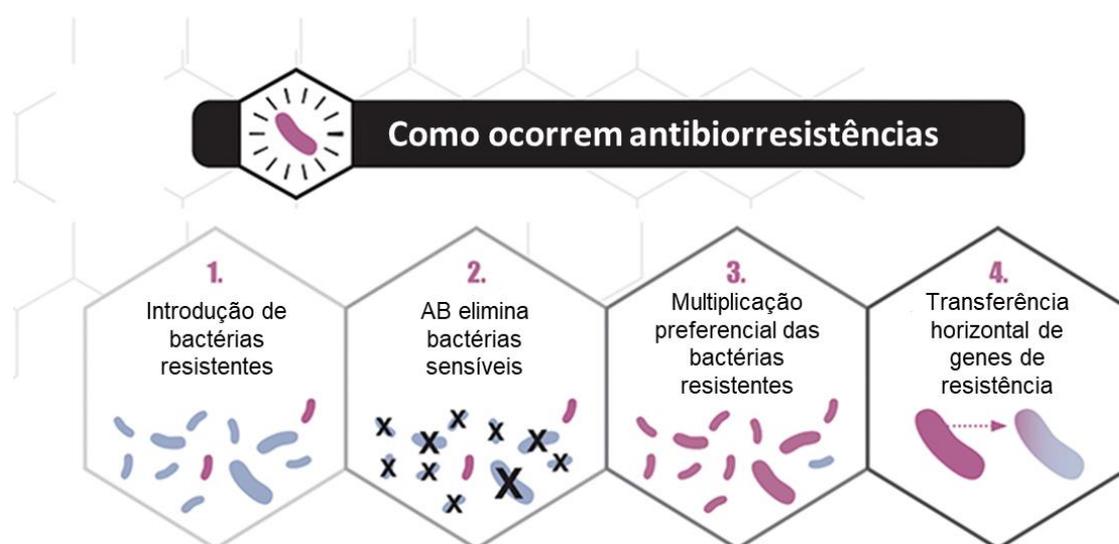
A flutuação diária dos parâmetros nutricionais e bioquímicos do LD é inversamente proporcional à dimensão da exploração, dependendo do número de vacas que produzem LD, da sua fase de lactação, da proporção de vacas mastíticas (Hagnestam, Emanuelson & Berglund, 2007; Jones & Bailey, 2009) e da diluição inadvertida do LD pelo produtor (Jorgensen, Hoffman & Nytes, 2006). Já foi demonstrado que a utilização de LD pasteurizado na alimentação de vitelos em detrimento de leite de substituição se traduz em melhores desempenhos de saúde e crescimento (Jamaluddin, Carpenter, Hird & Thurmond, 1996; Davies & Drackley, 1998; Godden, Fetrow, Feitrag, Green & Wells, 2005; Kehoe, Jayarao & Heinrichs, 2007; Aust *et al.*, 2013; Connely *et al.*, 2014; Jorgensen & Hoffman, 2015; Horton *et al.*, 2015), bem como num maior retorno económico por aumento da margem de lucro (Elizondo-Salazar, Heinrichs & Gelsinger, 2013; Rollin, Dhuyvetter & Overton, 2015). Burton e colaboradores (2014) avaliaram o peso de vitelos alimentados com LD às 4, 7 e 13 semanas pós-parto, verificando uma superioridade significativa em comparação com o crescimento do grupo controlo.

Uma preocupação inerente à alimentação de vitelos com LD é a potencial disseminação de agentes patogénicos existentes no mesmo. A sua transmissão pode evidenciar-se pela contaminação directa (por exemplo, pela colonização de tecido linfático como as tonsilas) ou indirecta (colonização da glândula mamária, a partir das tonsilas de vitelos infectados, por *intersuckling*) dos vitelos (Barto *et al.*, 1982; Aust *et al.*, 2013). Uma medida de controlo epidemiológico da contaminação indirecta é o acondicionamento individual dos vitelos durante a fase de lactação, prevenindo a ocorrência de *intersuckling*.

Mesmo conseguindo uma redução substancial da carga bacteriana por processamento térmico (por exemplo, pasteurização) ou tratamento por radiação ultra-violeta (UV) do LD, os níveis de toxinas, esporos, vírus, protozoários e resíduos antimicrobianos não apresentam uma diminuição significativa entre LD pré- e pós-tratamento (Hauke, 1968; Nasrabadi, 1975; Rubino & Donham, 1984; Yingprayoon, 1989; Godden *et al.*, 2006; Jorgensen *et al.*, 2006; American Feed Industry Association [AFIA], 2008; Moore *et al.*, 2009; EFSA BIOHAZ Panel, 2017). As opções de processamento do LD para a eliminação de bactérias antibiorresistentes são maioritariamente tratamentos térmicos. Protocolos otimizados de combinações temperatura/tempo eliminam a carga bacteriana (incluindo a antibiorresistente). As opções de processamento não-térmico (como microfiltração ou centrifugação) são menos eficazes e não aplicáveis a nível de exploração (EFSA BIOHAZ Panel, 2017). Mesmo os AB mais termo-sensíveis (os β -lactâmicos) apresentam termo-estabilidade suficiente (por exemplo, em combinações temperatura/tempo de 140°C/10s e 60°C/30min) para inviabilizar o processamento térmico para eliminação de resíduos AB do LD, a nível da exploração (EFSA BIOHAZ Panel, 2017). Dada a manutenção das concentrações de antimicrobianos (sejam ou

não β -lactâmicos) (Jorgensen *et al.*, 2006), persiste a capacidade de criação de um ambiente de pressão selectiva por um esquema darwiniano simples, seguindo três passos com relação causa-efeito sequencial: (i) ingestão de antimicrobiano(s) pelo vitelo; (ii) morte da microbiota sensível ao(s) antimicrobiano(s) ingerido(s) e sobrevivência da microbiota resistente; (iii) proliferação generalizada da microbiota resistente, tornando-se dominante por perda de competidores pelo meio, podendo transferir horizontalmente os genes que conferem resistência (Figura 2) (Witte, 2000; Kolář, Urbaánek & Látal, 2001; Sefton, 2002; Harbarth & Samore, 2005; Tenover, 2006; Alekshun & Levy, 2007; AFIA, 2008; Davies & Davies, 2010; Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2015; OMS, 2016; EFSA BIOHAZ Panel, 2017).

Figura 2 – Esquematização de ocorrência de antibiorresistências (adaptado de Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2015).



No processamento do LD para destruição dos resíduos AB prévio à administração do mesmo leite aos vitelos, a maioria das abordagens foca-se na redução dos β -lactâmicos (penicilinas ou cefalosporinas), os AB mais facilmente degradáveis e usados com maior frequência em vacas lactantes. A sua degradação por incubação com β -lactamases específicas pode reduzi-los a níveis inferiores ao limite mínimo de detecção. A principal desvantagem desta técnica é o aumento da carga microbiana, aliada à compreensão ainda limitada dos mecanismos de acção. A combinação de ultra-filtragem, lavagens permeáveis e oxidação electroquímica tem potencial para reduzir uma gama alargada de AB do LD, mas não é facilmente aplicável a nível da exploração. Elevar o pH do LD para valores próximos de 10 pode reduzir eficazmente a concentração de determinados AB (como cefquinoma) (Sunkara, Navarre & Kompella, 1999). A eficácia em reduzir uma gama mais vasta de AB e os efeitos nos vitelos do LD

processado precisam de ser estudados com maiores rigor e minúcia (EFSA BIOHAZ Panel, 2017).

No desenvolvimento e disseminação de antibiorresistências, a transmissão devida à presença de bactérias resistentes no leite é considerada menos importante do que a causada por resíduos AB administrados ao vitelo via LD (EFSA BIOHAZ Panel, 2017). Ao investigar o efeito da pasteurização do LD na microbiota fecal dos vitelos, Aust e colaboradores (2013) não verificaram uma relação entre a população de *E. coli* fecal antibiorresistente e o processamento térmico do LD, mas constataram o aumento da sua proporção em relação à presença de resíduos AB.

O nível de resíduos AB no LD depende de vários factores, incluindo o tipo de fármaco, a dosagem, a via de administração e o intervalo entre a administração e a ordenha. Dado que a indicação de antibioterapia em vacas leiteiras deriva maioritariamente de infecções da glândula mamária, uma grande proporção de tratamentos é de administração local, com aplicação intramamária. O tratamento e a prevenção locais de mastites durante o período de secagem são práticas comuns na UE, por aplicação intramamária de penicilinas, aminoglicosídeos ou cefalosporinas de 1ª ou 2ª geração. Nalguns EM recorre-se com frequência a cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (EFSA BIOHAZ Panel, 2017).

Alimentar vitelos com LD de vacas que foram tratadas com AB no início do período de secagem é uma prática comum na maioria das explorações leiteiras, na UE. A maioria das explorações exerce um período seco de 4 a 8 semanas (Bertulat, Fisher-Tenhagen & Hauwieser, 2015). Vitelos alimentados com LD de vacas tratadas no início do período de secagem não apresentaram um aumento da resistência da microbiota fecal, contrariamente aos alimentados com LD de vacas em tratamento durante a lactação (Duse *et al.*, 2013). O leite de vacas tratadas com AB no início do período de secagem que parem prematuramente, bem como o das que se encontram em antibioterapia durante a lactação ou que estejam no intervalo de segurança de uma antibioterapia recente, não deve ser usado na alimentação de vitelos. O consumo desse leite leva ao aumento da probabilidade de disseminação fecal de microbiota resistente pelo vitelo. Esta conclusão é baseada em estudos experimentais e observacionais (EFSA BIOHAZ Panel, 2017). Por exemplo, em relação a um grupo controlo negativo, vitelos alimentados com leite contendo cefquinoma apresentam em maior quantidade e durante mais tempo *E. coli* fecal com o gene de resistência ESBL CTX-M (Brunton, Reeves, Snow & Jones, 2014).

A exposição bacteriana a níveis sub-letais de AB induz um aumento da taxa de incorporação de elementos genéticos móveis (como transposões, profagos, bacteriófagos ou plasmídeos, por exemplo) (López & Blázquez, 2009; Baharoglu & Mazel, 2014; Bearson & Brunelle, 2015; Händel, Hoeksema, Freijo Mata, Brul & ter Kuile, 2016). Tal constatação pode explicar a retenção de *E. coli* com o gene ESBL CTX-M em vitelos alimentados com LD (Brunton *et al.*, 2014). Uma minoria da população mutante combina baixos custos metabólicos com o

aumento da tolerância ao AB, levando à sua posterior selecção na presença de AB em concentrações baixas (Martinez *et al.*, 2009). Os custos metabólicos associados à manutenção de plasmídeos contendo genes de resistência ou de outras formas de antibiorresistência são comparativamente baixos (Händel *et al.*, 2013, 2015). Mesmo após remoção do AB, a disseminação continua a ocorrer por algum tempo (Brunton *et al.*, 2014). Vários estudos apontam para o efeito da alimentação de LD com resíduos AB na quantidade de *E. coli* fecal antibiorresistente de vitelos às 2 a 3 semanas de vida (Aust *et al.*, 2013; Brunton *et al.*, 2014; Van Vleck Pereira, Siler, Bicalho & Warnick, 2014). Foi observada uma redução de *E. coli* fecal antibiorresistente na 7ª semana de vida (Aust *et al.*, 2013). A população de *E. coli* fecal resistente continuou decrescente após o desmame, sem diferenças significativas entre os grupos tratado e controlo às 12 semanas (6 semanas pós-desmame) (Brunton *et al.*, 2014).

O colostro é essencial à saúde do vitelo neonato. Os vitelos nascem praticamente agamaglobulinémicos (Godden, 2008). Até desenvolverem as suas próprias defesas pela exposição à microbiota do meio envolvente, dependem inteiramente da imunidade passiva adquirida pelo consumo de colostro (Moran, 2016). Ao nascimento, o TGI do vitelo contém uma microbiota limitada (praticamente inexistente) em variedade e número. A colonização pós-parto a partir do ambiente ocorre rapidamente. Ao alimentar-se, durante os primeiros dias, o mecanismo de goteira esofágica permite que a maior parte do leite passe directamente para o abomaso, maximizando a eficácia da digestão e da absorção de nutrientes (Church, 1988; Davis & Drackley, 1998). O estabelecimento da microbiota ruminal nos primeiros dias de vida é essencial para o crescimento e bem-estar do vitelo. Esta tem potenciais efeitos na subsequente microbiota ruminal em adulto, condicionando a saúde e a produtividade futuras (Yáñez-Ruiz, Abecia & Newbold, 2015). A dieta é um dos factores mais influentes na composição da microbiota intestinal, desempenhando inclusivamente um papel central nas alterações do microbioma ruminal de vitelos neonatos (Malmuthuge, Chen, Liang, Goonewardene & le Guan, 2015).

Entre outros agentes, *E. coli* foi isolada de amostras de leite provenientes de vacas com mastites clínicas e em antibioterapia em 8 países europeus, pelo programa de monitorização VetPath. Outro estudo contemplou a análise de 103 amostras de LD provenientes de diferentes explorações, das quais 5,8% revelaram presença de Enterobacteriaceae produtoras de ESBL (incluindo 3,9% de *E. coli* produtora de CTX-M) (Randall *et al.*, 2014). No mesmo âmbito, o relatório de Gonggrijp e colaboradores (2015) é limitado na medida em que apenas a terapêutica com cloxacilina e a população de *E. coli* produtora de ESBL/AmpC foram testadas, sendo que a cloxacilina não selecciona para Enterobacteriaceae produtoras de ESBL/AmpC.

É provável que o conjunto de resíduos de AB potencialmente presentes no LD propiciem um ambiente de pressão selectiva para isolados resistentes, tais como produtores de ESBL

(Horton *et al.*, 2016), ou mesmo isolados resistentes à colistina (Brennan *et al.*, 2016) e co-resistentes a outros AB. Torna-se assumível que alimentar vitelos com LD contaminado com bactérias antibiorresistentes (patogênicas ou comensais) ou com genes de resistência seja uma potencial via para o aumento da proporção de microbiota resistente no TGI do vitelo. Um estudo recente mostrou que, numa exploração onde os vitelos eram alimentados com LD, a maioria desses vitelos apresentava análises fecais com mais de 10^4 UFC/g de *E. coli* presumivelmente produtoras de ESBL do grupo CTX-M, onde a maioria da população adulta era positiva para *E. coli* produtora de CTX-M (Horton *et al.*, 2016).

A utilização de ceftiofur em bovinos de leite levou ao aumento de resistência aos β -lactâmicos e de multirresistências (Caudle, 2014). Concordantemente, verificou-se um aumento de microbiota fecal com genes de resistência a β -lactâmicos em vacas tratadas com ceftiofur, relativamente a vacas não tratadas (Chambers *et al.*, 2015).

IV. Objectivos

Este estudo pretende averiguar a relação causal entre a prática de manejo de alimentar vitelos com leite de desperdício e a ocorrência de antibiorresistência por *Escherichia coli* produtora de β -lactamases de largo espectro. A análise será contextualizada e contempla a eventual adição de antibiótico ao leite previamente à administração do mesmo, bem como o número de fármacos integrantes no protocolo de antibioterapia utilizado no tratamento de mastites em cada exploração.

V. Materiais e Métodos

1. Caracterização da colecção bacteriana em estudo

A colecção bacteriana utilizada neste estudo proveio do trabalho realizado por Rebelo (2014), sendo constituída por 156 isolados identificados presuntivamente como *E. coli* pela galeria IMViC (Indole, Methyl red, Voges-Proskauer, Citrate tests) (Jalhan, Jindal, Gupta & Hemraj, 2013).

Cada amostra fecal (n=156) foi obtida por recolha directa da ampola rectal de 5±1 vitelos não desmamados da raça Holstein-Frísia, saudáveis, de ambos os sexos, pertencentes a um conjunto de 32 explorações representativas das regiões Centro Litoral, Ribatejo e Alto Alentejo, colhidas entre 26 de Setembro de 2013 e 10 de Março de 2014. Destas, seleccionaram-se isoladamente cinco colónias da família Enterobacteriaceae resultantes da inoculação de cada amostra em meio sólido, selectivo e diferencial MacConkey Agar (MKA).

2. Confirmação de Pureza

Cada isolado foi inoculado em meio sólido – Agar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro (COS) (43041 Biomérieux, Marcy l’Etoile, França) – e incubado a 37°C durante 24h, de forma a avaliar a pureza da cultura pela existência de apenas um tipo morfológico de colónias.

3. Confirmação Genotípica de Espécie

3.1. Extracção de Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

O ADN total de cada isolado foi extraído pela técnica de fervura, permitindo a obtenção de ADN de natureza cromossómica e plasmídica (Féria, Macado, Correia, Gonçalves & Gaastra, 2001).

A partir de culturas com 24h, inoculou-se uma colónia em 5 ml de meio líquido Brain Heart Infusion broth (BH1b) e foi realizada uma incubação a 37°C durante 18h, com agitação de 180rpm (Shel Lab SI series, Sheldon Mfg. Inc.). Após homogenização do inóculo, foram pipetados 1,8ml de solução para um microtubo de 2ml e centrifugados a 15.000rpm durante 10min (Heraeus Fresco 21, Thermo Scientific). Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspenso em 100µl de água desionizada estéril. A suspensão foi submetida a fervura (100°C, 15min) em banho seco (Grant QBD2), sendo depois arrefecida em gelo durante 1min e, posteriormente, centrifugada a 15.000rpm durante 10min (Heraeus Fresco 21, Thermo Scientific). O sobrenadante foi distribuído em alíquotas de 20µl e armazenadas a -20°C.

3.2. Amplificação do Gene 16S rARN

A identificação dos isolados a nível da espécie foi realizada através da amplificação do gene 16S do ARN ribossomal (rARN) através de uma reacção em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (primers) indicados na tabela 2 (Kruger *et al.*, 1998; Tivendale, 2000; Shahid *et al.*, 2014).

A reacção de PCR foi realizada num volume final de 25µl, contendo 2µl de cada primer (10µM), 4,5µl de NZYTaq 2x Green Master Mix, 0,5µl de MgCl₂ (50mM) (NZYTech), 1µl de ADN e 15µl de água estéril desionizada. A reacção de amplificação foi efectuada no aparelho VWR® Thermocycler Doppler (ref 732-2551) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C (3min); 30 ciclos de 94°C (1min), 55°C (1min) e 72°C (1min); extensão final a 72°C (10min). Os produtos foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1,5% (NZYTech Agarose MB02703) em tampão Tris-acetate-EDTA (TAE) 1x, na presença de GelRED (0,5x) (Biotium©41003) e corrente com diferença de potencial de 85V. A observação do gel foi realizada sob transiluminação UV (Chemidoc XRS+ Bio-Rad®Molecular Imager) e teve por referência de pesos moleculares o marcador Ladder V (NZYTech®).

4. Avaliação de Produção de ESBL

4.1. Determinação fenotípica da produção de ESBL

4.1.1. Triagem inicial por Teste de Sensibilidade Antimicrobiana a Cefotaxima e Ceftazidima

Os isolados confirmados genotipicamente como *E. coli* foram sujeitos a um Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA) pelo método Kirby-Bauer. A partir de uma cultura com 24h, foi realizada uma suspensão em 4ml de solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, até atingir a turvação de 0,5 na escala de McFarland ($\approx 1-2 \times 10^8$ UFC/ml). A suspensão foi inoculada em placa de meio sólido – Müller-Hinton Agar (MHA) (Condal, Madrid, Espanha) – de forma a obter crescimento confluyente. Posteriormente, foram colocados discos (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) dos antimicrobianos cefotaxima (CTX, 30µg) e ceftazidima (CAZ, 30µg) sobre o tapete bacteriano, seguindo-se de incubação a 37°C durante 24h. Os resultados foram interpretados pelo critério documentado em VET01-S2, vol. 33, do Clinical & Laboratory Standards Institute [CLSI] (2008).

4.1.2. Confirmação de produção de ESBL por TSA com adição de Clavulanato de Potássio

Os isolados resistentes a CTX e/ou CAZ foram sujeitos a um segundo protocolo de TSA para confirmação fenotípica de produção de ESBL (VET01-S2, volume 31, 2008). A partir de uma cultura com 24h, foi realizada uma suspensão em 4ml de solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, até atingir a turvação de 0,5 na escala de McFarland. A solução foi inoculada em placa de meio sólido – Müller-Hinton Agar (MHA) (Condal, Madrid, Espanha) – de forma a obter crescimento confluyente. Trinta minutos previamente à colocação dos discos CTX 30µg e CAZ 30µg, cada um foi impregnado com 10µl de uma solução de clavulanato de potássio (Sigma-Aldrich®) a 1mg/ml, reconstituído em “Phosphate Buffered Saline” (PBS) (pH 6, a 0,1M). Após 24h de incubação a 37°C, os resultados foram interpretados pelo critério documentado em VET01-S2, vol. 33, do CLSI (2008). O ácido clavulânico é um inibidor das β-lactamases, sendo esperada a perda de resistência a CTX e/ou CAZ dos isolados

produtores de ESBL. O resultado indicativo de produção de ESBL consiste no aumento diametral do halo de inibição igual ou superior a 5mm, relativamente ao TSA sem a adição de ácido clavulânico.

4.2 Determinação genotípica da produção de ESBL

4.2.1 PCR convencional para os genes *bla*CTX-M e *bla*CMY-2

Todos os isolados foram submetidos a PCR para amplificação de genes codificadores de ESBL. O teste foi individualizado para cada gene, sendo usados os pares de primers indicados na tabela 2 (Kruger *et al.*, 1998; Tivendale, 2000; Shahid *et al.*, 2014). O volume final de 50µl conteve 2µl de cada primer (10µM), com excepção do gene *bla*CTX-M-8, para o qual foram usados 4µl de cada primer (10µM); 0,25µl de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega); 10µl de Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega); 1µl de DNTPs (10mM); 2 µl de MgCl₂ Solution (25mM) (Promega) e 1µl de ADN. As reacções de amplificação foram efectuadas no aparelho VWR® Thermocycler Doppler (ref 732-2551), em condições distintas para os grupos CTX-M e CMY-2. O primeiro grupo foi sujeito a desnaturação inicial a 94°C (7min); 35 ciclos de 94°C (50s), 50°C (40s) e 72°C (2min); extensão final a 72°C (5min). Para o segundo grupo, a desnaturação inicial a 94°C foi de 3min; 35 ciclos de 94°C (1min), 55°C (1min) e 72°C (1min); a extensão final a 72°C foi de 7min. Os produtos foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1,5% (NZYTech Agarose MB02703) em Tris-acetate-EDTA (TAE) 1x, na presença de Brometo de Etídeo (solução aquosa a 1%) (Merck©111608) e corrente com diferença de potencial de 85V. A observação sob transiluminação UV do gel foi realizada com o equipamento Chemidoc XRS+ (Bio-Rad®Molecular Imager) e teve por referência o marcador Ladder V (NZYTech®) para o grupo CTX-M, e Ladder VI (NZYTech®) para o grupo CMY-2.

Tabela 2 – *Primers* utilizados, características gerais (gene-alvo, sequência e dimensão do segmento) e respectiva referência.

Gene-alvo	Primer	Sequência do primer	Dimensão do segmento	Referência
16S rRNA	16S F	5'-GCT GAC GAG TGG CGG ACG GG-3'	251 pb	Tivendale (2000)
	16S R	5'-TAG GAG TCT GGA CCG TGT CT-3'		
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo-1	CTX-M gp1F	5'-AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC-3'	415 pb	
	CTX-M gp1R	5'-AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT-3'		
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo-2	CTX-M gp2F	5'-CGA CGC TAC CCC TGC TAT T-3'	552 pb	
	CTX-M gp2R	5'-CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG-3'		
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo-8	CTX-M gp8F	5'-TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC-3'	666 pb	Shahid <i>et al.</i> (2014)
	CTX-M gp8/25R	5'-AAC CCA CGA TGT GGG TAG-3'		
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo-9	CTX-M gp9F	5'-CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG-3'	205 pb	
	CTX-M gp9R	5'-ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC-3'		
<i>bla</i>_{CMY-2}	CMY-2 F	5'-ATG ATG AAA AAA TCG TTA TGC GC-3'	1145 pb	Krüger <i>et al.</i> (1998)
	CMY-2 R	5'-TTA TTG CAG CTT TTC AAG AAT GCG CCA-3'		

5. Análise estatística

O registo dos dados recolhidos foi feito pelo programa Excel (Microsoft Office 2016®), pelo qual foram calculadas as frequências absolutas e relativas de cada parâmetro, bem como o erro padrão da proporção, quando aplicável.

Atendendo ao princípio de independência das observações, a unidade de análise estatística é a exploração, sendo considerada positiva para a presença de *E. coli* produtora de ESBL quando pelo menos um dos isolados identifica positividade nos testes fenotípico ou genotípicos.

A análise estatística recorreu ao programa R (2016©), usado para realizar o Teste Exacto de Fisher no relacionamento de variáveis qualitativas.

VI. Resultados

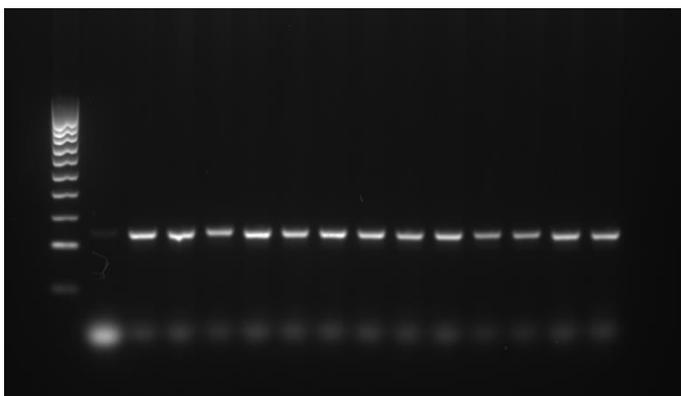
1. Confirmação de Viabilidade e Pureza

As 32 explorações em estudo contribuíram com 6 (n=6), 5 (n=22), 3 (n=3) e 1 (n=1) isolados, perfazendo um total de 156 isolados, sendo considerado positiva qualquer exploração em que pelo menos um dos isolados exibisse um resultado positivo. Confirmou-se viabilidade e pureza de todos os isolados pela inoculação em meio sólido e incubação de 24h a 37°C.

2. Confirmação Genotípica de Espécie

A confirmação genotípica de espécie por amplificação do gene 16S (figura 3) excluiu todos os isolados (n=5) da exploração 14 (de Ovar) e 3 dos 6 isolados da exploração 17 (de Albergaria-a-Velha), permanecendo esta última em teste com os 3 isolados confirmados como *E. coli*. Assim, o número total de isolados contemplados nos protocolos seguintes foi de 148, pertencentes a 31 explorações, processados individual e independentemente.

Figura 3 - Exemplo de leitura ao transiluminador de resultados da amplificação do gene 16S por PCR, após corrida em gel de agarose.

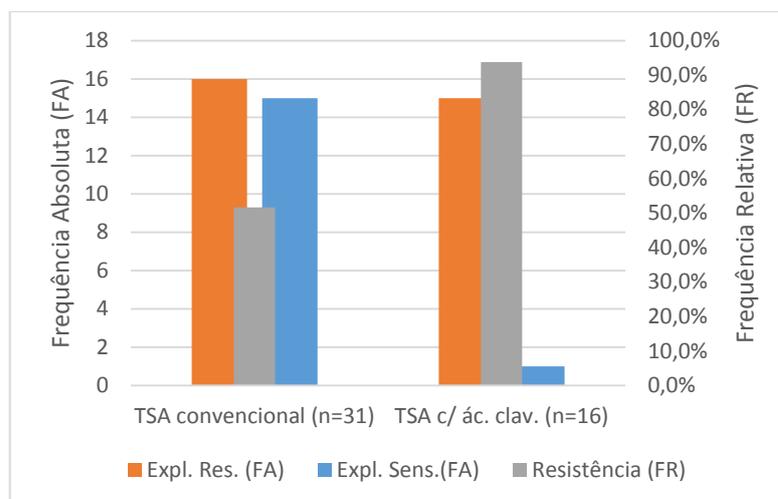


O tamanho do amplicão amplificado é de 251 pares de bases, localizando as bandas positivas entre a segunda (200pb) e a terceira (300pb) banda do marcador (à esquerda) (Ladder V, NZYTech). No primeiro poço foi colocado o marcador, no segundo o controlo negativo, no terceiro o controlo positivo e dos poços 3 a 14 as bandas correspondem aos isolados das explorações 1 (n=5), 2 (n=5) e dois isolados da exploração 4.

3. Determinação fenotípica de produção de ESBL

O primeiro protocolo de TSA foi aplicado aos 148 isolados. Destes, 41 foram identificados como resistentes, obtidas a partir das amostras colhidas em 16 explorações (51,6%). O segundo protocolo de TSA foi aplicado aos 41 isolados, revelando 15 explorações (48,4%) detentoras de *E. coli* fenotipicamente produtora de ESBL. Verificou-se apenas um caso (3,2%) de resistência fenotípica não atribuída a ESBL (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Frequências relativa (FR) e absoluta (FA) de identificação fenotípica de *E. coli* produtora de ESBL.



Resultados do primeiro protocolo de TSA (à esquerda) e do segundo, com a adição de ácido clavulânico (à direita). A frequência relativa refere-se ao número de explorações testada em cada protocolo (barra cinzenta, lida em percentagem, pela escala do eixo vertical da direita).

4. Determinação genotípica de produção de ESBL

Independentemente do resultado do teste fenotípico, cada isolado foi processado individualmente para a determinação genotípica de ESBL para cada grupo de β -lactamase. Vinte explorações (64,5%) revelaram a presença genotípica de *E. coli* produtora de ESBL de pelo menos um dos 5 grupos pesquisados (Gráfico 3).

Em amostras colhidas numa exploração (3,2%) foram identificadas ESBL pertencentes a três grupos diferentes, em 4 (12,9%) houve positividade a dois grupos e em 15 explorações (48,4%) apenas um grupo de ESBL foi identificado (Gráfico 4).

A frequência relativa e respectivo erro-padrão da proporção de cada grupo de ESBL podem ser consultados no gráfico 5, pelo qual é possível constatar que as ESBL mais frequentes pertencem aos grupos CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-9 (identificados em isolados obtidos em 38,7%, 29,0% e 12,9% das explorações, respectivamente), sendo os grupos mais raros CMY-2 e CTX-M-8 (em 3,2% e 0% das explorações, respectivamente).

Gráfico 3 – Resultado indiferenciado de genotipagem de ESBL (sendo positiva qualquer exploração que apresente pelo menos um dos cinco genes testados por PCR).

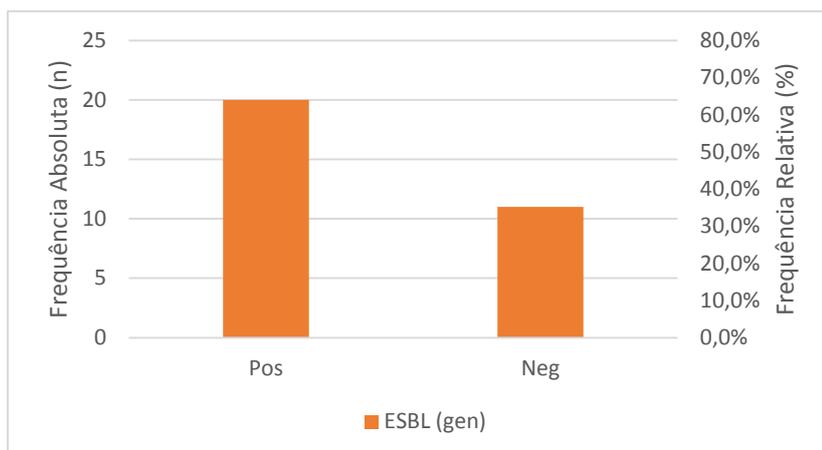
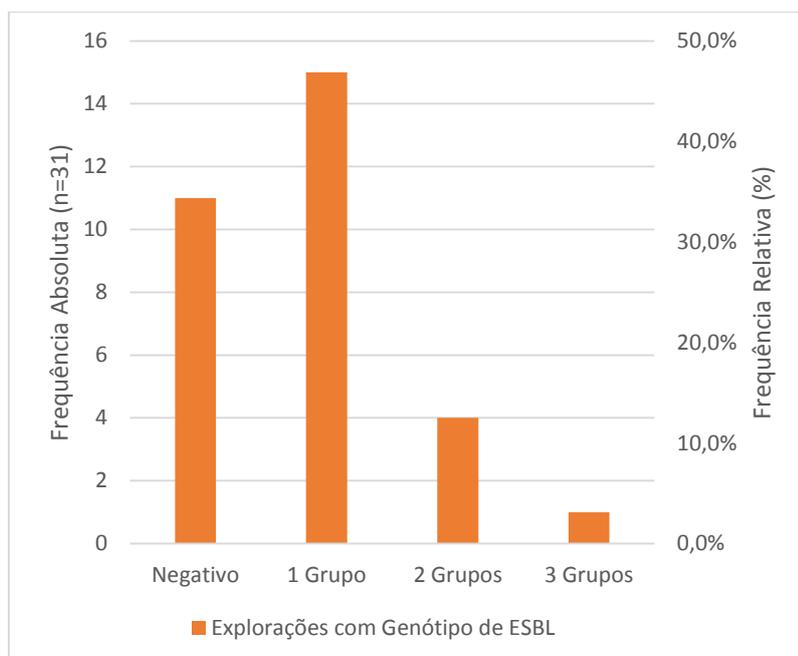
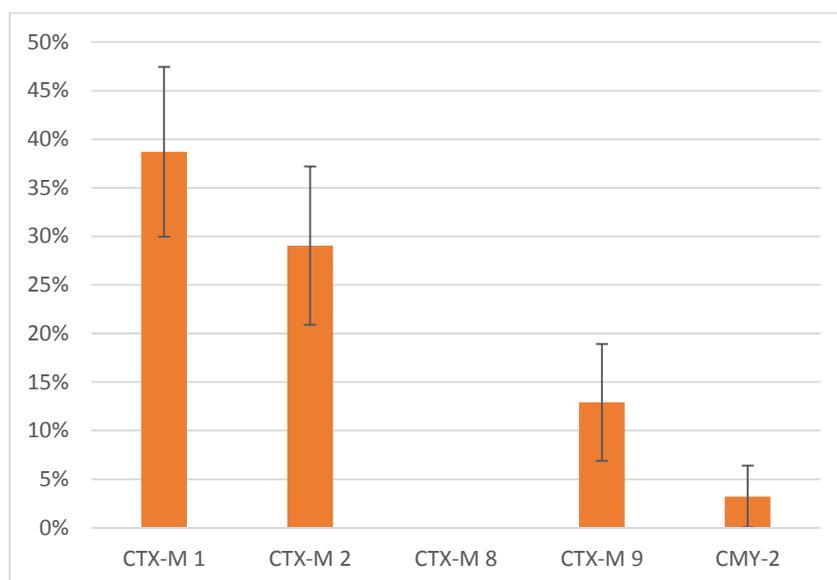


Gráfico 4 - Número de grupos genotípicos distintos em cada exploração.



Quinze explorações (48,4%) apresentaram apenas um dos 5 grupos de ESBL pesquisados, representando 75,0% das explorações genotipicamente positivas a *E. coli* produtora de ESBL. Quatro explorações (12,9%) acusaram a presença de 2 grupos diferentes e apenas uma exploração (3,2%) acusou positividade a 3 grupos distintos de ESBL.

Gráfico 5 - Frequência relativa e respectivo erro-padrão da proporção de cada grupo de ESBL pesquisado.



Não foi detectado qualquer isolado do grupo CTX-M-8 e apenas uma exploração (3,2%) revelou a presença de CMY-2. Os grupos com maior prevalência foram, por ordem decrescente, o CTX-M-1, encontrado em isolados provenientes de 12 explorações (38,7%), o CTX-M-2 e o CTX-M-9, presente presentes em 9 (29,0%) e 4 (12,9%) explorações, respectivamente.

5. Associação entre resultados dos testes fenotípicos e genotípicos

A associação entre as detecções fenotípica e genotípica de *E. coli* produtora de ESBL é significativa ($p < 0,05$). Vinte e quatro explorações (77,4%) foram concordantes nos resultados dos testes fenotípicos e genotípicos, os resultados de 6 explorações (19,4%) foram positivos apenas à componente genotípica e numa exploração (3,2%) os resultados foram positivos apenas ao teste fenotípico (tabela 3).

Tabela 3 - Frequências absoluta e relativa de ensaios fenotípicos e genotípicos concordantes e discordantes.

	Genótipo ESBL positivo	Genótipo ESBL negativo
Fenótipo ESBL positivo	14 (45,2%)	1 (3,2%)
Fenótipo ESBL negativo	6 (19,4%)	10 (32,2%)

Foi possível estabelecer uma associação significativa entre os resultados dos testes fenotípicos e genotípicos, sendo observada uma consistência de 77,4% dos resultados (soma dos resultados concordantes positivos e negativos: 45,2% e 32,2%, respectivamente). A discordância de resultados foi maioritariamente por positividade genotípica e negatividade fenotípica ($n=6$), tendo havido apenas um caso de genótipo negativo com fenótipo positivo.

6. Associação entre produção de ESBL e administração de LD

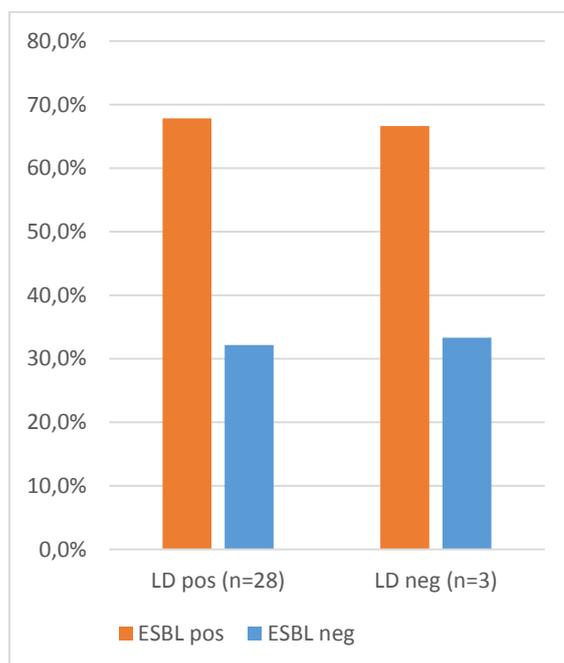
Não foi possível associar a ocorrência de *E. coli* produtora de ESBL e a administração de LD na alimentação de vitelos ($p=1$, Teste Exacto de Fisher) (Tabela 4). Das explorações em estudo, 28 (90,3%) alimentavam os vitelos com LD e apenas 3 (9,7%) não o faziam.

Tabela 4 - Frequências absoluta e relativa de *E. coli* produtora de ESBL nas explorações em função da prática da utilização de LD na alimentação de vitelos.

	Usam LD (n=28)	Não usam LD (n=3)
ESBL fen+gen pos	13 (46,4%)	1 (33,3%)
ESBL fen+gen neg	9 (32,1%)	1 (33,3%)
ESBL gen pos	5 (17,9%)	1 (33,3%)
ESBL fen pos	1 (3,6%)	0 (0,0%)

Apenas são considerados negativos resultados de explorações que não exibiram *E. coli* produtora de ESBL nos testes fenotípicos e genotípicos.

Gráfico 6 - Comparação da frequência relativa de detecção de ESBL em explorações que usam LD na alimentação de vitelos com a de explorações que não o fazem.



A aproximação dos resultados dos dois grupos é evidente, embora sejam díspares as dimensões dos grupos. Não sendo verificada uma variação estatisticamente relevante entre os grupos, não existe variação atribuível à condição de utilizar LD na alimentação

7. Associação entre a produção de ESBL e a adição de AB pelo produtor ao leite destinado à alimentação dos vitelos

Sete explorações (22,6%) adicionam AB ao leite destinado à alimentação de vitelos como medida preventiva de diarreias neonatais. As frequências absoluta e relativa de positividade a *E. coli* produtora de ESBL podem ser consultadas na tabela 5. Observa-se uma redução da dominância de ESBL, verificada no rácio de explorações positivas a *E. coli* produtora de ESBL (fenotípica e genotipicamente) e negativas à sua detecção (gráfico 6), entre as explorações que adicionam AB e as que não o fazem.

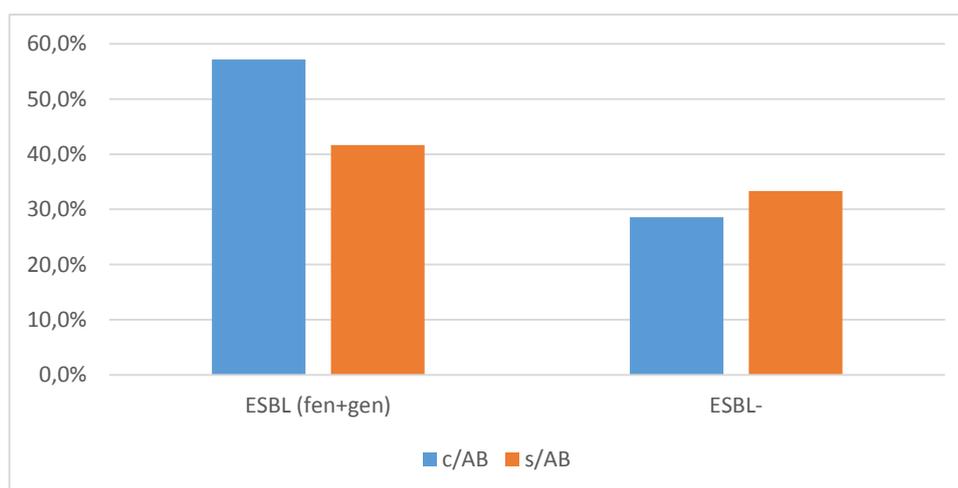
Tabela 5 – Distribuição de frequências absolutas e relativas de ocorrência de ESBL mediante a prática de adicionar AB à alimentação dos vitelos.

	Fenotípico	Genotípico	Fen+Gen	Fen e/ou Gen
Leite+AB (n=7)	0 (0,0%)	1 (14,3%)	4 (57,1%)	5 (71,4%)
Leite s/ AB (n=24)	1 (4,2%)	5 (20,8%)	10 (41,7%)	16 (66,7%)

Foram analisados distintamente os resultados dos testes fenotípico e genotípico indicadores de *E. coli* produtora de ESBL. As frequências relativas são referentes ao total de cada grupo, indicando a ocorrência de ESBL no conjunto de explorações em que o alimento dos vitelos contém AB aditivado, bem como no conjunto em que essa prática não se verifica.

A positividade fenotípica ($p=0,6851$), genotípica ($p=1$) ou indiferenciada (fenotípica e/ou genotípica, $p=1$) não se associam significativamente ao factor contemplado.

Gráfico 7 – Comparação dos rácios de positividade e negatividade entre explorações com e sem AB aditivado à alimentação de vitelos.

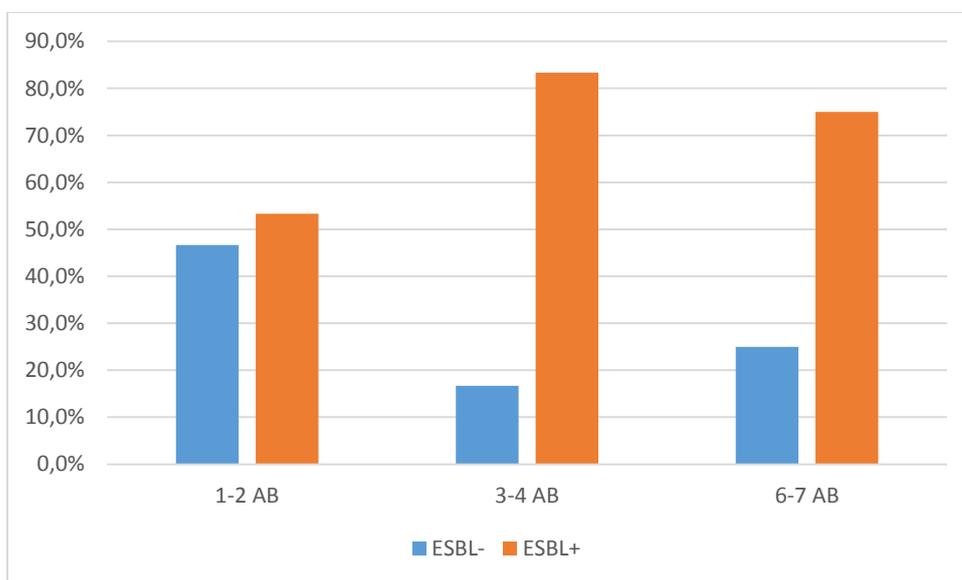


O rácio de positividade genotípica e fenotípica no grupo de explorações que adicionavam AB à alimentação dos vitelos é maior do que o mesmo rácio no grupo de explorações que não o praticavam. O rácio de negatividade é menor no primeiro grupo, evidenciando uma tendência potencialmente comprovável com o estudo estatístico fundado num grupo amostral mais amplo.

8. Associação entre produção de ESBL e o número de AB utilizados no tratamento de mastites

As explorações em estudo aplicam protocolos de antibioterapia no tratamento de mastites com uma variação quantitativa de diferentes compostos AB (tabela 5). Para determinar a prevalência de *E. coli* produtora de ESBL, as explorações foram organizadas em classes, de acordo com o número de AB utilizados: 1 a 2 AB (n=15, 48,4%), 3 a 4 (n=12, 38,7%) e 6 a 7 (n=4, 12,9%). A prevalência de *E. coli* produtora de ESBL em cada classe foi analisada pelo Teste Exacto de Fisher (p=0,1351; p=0,2396 e p=1, respectivamente), que demonstrou não haver uma relação estatisticamente significativa com o número de AB usados.

Gráfico 8 – Frequências relativas de ocorrência de antibiorresistência por ESBL em explorações com protocolos de antibioterapia de 1 a 2, 3 a 4 e 6 a 7 AB aplicados em mastites.



O rácio de negatividade no grupo de explorações que utilizavam 1 a 2 AB no tratamento de mastites é consideravelmente superior aos dos grupos de explorações que utilizavam 3 a 4 e 6 a 7 substâncias AB diferentes.

VII. Discussão

A informação obtida pelo presente estudo permite uma avaliação comparativa entre uma prática de manejo em explorações de bovinos de leite e a situação das mesmas relativamente às frequências de antibiorresistências por ESBL. Sendo a primeira vez que uma avaliação integrada de fenótipo e genótipo é realizada nestes termos em Portugal, e dada a especificidade metodológica protocolar deste estudo, a comparação com dados publicados terá, por vezes, de atravessar fronteiras ou de adoptar uma forma menos específica (por exemplo, não contemplando cada grupo de ESBL individualmente ou comparando resultados obtidos com critérios de amostragem distintos).

1. Determinação Fenotípica de ESBL

Os resultados da análise fenotípica indicam uma incidência de 48,4% (erro padrão da proporção [EPP] de 0,09) de explorações positivas a *E. coli* produtora de ESBL. A taxa de detecção é ligeiramente inferior, mas encontra-se na mesma ordem de grandeza da prevalência de *E. coli* produtora de CTX-M reportada em Espanha (52,3%, isolados resultantes de estudo nacional envolvendo 40 centros, realizado em 2000, processados por PCR), em 2005, e Itália (54,8%, isolados resultantes de estudo nacional, recolhidos de pacientes (n=6850) ou outras fontes (n=2226), processados para determinação de MIC em 11 laboratórios de microbiologia), em 2006 (Hernandez, Martinez-Martinez, Cantón, Coque & Pascual, 2005; Luzzaro *et al.*, 2006). O valor elevado pode dever-se à metodologia, cujos resultados são presuntivos, ou ao facto de se tratarem de amostras fecais e, conseqüentemente, resultantes de um *pool* consideravelmente vasto de microrganismos de Gram negativo com capacidade de partilha de material genético entre si em regime *ad libitum* (Shoemaker *et al.*, 2001).

A resistência a CTX foi verificada em maior número do que a CAZ (n=15 e n=12, respectivamente). A caracterização molecular que Chen e colaboradores (2005) fizeram das β -lactamases CTX-M atribui a capacidade catalítica da cefotaxima à geometria do local de ligação ao anel β -lactâmico, que permite reconhecer eficientemente CTX, mas não a maior e mais consistente molécula de CAZ. No entanto, os casos de ceftazidimase associada (73,3% neste estudo, 11/15) são crescentemente reportados, identificando uma situação de co-selecção descrita por Novais e colaboradores (2010).

2. Determinação Genotípica de ESBL

Comparando a prevalência de ESBL reportada por Reist e colaboradores (2013), na Suíça (8,4%) com a obtida neste estudo (64,5%), observa-se uma disparidade na ordem de grandeza que poderá ter fundamento na origem dos isolados (amostras fecais de animais adultos *versus* vitelos não desmamados), o que está de acordo com estudos que demonstram

uma relação inversa entre a prevalência de antibiorresistências na microbiota fecal e a idade do animal (Dolejská *et al.*, 2008; Duse *et al.*, 2013; Randall *et al.*, 2014). Estes, por sua vez, são concordantes com os programas de monitorização microbiológica de animais saudáveis na Suécia (Swedres-Svarm, 2015) e nos Países Baixos (MARAN, 2015).

Na Alemanha, o estudo de Schmid e colaboradores (2013) obteve uma proporção de 86,7% (39/45) explorações positivas a *E. coli* produtora de ESBL, das quais 93,4% pertenciam ao grupo CTX-M. A amostragem desse estudo contou com zaragatoas de calçado e análise de pó, além das amostras fecais, o que poderá ter contribuído para uma taxa de detecção de ESBL mais elevada. Nesse trabalho, foi reportada uma incidência de CMY-2 de 6,7% (3/45) (ligeiramente superior à obtida no presente estudo, que foi de 3,2%), possivelmente pela origem das amostras CMY-2 positivas ser exclusivamente explorações de carne. Um estudo realizado na Suíça (Endimiani, Rossano, Kunz, Overesch & Perreten, 2012) não identificou CMY-2 de *E. coli* em bovinos, mas apenas em aves (frangos). Outro estudo, cuja amostragem consistiu em *E. coli* obtida de amostras fecais de bovinos, identificou CMY-2 em 13,2% dos isolados (139/1050) (Kanwar *et al.*, 2013). O tratamento prévio dos animais com ceftiofur e clortetraciclina pode ter potenciado o aumento dos níveis de antibiorresistência e, conseqüentemente, a um valor mais elevado da prevalência de CMY-2.

A maior prevalência do grupo CTX-M-1 está em conformidade com Dahmen e colaboradores (2013), Schmid e colaboradores (2013) e Vogt e colaboradores (2014), que afirmam ser o gene que codifica para ESBL mais reportado em isolados obtidos da espécie bovina. Os grupos CTX-M-1, -2 e -9 são referenciados como os mais frequentemente associados a *bla*_{ESBL} em produção animal, com a agravante de CTX-M-1 estar disseminado em todos os animais de produção na UE, ainda que seja mais raramente reportado noutras regiões (Seiffert *et al.*, 2013).

3. Associação entre fenotipagem e genotipagem

A associação significativa entre os resultados fenotípicos e genotípicos encontrada confere fiabilidade à metodologia aplicada e atribui confiança aos resultados obtidos.

Os casos em que não foi observada conformidade fenótipo-genotípica podem dever-se a vários factores, de acordo com a disparidade presente.

Os casos de genótipo positivo e fenótipo negativo (n=6) podem ter fundamento em diferenças decorrentes das condições do meio, pelas quais pode verificar-se um perfil distinto para cada contexto ambiental. Uma possibilidade que justifica este cenário prende-se com a presença do gene responsável pela resistência (e, por isso, identificado por PCR), mas encontrar-se inactivo, não sendo expresso e, conseqüentemente, não ser identificável num teste funcional. Salienta-se a importância de ter presente que tais variações também ocorrem nos planos *in vivo* e *in silico*, tendo consciência de que uma resistência verificada em contexto laboratorial

pode não ser observada no animal, bem como uma resistência verificada em campo não corresponde necessariamente a uma observação laboratorial concordante.

O caso de fenótipo positivo e genótipo negativo (n=1) pode dever-se a uma resistência não abrangida no conjunto de genes de resistência testados, tratando-se de uma ESBL distinta.

4. Associação entre produção de ESBL e administração de LD

Não foi possível estabelecer uma associação significativa entre a prevalência de ESBL e a utilização de LD na alimentação de vitelos. O facto de ser utilizada a exploração como unidade de análise estatística limitou a dimensão da amostra, sendo esta já limitante pela disparidade quantitativa entre os dois grupos comparados (n=28 e n=3). Concordantemente com este estudo, Duse e colaboradores (2013) não observaram qualquer efeito decorrente da utilização de (i) colostro proveniente de vacas tratadas na secagem com penicilinas e aminoglicosídeos e de (ii) LD de transição na alimentação de vitelos. Brunton e colaboradores (2014) não encontraram diferenças na proporção de *E. coli* positiva a CTX-M entre vitelos alimentados com LD contendo resíduos AB e vitelos alimentados com leite de substituição, embora tenham verificado que a persistência de *E. coli* positiva a CTX-M é mais longa no primeiro grupo, permanecendo mesmo após o desmame.

Foi verificado um aumento significativo de antibiorresistência de isolados de *E. coli* obtidos de vitelos alimentados com LD e com LD pasteurizado, relativamente a um grupo de controlo negativo (Aust *et al.*, 2013). Contudo, o estudo não fornece informação sobre a presença de resíduos AB no LD, pelo que não é possível relacionar a diferença nos perfis de resistência encontrada e a presença de AB e respectiva concentração.

5. Associação entre produção de ESBL e adição de AB pelo produtor ao leite destinado à alimentação dos vitelos

Apesar de se verificar uma tendência para a positividade de ESBL nas explorações em que era aditivado AB no leite posteriormente administrado aos vitelos (patente nos rácios expostos no gráfico 6), a associação destes factores não é significativa, no grupo em causa. A tendência, no entanto, coaduna-se com publicações existentes neste âmbito. Quando Thames e colaboradores (2015) estudaram a influência da presença de AB na alimentação de vitelos, verificaram que o grupo exposto à maior dose de AB (relativamente aos grupos de exposição a doses subterapêuticas e de controlo negativo) evidenciava uma maior frequência relativa do gene de resistência pesquisado. Os estudos comparativos de Berge e colaboradores (2006) e de van vleck Pereira e colaboradores (2014) quantificaram a disseminação fecal de *E. coli* antibiorresistente e a caracterização (quantitativa e qualitativa) da antibiorresistência, respectivamente, em vitelos expostos a AB aditivado na alimentação. O primeiro estudo concluiu haver uma intensificação de disseminação fecal de *E. coli* antibiorresistente no grupo

de vitelos exposto a AB, relativamente ao grupo controlo. O segundo dos estudos supramencionados verificou uma diferença no índice de sensibilidade de 6% (no grupo exposto) para 46% (no grupo controlo). A resistência a pelo menos 3 dos 12 AB testados verificou-se em 84% dos isolados do grupo exposto, sendo apenas de 37% no grupo controlo.

6. Associação entre produção de ESBL e o número de AB utilizados no tratamento de mastites

Mesmo sem um padrão sequencialmente proporcional, verifica-se uma distinção notória na prevalência de *E. coli* produtora de ESBL no grupo de explorações que utilizam 1 a 2 AB, em que a frequência relativa de explorações positivas (53,3%, n=15) difere consideravelmente da observada nos grupos que utilizam 3 a 4 AB (83,3%, n=12) e 6 a 7 AB (75,0%, n=4).

A análise comparativa estratificada em função do número de AB utilizados no tratamento de mastites tem por base o princípio teórico de que uma exploração que utilize sete produtos diferentes, relativamente a uma em que apenas um seja utilizado para o mesmo fim, tem maior probabilidade de (i) recorrer a β -lactâmicos, potencialmente indutores de antibiorresistência por β -lactamases, nomeadamente ESBL; (ii) propiciar condições que favoreçam fenómenos de co-resistência associada a co-selecção; (iii) manter condições estruturais e de manejo deficientes no controlo etiológico de mastites e (iv) não ser munida de registos rigorosos e completos sobre o historial de antibioterapias instituídas. Os estudos publicados nesta matéria abordam o problema com uma perspectiva mais particular, ajustada a objectivos próprios, sendo disto exemplo a comparação entre sistemas de produção orgânica e sistemas convencionais (Pol & Ruegg, 2007) – denunciando uma maior CMI de ampicilina, pirlimicina e tetraciclina no grupo de explorações convencionais, relativamente à do grupo de explorações orgânicas, onde a exposição a AB é extremamente reduzida ou nula (estudo realizado apenas contemplando agentes patogénicos de Gram-positivo) – ou a detecção de um AB específico no leite proveniente de vacas em antibioterapia e a sua relação com a ocorrência de *bla*_{CTX-M} (Randall *et al.*, 2014) – evidenciando uma associação estatisticamente significativa entre a detecção de cefquinoma residual e a ocorrência de CTX-M em amostras de LD, fecais e ambientais.

Este estudo contempla apenas a quantidade indiscriminada de AB utilizados, visando aferir se esta tem repercussões na ocorrência de antibiorresistências por ESBL. Para a obtenção de dados mais informativos, no futuro esta relação pode ser averiguada de forma qualitativa (tendo em conta quais os AB utilizados pelas explorações e em que regime o fazem), conseguindo apurar com maior precisão a influência dos protocolos de antibioterapia em mastites no teor residual de AB no leite das vacas em tratamento e, inerentemente, no surgimento de antibiorresistências na microbiota dos vitelos alimentados com esse leite.

7. Limitações do estudo e perspectivas futuras

Para a realização deste estudo, foi necessário estabelecer protocolos ajustados aos objectivos de cada fase do trabalho e otimizar os mesmos para conseguir a obtenção de dados simultaneamente fidedignos e úteis, que permitissem resultados sólidos, comparáveis com os de outros estudos publicados. O desenho experimental dinâmico exigiu uma adaptação protocolar às necessidades que surgiram ao longo da investigação, mantendo constante a fidelidade ao objectivo central que motivou esta pesquisa. Tal situação está patente nas alterações aplicadas aos testes genotípicos, sendo a mais relevante a realização de cinco protocolos convencionais de PCR seriados, em vez de um protocolo multiplex-PCR único para cada isolado (por ter sido impossível conjugar as condições de processamento ideais para todos os genes pesquisados). Esta adaptação prolongou consideravelmente o período experimental, inviabilizando a integração de outros genes codificantes de ESBL, pertinentes para a caracterização dos perfis de resistência.

A metodologia do presente estudo carece de uma complementaridade processual (alargando criteriosamente o conjunto de genes de resistência pesquisados, contemplando os criticamente emergentes no contexto geográfico em que nos inserimos e os que vigoram no dinamismo das rotas de mercado de que fazemos parte) e de amostragem (sendo necessário abranger um conjunto de explorações mais vasto e, paralelamente, mais representativo da população e área geográfica que se pretende caracterizar).

8. Considerações Finais

Atendendo à tendência indutora de antibiorresistência verificada pela administração de LD na alimentação de vitelos, considera-se tal prática desaconselhável (apesar de outros benefícios inerentes à mesma, alguns deles supramencionados). A manutenção de resíduos AB, no LD, em níveis suficientes para a criação de um ambiente de pressão selectiva de que pode resultar a emergência de microbiota antibiorresistente torna o processamento deste subproduto um dever merecedor de atenção e cuidado (ainda que os não tenha a nível legal): o descarte prudente de LD prevê que este não integre as vias pelas quais o AB (e a microbiota com que contacta) possa contaminar as pessoas envolvidas na produção, os animais e o meio em que se inserem. Não administrar LD aos vitelos por prudência, mas tratá-lo irresponsavelmente (por exemplo, deixando que este contamine o equipamento manuseado pelo pessoal, o material das camas das vacas, a água, a fauna envolvente ou as superfícies das instalações) pode resultar na promoção de um cenário de antibiorresistência com consequências de gravidade equiparável às de utilizar o LD. Chama-se, assim, a atenção para o facto de poder incorrer-se na contribuição para a emergência e disseminação de antibiorresistências, por inconsciência ou desconsideração do impacto de AB residuais no meio. A escassez legislativa relativa ao LD (que se resume, como anteriormente referido, à impossibilidade de o

comercializar), juntamente com falta de informação e formação dos profissionais envolvidos, leva a uma prorrogação do problema e dos seus efeitos.

VIII. Conclusão

O grupo amostral contemplado pelo presente estudo apresenta um grau elevado de utilização de LD na alimentação de vitelos (90,3%). Foram detectadas resistências por ESBL em isolados provenientes de 64,5% das explorações, verificando-se mais do que um grupo de ESBL em 5 explorações (16,1%).

Não foi estabelecida uma associação significativa entre a prevalência de ESBL e (i) a utilização de LD na alimentação de vitelos; (ii) a prática de aditar AB no leite destinado à alimentação de vitelos; e (iii) a quantidade de diferentes compostos AB utilizados no tratamento de mastites – o que não implica a sua inexistência. A abordagem desta questão revela a necessidade de aprofundar a análise em estudo, quantitativa e qualitativamente, para serem tomadas medidas que minimizem as multirresistências e potenciem a eficácia da antibioterapia no futuro. Neste sentido, a par com a maximização da vida útil dos AB disponíveis, deve ter-se em conta a defesa da Saúde Pública (praticando uma antibioterapia ponderada e consciente) e os interesses dos produtores.

IX. Bibliografía

- Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Reviews of Infectious Diseases*, vol. 10, 677–678.
- Acar, J. & Rostel, B. (2001). Antimicrobial resistance: an overview. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, vol. 20, 797–810.
- Alekshun, M. N. & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, vol. 128, 1037–1050.
- Alexander, C. & Rietschel, E. T. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of Endotoxin Research*, vol. 7, 3, 167-202.
- Allen, H. K., Moe, L. A., Rodbumrer, J, Gaarder A., & Handelsman, J. (2009). Functional metagenomics reveals diverse beta-lactamases in a remote Alaskan soil. *The ISME Journal*, vol. 3, 243–251.
- American Feed Industry Association [AFIA] (2008). Feeding pasteurized milk to dairy calves. *Bovine Alliance on Management and Nutrition*, AFIA Publications.
- Andersson, D. I. & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews: Microbiology*, vol. 12, 465–478.
- Angel Díaz, M., Ramón Hernández, J., Martínez-Martínez, L., Rodríguez-Baño, J., Pascual, A. & Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria [GEIH] (2009). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE project, 2006). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 27, 9, 503-510.
- Aust, V., Knapstein, K., Kunz, H. J., Kaspar, H., Wallmann, J. & Kaske, M. (2013). Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 97, 6, 1091–1103.
- Baharoglu, Z. & Mazel, D. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 38, 1126–1145.
- Bal, A., Coombs, G., Holden, M., Lindsay, J., Nimmo, G., Tattevin, P. & Skov, R. (2016). Genomic insights into the emergence and spread of international clones of health-care-, community- and livestock-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, vol. 6, 95–101.
- Barlow, M. & Hall, B. G. (2002). Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years. *Journal of Molecular Evolution*, vol. 55, 314–321.
- Barthélémy, M., Peduzzi, J., Bernard, H., Tancrede, C. & Labia, R. (1992). Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1122, 1, 15–22.

- Barto, P. B., Bush, L. J., Adams, G., Daleel, E. E., Frost, A. J., Kesler, E. M., Keys, J. E., Pearson, R. E., Weinland, B. T., Neave, F. K. & Schalm, O. W. (1982). Feeding milk containing *Staphylococcus aureus* to calves. *Journal of Dairy Science*, vol. 65, 2, 271-274.
- Bartoloni, A., Pallecchi, L. Rodriguez, H., Fernandez, C., Mantella, A., Bartalesi, F., Strohmeyer, M., Kristiansson, C., Gotuzzo, E., Paradisi, F. & Rossolini, G. M. (2009). Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 33, 125–129.
- Bauernfeind, A., Casellase, J. M., Goldberg, M., Holley, M., Jungwirth, R., Mangold, P., Rohnisch, T., Schweighart, S. & Wilhelm, R. (1992). A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection*, vol. 20, 158–163.
- Bauernfeind, A., Grimm, H. & Schweighart, S. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, vol. 18, 5, 294-298.
- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S. & Casellas, J. M. (1996). Sequences of beta-lactamase encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 40, 2, 509-513.
- Baylis, C. L., Penn, C. W., Thielman, N. M., Guerrant, R. L., Jenkins, C. & Gillespie, S. H. (2006). *Escherichia coli* and *Shigella* spp. In S. H. Gillespie & P. M. Hawkey (Eds.), Principles and practice of clinical bacteriology (2nd ed.). (pp. 347-365). England, UK: John Wiley and Sons Ltd.
- Bearson, B. L. & Brunelle, B. W. (2015). Fluoroquinolone induction of phage-mediated gene transfer in multidrug-resistant *Salmonella*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 46, 201–204.
- Ben David, Y., Dassa, B., Borovok, I., Lamed, R., Koropatkin, N. M., Martens, E. C., White, B. A., Bernalier-Donadille, A., Duncan, S. H., Flint, H. J., Bayer, E. A. & Morais, S. (2015). Ruminococcal cellulosome systems from rumen to human. *Environmental Microbiology*, vol. 17, 3407–3426.
- Berendsen, B. J., Wegh, R. S., Memelink, J., Zuidema, T. & Stolker, L. A. (2015). The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta*, vol. 132, 258–268.
- Bertulat, S., Fischer-Tenhagen, C. & Heuwieser, W. (2015). A survey of drying-off practices on commercial dairy farms in northern Germany and a comparison to science-based recommendations. *Veterinary Record Open*, vol. 2, 1.
- Biggs, A., Barrett, D., Bradley, A., Green, M., Reyher, K. & Zadoks, R. (2016). Antibiotic dry cow therapy: where next? *Veterinary Record*, vol. 178, 93–94.
- van den Bogaard, A., Willems, R., London, N., Top, J., Stobberingh, E. E. (2002). Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 49, 3, 497-505.
- Bonnedahl, J., Drobni, P., Johansson, A., Hernandez, J., Melhus, A., Stedt, J., Olsen, B. & Drobni, M. (2010). Characterization, and comparison, of human clinical and black-headed gull (*Larus ridibundus*) extended-spectrum beta-lactamase-producing bacterial isolates from Kalmar, on the southeast coast of Sweden. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 65, 1939-1944.

- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 48, 1-14.
- Borja-Santos, R. (2016, 3 de Fevereiro). Centro hospitalar de Coimbra confirma três mortos com a mesma bactéria do surto de Gaia. *Público*. Acedido em Abr. 17, 2017, em: <https://www.publico.pt/2016/02/03/sociedade/noticia/ha-24-doentes-em-coimbra-com-a-mesma-bacteria-que-causou-surto-em-gaia-1722220>
- Bos, M. E., Mevius, D. J., Wagenaar, J. A., van Geijlswijk, I. M., Mouton, J. W. & Heederik, D. J. (2015). Antimicrobial prescription patterns of veterinarians: introduction of a benchmarking approach. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 70, 8, 2423-2425.
- Boyer, H. (1966). Conjugation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, vol. 91, 5, 1767-1772.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Review*, vol. 14, 4, 933-951.
- Brennan, E., Martins, M., McCusker, M. P., Wang, J., Alves, B. M., Hurley, D., El Garch, F., Woehrlé, F., Miossec, C., McGrath, L., Sri Kumar, S., Wall, P. & Fanning, S. (2016). Multidrug-resistant *Escherichia coli* in bovine animals, Europe. *Emerging Infectious Disease Journal*, vol. 22, 1650–1652.
- Brunton, L. A., Reeves, H. E., Snow, L. C. & Jones, J. R. (2014). A longitudinal field trial assessing the impact of feeding waste milk containing antibiotic residues on the prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* in calves. *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 117, 403–412.
- Burow, E. & Käsbohrer, A. (2017). Risk factors for antimicrobial resistance in *Escherichia coli* in pigs receiving oral antimicrobial treatment: a systematic review. *Microbial Drug Resistance*, vol. 23, 2.
- Bush, K. & Fisher, J. F. (2011). Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from Gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology*, vol. 65, 455–478.
- Bush, K. & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 54, 969–976.
- Callens, B., Persoons, D., Maes, D., Laanen, M., Postma, M., Boyen, F., Haesebrouck, F., Butaye, P., Catry, B. & Dewulf, J. (2012). Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 106, 53–62.
- Campos, A. (2015, 21 de Outubro). Hospital de Gaia diz que surto de bactéria multirresistente está controlado. *Público*. Acedido em Abr. 17, 2017, em: <https://www.publico.pt/2015/10/21/sociedade/noticia/hospital-de-gaia-diz-que-surto-de-bacteria-multiresistente-esta-controlado-1711960>
- Cantón, R. & Coque, T. M. (2006). The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 9, 5, 466-475.
- Cantón, R. & Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 9, 5, 477-485.

- Cantón, R., Akova, M., Carmeli, Y., Giske, C. G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D. M., Miriagou, V., Naas, T., Rossolini, G. M., Samuelsen, O., Seifert, H., Woodford, N. & Nordmann, P. (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 18, 413–431.
- Cantón, R., González-Alba, J. M. & Galán, J. C. (2012). CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*, vol. 3, 110.
- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F. & Coque, T. M. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 14 (Suppl 1), S144-S153.
- Carattoli, A. (2009). Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 53, 6, 2227-2238.
- Carattoli, A. (2011). Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 301, 8, 654-658.
- Catry, B., Dewulf, J., Maes, D., Pardon, B., Callens, B., Vanrobaeys, M., Opsomer, G., de Kruif, A. & Haesebrouck, F. (2016). Effect of antimicrobial consumption and production type on antibacterial resistance in the bovine respiratory and digestive tract. *Plos One*, vol. 11, Acedido em Abr. 19, 2017, em: <http://journals.plos.org/plosone/article/metrics?id=10.1371/journal.pone.0146488>
- Caudle, L. R. (2014). *Metagenomic analysis of antibiotic resistance genes in the fecal microbiome following therapeutic and prophylactic antibiotic administration in dairy cows*. Masters, Virginia Polytechnic Institute and State University. Acedido em Abr. 19, 2017, em: <http://hdl.handle.net/10919/49676>
- Centers for Disease Control and Prevention [CDC] (2015). About Antimicrobial Resistance. Acedido em Abr. 19, 2017, em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- Chambers, L., Yang, Y., Littler, H., Ray, P., Zhang, T., Pruden, A., Strickland, M. & Knowlton, K. (2015). Metagenomic analysis of antibiotic resistance genes in dairy cow feces following therapeutic administration of third generation cephalosporin. *Plos One*, vol. 10.
- Chanawong, A., M'Zali, F. H., Heritage, J., Lulitanond, A. & Hawkey, P. M. (2002). Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 46, 3, 630-637.
- Chantziaras, I., Boyen, F., Callens, B. & Dewulf, J. (2014). Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 69, 827–834.
- Chen, H., Shu, W., Chang, X., Chen, J., Guo, Y. & Tan, Y. (2010). The profile of antibiotics resistance and integrons of extended-spectrum beta-lactamase producing thermotolerant coliforms isolated from the Yangtze basin in Congqing. *Environmental Pollution*, vol. 158, 7, 2459-2464.
- Chen, Y., Delmas, J., Sirot, J., Shoichet, B. & Bonnet, R. (2005). Atomic resolution structures of CTX-M β -lactamases: extended spectrum activities from increased mobility and decreased stability. *Journal of Molecular Biology*, vol. 348, 2, 349-362.

- Chik, A. B., Achacoso, A. S., Evans D. L. & Rusoff, L. L. (1975). Growth and feed efficiency of young calves fed a milk replacer, waste milk, or fermented colostrum. *Journal of Dairy Science*, vol. 58, 742.
- Church, D. C. (1988). *The ruminant animal: digestive physiology and nutrition*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs. 564.
- Clinical Laboratory Standards Institute [CLSI] (2013). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Second Informational Supplement*. CLSI document VET01-S2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
- Collignon, P. C., Conly, J. M., Audremont, A., McEwen, S. A. & Aidara-Kane, A. (2016). World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. *Food Safety – Clinical Infectious Diseases*, vol. 63, 1087–1093.
- Commission Implementing Decision of 12 November 2013 on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria (2013/652/EU). *Official Journal of the EU* L 303, 14.11.2013, p. 26–39.
- Commission Notice 2015/C 299/04. Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine (PUAVM). *Official journal of the EU*.
- Connely, M., Berry, D. P., Murphy, J. P., Lorenz, I., Doherty, M. L. & Kennedy, E. (2014). Effect of feeding colostrum at different volumes and subsequent number of transition milk feeds on the serum immunoglobulin G concentration and health status of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, vol. 97, 6991–7000.
- Coque, T. M., Baquero, F. & Cantón, R. (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill*, 13.
- Coque, T. M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F., Cantón, R. & Nordmann, P. (2008). Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emergent Infectious Diseases*, vol. 14, 195-200.
- Couce, A. & Blazquez, J. (2009). Side effects of antibiotics on genetic variability. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 33, 531–538.
- D’Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W. & Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science*, vol. 311, 374–377.
- Dahmen, S., Métayer, V., Gay, E., Madec, J. Y. & Haenni, M. (2013). Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of Enterobacteriaceae causing cattle mastitis in France. *Veterinary Microbiology*, vol. 162, 2–4, 793–799.
- Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 74, 3, 417–433.
- Davies, J. (1990). What are antibiotics? Archaic functions for modern activities. *Molecular Microbiology*, vol. 4, 1227–1232.

- Davies, J., Spiegelman, G. B. & Yim, G. (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 9, 1–9.
- Davis, C. L. & Drackley, J. K. (1998). *The development, nutrition, and management of the young calf*. (1st Ed.). Iowa, USA: Iowa State University Press.
- Decousser, J. W., Poirel, L. & Nordmann, P. (2001). Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 45, 3595–3598.
- Decreto-lei 243/2001 de 5 de Setembro. Diário da República nº 206/2001 Série I-A. Ministério do Ambiente e Ordenamento do Território. Lisboa.
- Demain, A. L. & S. Sanchez (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, vol. 62, 5–16.
- Dhanji, H., Murphy, N. M., Doumith, M., Durmus, S., Lee, S. S., Hope, R., Woodford, N. & Livermore, D. M. (2010). Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 65, 2534–2537.
- Dhanji, H., Patel, R., Wall, R., Doumith, M., Patel, B., Hope, R., Livermore, D. M. & Woodford, N. (2011). Variation in the genetic environments of blaCTX-M-15 in *Escherichia coli* from the faeces of travellers returning to the United Kingdom. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 66, 5, 1005–1012.
- Dieste-Pérez, L., Frankena, K., Blasco, J., Muñoz, P. & de Jong, M. (2016). Efficacy of antibiotic treatment and test-based culling strategies for eradicating brucellosis in commercial swine herds. *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 126, 105–110.
- Directiva 2004/28/EC. Directive of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to veterinary medicinal products. *Official journal of the EU*.
- Djamdjian, L., Naas, T., Tandé, D., Cuzon, G., Hanrotel-Saliou, C. & Nordmann, P. (2011). CTX-M-93, a CTX-M variant lacking penicillin hydrolytic activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 55, 5, 1861–1866.
- Dolejská, M., Senk, D., Cízek, A., Rybaríková, J., Sychra, O. & Literák, I. (2008). Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates in cattle and house sparrows on two Czech dairy farms. *Research in Veterinary Science*, vol. 85, 491–494.
- Doyle, M. P. (2006). Antimicrobial resistance: implications for the food system. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 5, 71–137.
- Drinking Water Directive [DWD], 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998. *Official Journal of the European Communities*. L-330:32–54.
- Dumas, S., French, H., Lavergne, S., Ramirez, C., Brown, L., Bromfield, C., Garrett, E., French, D. & Aldridge, B. (2016). Judicious use of prophylactic antimicrobials to reduce abdominal surgical site infections in periparturient cows: part 1-a risk factor review. *Veterinary Record*, vol. 178, 654.
- Duse, A., Waller, K., Emanuelson, U., Unnerstad, H., Persson, Y., Bengtsson, B., Selim, S. A., Cullor, J. S., Keys, J. E., Pearson, R. E., Weinland, B. T., Wray, C., Furniss, S., Benham, C. L., Aust, V., Knappstein, K., Kunz, H. J., Kaspar, H., Wallmann, J., Kaske,

- M., Brunton, L. A., Duncan, D., Coldham, N. G., Snow, L. C., Jones, J. R., Kehoe, S. I., Jayarao, B. M., Heinrichs, A. J., Vasseur, E., Borderas, F., Cue, R. I., Lefebvre, D., Pellerin, D., Rushen, J., Wade, K. M., Passille, A. M., Pettersson, K., Svensson, C., Liberg, P., Nielsen, S. S., Toft, N., Walz, P. H., Mullaney, T. P., Render, J. A., Walker, R. D., Mosser, T., Baker, J. C., Bennett, R. H., Jasper, D. E., Carter, M. A., Nielsen, S. S., Toft, N., Caswell, J. L., Archambault, M., Unnerstad, H. E., Funghant, K., Waller, K. P., Persson, Y., Sverige, V., Giguré, S., Prescott, J. F., Baggot, J. D., Walker, R. D., Dowling, P. M., Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D. I., Nöremark, M., Frössling, J., Lewerin, S. S., Sheehan, K. B. & Wright, K. B. (2013). Farming practices in Sweden related to feeding milk and colostrum from cows treated with antimicrobials to dairy calves. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 55, 1, 49.
- Dutour, C., Bonnet, R., Marchandin, H., Boyer, M., Chanal, C., Sirot, D. & Sirot, J. (2002). CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14 β -lactamases from *Enterobacteriaceae* isolated in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 46, 2, 534-537.
- ECDC EFSA (2016). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal*, vol. 14, 2, 4380.
- ECDC EFSA EMA (2015). First joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals (JIACRA). *EFSA Journal*, vol. 13, 1, 4006.
- ECDC EFSA EMA SCENIHR (2009). Joint opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. *EFSA Journal*, vol. 7, 11, 1372-1450.
- EFSA Panel on Biological Hazards [EFSA BIOHAZ Panel] (2011). Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal*, vol. 9, 8, 2322-2417.
- EFSA BIOHAZ Panel, Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Fernandez-Escamez, P. S., Girones, R., Koutsoumanis, K., Lindqvist, R., Nørrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Threlfall, J., Wahlström, H., Bengtsson, B., Bouchard, D., Randall, L., Tenhagen, B. A., Ter Kuile, B., Verdon John Wallace, E., Brozzi, R., Guerra, B., Liebana, E., Stella, P. & Herman, L. (2017). Scientific opinion on the risk for the development of antimicrobial resistance (AMR) due to feeding of calves with milk containing residues of antibiotics. *EFSA Journal*, vol.15, 1, 4665-4772.
- Eisenstein, B. I. & Zaleznik, D. F. (2000). Enterobacteriaceae. In G. L. Mandell, J. E. Bennett & R. Dolin (Ed.), *Principles and practice of infectious diseases*. (5th ed.). (pp. 2294-2310). Philadelphia, USA: Churchill Livingstone.
- Elizondo-Salazar, J. A., Heinrichs, A. J. & Gelsinger, S. L. (2013). Pasteurization of non-saleable milk. Penn State Extension, DSE 2013-187.
- EMA (2013). Use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health (EMA/755938/2012). Acedido em Abr. 19, 2017, em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2013/07/WC500146813.pdf

- EMA (2014). Answers to the requests for scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals (EMA/381884/2014). Acedido em Abr 19, 2017, em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2014/07/WC500170253.pdf
- EMA (2016). Guideline for the demonstration of efficacy for veterinary medicinal products containing antimicrobial substances (EMA/CVMP/627/2001-Rev.1). Acedido em Abr. 19, 2017, em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/02/WC500200984.pdf
- EMA EFSA (2017). EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). [EMA/CVMP/570771/2015]. *EFSA Journal*, vol. 15 (1), 4666.
- EMA ESVAC (2016). Sales of veterinary antimicrobial agents in 29 EU/EEA countries in 2014 (EMA/61769/2016). Trends from 2011 to 2014. *Sixth ESVAC report*. Acedido em Abr. 19, 2017, em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2016/10/WC500214217.pdf
- Endimiani, A., Rossano, A., Kunz, D., Overesch, G. & Perreten, V. (2012). First countrywide survey of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from broilers, swine, and cattle in Switzerland. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73, 1, 31–38.
- EPRUMA (2013). Document on veterinary medicinal product terminology. Acedido em Abr. 19, 2017, em: <http://www.epruma.eu/publications/factsheets/publication/32-epruma-document-on-veterinary-medicinal-product-%20terminology.html>
- Farmer, J. J., Fanning, G. R., Huntley-Carter, G. P., Holmes, B., Hickman, F. W., Richard, C. & Brennan, D. J. (1981). *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family Enterobacteriaceae: identification of *Kluyvera ascorbata* sp. Nov. and *Kluyvera cryocrescens* sp. Nov. in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 13, 5, 919-933.
- Féria, C., Machado, J., Correia, J. D., Gonçalves, J., & Gaastra, W. (2001). Virulence genes and P fimbriae PapA subunit diversity in canine and feline uropathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, vol. 82, 1, 81–89.
- Fick, J., Soderstrom, H., Lindberg, R. H., Phan, C., Tysklind, M. & Larsson, D. G. J. (2009). Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 28, 2522–2527.
- Finland, M. (1979). Emergence of antibiotic resistance in hospitals, 1935-1975. *Review of Infectious Diseases*, vol. 1, 1, 4-22.
- Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S. & Sekawi, Z. (2014). Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Current Issues in Molecular Biology*, vol. 17, 11-22.
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R. & Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, vol. 47, 3, 137-146.

- Gniadkowski, M. (2008). Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 14 (Suppl. 1), S11–S32.
- Godden, S. (2007). Pasteurizing non-saleable milk and colostrum. *WCDS Advances in Dairy Technology*, vol. 19, 267-282.
- Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, vol. 24, 19–39.
- Godden, S. M., Fetrow, J. P., Feirtag, J. M., Green, L. R. & Wells, S. J. (2005). Economic analysis of feeding pasteurized nonsaleable milk versus conventional milk replacer to dairy calves. *Journal of American Veterinary Medical Association*, vol. 226, 1547-1554.
- Godden, S., McMartin, S., Feirtag, J., Stabel, J., Bey, R., Goyal, S., Metzger, L., Fetrow, J., Wells, S. & Chester-Jones, H. (2006). Heat treatment of bovine colostrum. II: Effects of pathogen viability and immunoglobulin G. *Journal of Dairy Science*, vol. 89, 3476-3483.
- Goff, D. A. (2011). Antimicrobial stewardship: bridging the gap between quality care and cost. *Current Opinion in Infectious Diseases*, vol. 24, S11–S20.
- Gonçalves, A., Igrejas, G., Radhouani, H., Estepa, V., Alcaide, E., Zorrilla, I., Serra, R., Torres, C. & Poeta, P. (2012). Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of Iberian lynx. *Applied Microbiology*, vol. 54, 1, 73-77.
- Gonggrijp, M., Scherpenzeel, C., Kappert, C., Heuvelink, A., Holtstege, M., Nijenhuis, E., Tijs, S., Keurentjes, J., Lam, T. & Velthuis, A. (2015). Resistentieontwikkeling bij jonge kalveren (in Dutch). Report. Research number OND1358162.
- Gottlieb, D. (1976). The production and role of antibiotics in soil. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, vol. 29, 987–1000.
- Guentzel, M. N. (1996). Medical Microbiology. In Baron S. (Ed.), *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter and Proteus*. (4th ed.). Galveston, USA: University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Guerin, E., Cambray, G., Da Re, S., Mazel, D. & Ploy, M. C. (2010). The SOS response controls antibiotic resistance by regulating the integrase of integrons. *Medicine Sciences (Paris)*, vol. 1, 28–30.
- Guerin, E., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M. C. & Mazel, D. (2009). The SOS response controls integron recombination. *Science*, vol. 324, 1034.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D. & Andersson, D. I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *Plos Pathogens*, vol. 7, Acedido em Abr. 19, 2017, em: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002158>
- Hacker, J. (1992). Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 38, 7, 720-727.
- Hagnestam, C., Emanuelson, U. & Berglund, B. (2007). Yield Losses Associated with Clinical Mastitis Occurring in Different Weeks of Lactation. *Journal of Dairy Science*, vol. 90, 2260–2270.

- Händel, N., Hoeksema, M., Freijo Mata, M., Brul, S. & ter Kuile, B. H. (2016). Effects of stress, reactive oxygen species, and the SOS response on De Novo acquisition of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 60 (3), 1319–1327.
- Händel, N., Otte, S., Jonker, M., Brul, S. & ter Kuile, B. H. (2015). Factors that affect transfer of the IncI1 β -lactam resistance plasmid pESBL-283 between *E. coli* strains. *Plos One*, vol. 10, Acedido em Abr. 19, 2017, em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0123039>
- Händel, N., Schuurmans, J. M., Brul, S. & ter Kuile, B. H. (2013). Compensation of the metabolic costs of antibiotic resistance by physiological adaptation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 57, 3752–3762.
- Händel, N., Schuurmans, J. M., Feng, Y., Brul, S. & ter Kuile, B. H. (2014). Interaction between mutations and regulation of gene expression during development of de novo antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 58, 4371–4379.
- Harbarth, S. & Samore, M. H. (2005). Antimicrobial resistance determinants and future control. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 11, 6, 794–801.
- Hardy, J. (2016). Gram's Serendipitous Stain. *Hardy Diagnostics*. Santa Maria, California. Acedido em Jul. 25, 2017, em: <http://hardydiagnostics.com/wp-content/uploads/2016/05/Hans-Christian-Gram.pdf>.
- Hauke, H. (1968). Untersuchungen über die inaktivierung antibiotikahaltiger milch durch die pasteurisierung. *Veterinärmed*, vol. 23, 105-108.
- Hawkey, P. M. & Jones, A. M. (2009). The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 64 (Suppl. 1), S3–S10.
- Hernandez, J. R., Martinez-Martinez, L., Cantón, R., Coque, T. M., Pascual, A. (2005). Spanish group for nosocomial infections (GEIH): Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 49, 2122-2125.
- Hiroi, M., Yamazaki, F., Harada, T., Takahashi, N., Iida, N., Noda, Y., Yagi, M., Nishio, T., Kanda, T., Kawamori, F., Sugiyama, K. Masuda, T., Hara-Kudo, Y. & Ohashi, N. (2012). Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 74, 2, 189-195.
- Hirsh, D. C., MacLachlan, N. J. & Walker, R. L. (2004). Family Enterobacteriaceae. In D. C. Hirsh (Ed.), *Veterinary Microbiology*. (2ed.). (pp. 57-60) Ames, Iowa: Blackwell Publishing.
- Hodgkin, D. C. (1949). The X-ray analysis of the structure of penicillin. *Advancement of Science*, vol. 6, 85–89.
- van der Horst, M. A., Schuurmans, J. M., Smid, M. C., Koenders, B. B. & ter Kuile, B. H. (2011). De novo acquisition of resistance to three antibiotics by *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance*, vol. 17, 141–147.
- Horton, R. A., Duncan, D., Randall, L. P., Chappell, S., Brunton, L. A., Warner, R., Coldham, N. G. & Teale, C. J. (2016). Longitudinal study of CTX-M ESBL-producing *E. coli* strains on a UK dairy farm. *Research in Veterinary Science*, vol. 109, 107–113.

- Horton, R. A., Randall, L. P., Bailey-Horne, V., Heinrich, K., Sharman, M., Brunton, L. A., La Ragione, R. M. & Jones, J. R. (2015). Degradation of cefquinome in spiked milk as a model for bioremediation of dairy farm waste milk containing cephalosporin residues. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 118, 901–910.
- Humeniuk, C., G. Arlet, G., V. Gautier, V., P. Grimont, P., R. Labia, R., and A. Philippon, A. (2002). β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 46, 3045–3049.
- Ishii, Y., Ohno, A., Taguchi, H., Imajo, S., Ishiguro, M. & Matsuzawa, H. (1995). Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 39, 2269–2275.
- Jacoby, G. A. & Muñoz-Price, L. S. (2005). The New β -lactamases. *New England Journal of Medicine*, vol. 352, 4, 380-391.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -lactamases. *Clinical Microbiology Review*, vol. 22, 161–182.
- Jalhan, S., Jindal, A., Gupta, A., & Hemraj, H. (2013). Synthesis, biological activities and chemistry of thiadiazole derivatives and Schiff bases. *ChemInform*, vol. 44, 16.
- Jamaluddin, A. A., Carpenter, T. E., Hird, D. W. & Thurmond, M. C. (1996). Economics of feeding pasteurized colostrum and pasteurized waste milk to dairy calves. *Journal of American Veterinary Medical Association*, vol. 209, 751-756.
- Johnson, J. R. (2002). Evolution of pathogenic *Escherichia coli*. In Michael S. Donnenberg (Ed.), *Escherichia coli – Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. San Diego, USA: Academic Press.
- Jones, G. M. & Bailey, T. L. (2009). Understanding the basics of mastitis. *Virginia Cooperative Extension*, 404-233.
- Jorgensen, M. & Hoffman, P. (2015). On-farm pasteurization of milk for calves. *University of Wisconsin Dairy Update*, Acedido em Abr. 21, 2017, em: <http://fyi.uwex.edu/heifermgmt/files/2015/02/pasteurization.pdf>
- Jorgensen, M., Hoffman, P. & Nytes, A. (2006). Efficacy of on-farm pasteurized waste milk systems on upper Midwest dairy and custom calf rearing operations. *The Professional Animal Scientist*, vol. 22, 1036-1038.
- Kanwar, N., Scott, H. M., Norby, B., Loneragan, G. H., Vinasco, J., McGowan, M., Cottel, J. L., Chengappa, M. M., Bai, J. & Boerlin, P. (2013). Effects of ceftiofur and chlortetracycline treatment strategies on antimicrobial susceptibility and on *tet(A)*, *tet(B)*, and *bla* CMY-2 resistance genes among *E. coli* isolated from the feces of feedlot cattle. *PloS One*, vol. 8, 11.
- Karim, A., Poirel, L., Nagarajan, S. & Nordmann, P. (2001). Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 201, 2, 237-241.
- Kehoe, S. I., Jayarao, B. M. & Heinrichs, A. J. (2007). A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. *Journal of Dairy Science*, vol. 90, 4108- 4116.
- Kesler, E. M., Chardavoyne, J. R., Ibeawuchi, J. A., Borland, K. M., Chik, A. B., Achacoso, A. S., Evans, D. L., Rusoff, L. L., Janzen, J. J., Johnson, S. D., Keys, J. E., Keys, J. E.,

- Pearson, R. E., Fulton, L. A., Weinland, B. T., Khakimova, K. M., Abzolova, A. G., Otterby, D. E., Johnson, D. G., Foley, J. A., Tomsche, D. S., Lundquist, R. G., Hanson, P. J., Roy, J. H. B., Schaffer, L. V., McGuffey, R. K., Schalm, O. W. & Volovenko, M. A. (1981). Feeding mastitic milk to calves: Review. *Journal of Dairy Science*, vol. 64, 5, 719-723.
- Kohanski, M. A., DePristo, M. A. & Collins, J. J. (2010). Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Molecular Cell*, vol. 37, 311–320.
- Kolář, M., Urbánek, K. & Látal, T. (2001). Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 17, 5, 357–363.
- Kreausukon, K. (2011). Usage of antimicrobials on 60 dairy farms in Northern Germany and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and extended spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* (ESBLs-producing *E. coli*) Isolated from bulk tank milk samples. *Doktors der Veterinärmedizin*, Freien Universität Berlin, Berlin, Germany. pp. 171.
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Schols, L. & Riess, O. (1998). AlaSOPro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics*, vol. 18, 2, 106-108.
- Kuipers, A., Koops, W. J. & Wemmenhove, H. (2016). Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *Journal of Dairy Science*, vol. 99, 1632–1648.
- Lahey Clinic (2016). B-lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. Acedido em Abr. 19, 2017, em <http://www.lahey.org/Studies/>
- Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E. & Larson, E. L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Reports*, vol. 127, 4.
- Lartigue, M., Poirel, L., Aubert, D. & Nordmann, P. (2006). In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring b-lactamase gene *bla*CTX-M of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 50, 1282-1286.
- Leavitt, A., Chmelnitsky, I., Colodner, R., Ofek, I., Carmeli, Y. & Navon-Venezia, S. (2009). Ertapenem resistance among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 47, 4, 969-974.
- Literak, I., Dolejska, M., Janoszowska, D., Hrusakova, J., Meissner, W., Rzycka, H., Bzoma, S. & Cizek, A. (2010). Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on Baltic Sea coast of Poland. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, 24, 8126-8134.
- Liu, B., & Pop, M. (2009). ARDB—Antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Research*, vol. 37, D443–D447.
- Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Ros-solini, G. M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T. M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., & Woodford, N. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 59, 165–174.
- Looff T, Johnson T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfeld, R. D., Sul, W. J., Stedtfeld, T. M., Chai, B. & Cole, J. R. (2012). In-feed antibiotic effects on the swine

- intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, 1691–1696.
- López, E. & Blázquez, J. (2009). Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on intrachromosomal homologous recombination in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 53, 3411–3415.
- Luzzaro, F., Mezzatesta, M., Mugnaioli, C., Perilli, M., Stefani, S., Amicosante, G., Rossolini, G. M. & Toniolo, A. (2006). Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, 5, 1659-1664.
- Ma, L., Ishii, Y., Ishiguro, M., Matsuzawa, H., & Yamaguchi, K. (1998). Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A β -lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 42, 5, 1181-1186.
- Maciucă, I. E., Williams, N. J., Tuchilus, C., Dorneanu, O., Guguianu, E., Carp-Carare, C., Rîmbu, C. & Timofte, D. (2015). High prevalence of *Escherichia coli*-producing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in poultry and human clinical isolates in Romania. *Microbial Drug Resistance*, vol. 21, 6, 651-662.
- Malmuthuge, N., Chen, Y., Liang, G., Goonewardene, L. A. & le Guan, L. (2015). Heat-treated colostrum feeding promotes beneficial bacteria colonization in the small intestine of neonatal calves. *Journal of Dairy Science*, vol. 98, 8044–8053.
- Marquetoux, N., Stevenson, M. A., Wilson, P., Ridler, A. & Heuer, C. (2016). Using social network analysis to inform disease control interventions. *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 126, 94–104.
- Martinez, J. L., Baquero, F. & Andersson, D. I. (2007). Predicting antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiology*, vol. 5, 12, 958-965.
- Martinez, J. L., Coque, T. M. & Baquero, F. (2015). What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nature Reviews: Microbiology*, vol. 13, 116–123.
- Martinez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Martinez-Solano, L. & Sanchez, M. B. (2009). A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 33, 44–65.
- Martins da Costa, P. & Vaz Pires, P. (2006). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research*, vol. 40, 2, 1735-1740.
- Matsumoto, Y., Ikeda, F., Kamimura, T., Yokota, Y. & Mine, Y. (1988). Novel plasmid-mediated β -lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino- cephalosporins. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 32, 1243–1246.
- Matsumoto, Y., Kitazume, H., Yamada, M., Ishiguro, Y., Muto, T., Izumiya, H. & Watanabe, H. (2007). CTX-M-14 type beta-lactamase producing *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from imported chicken meat. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, vol. 60, 4, 236.
- McGann, P., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., C. Ong, A., Clifford, R., Hinkle, M., Whitman, T., Lesho, E., Schaecher, K. E. (2016). *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *bla*CTX-

- M on a novel IncF plasmid: first report of mcr-1 in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 60, 7, 4420-4421.
- Mihaila, L., Wyplosz, W., Clermont, O., Garry, L., Hipeaux, M. C., Vittecoq, D., Dussaix, E., Denamur, E. & Branger, C. (2010). Probable intrafamily transmission of a highly virulent CTX-M-3-producing *Escherichia coli* belonging to the emerging phylogenetic subgroup D2 O102-ST405 clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 65, 7, 1537-1539.
- Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands [MARAN] (2015). Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2014. Acedido em Abr. 19, 2017, em: http://www.wur.nl/upload_mm/2/2/2/0ab4b3f5-1cf0-42e7-a460-d67136870ae5_NethmapMaran2015.pdf
- Moore, D. A., Taylor, J., Hartman, M. L. & Sisco, W. M. (2009). Quality assessments of waste milk at a calf ranch. *Journal of Dairy Science*, vol. 92, 7, 3503-3509.
- Mora, A., Herrera, A., Mamani, R., Lopez, C., Alonso, M. P., Blanco, J. E., Blanco, M., Dahbi, G., Garcia-Garrote, F., Pita, J. M., Coira, A., Bernardez, M. I. & Blanco, J. (2010). Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, 6991-6997.
- Moran, J. (2016). The importance of colostrum to newborn calves. In: Moran J (ed.). *Rearing young stock on tropical dairy farms in Asia*. CSIRO Publishing, Clayton, Victoria, Australia. pp. 41–56.
- Moriel, D. G., Rosini, R., Seib, K. L., Serino, L., Pizza, M., & Rappuoli, R. (2012). *Escherichia coli*: great diversity around a common core. *MBio*, vol. 3, 3.
- Morosini, M. I., García-Castillo, M., Coque, T. M., Valverde, A., Novais, A., Loza, E., Baquero, F., Cantón, R. (2006). Antibiotic coresistance in extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae and the in vitro activity of tigecycline. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 50, 2695-2699.
- Moura, A., Henriques, I., Smalla, K. & Correia, A. (2010). Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Research in Microbiology*, vol. 161, 58–66.
- Mushtaq, S., Irfan, S., Sarma, J. B., Doumith, M., Pike, R., Pitout, J., Livermore, D. M. & Woodford, N. (2011). Phylogenetic diversity of *Escherichia coli* strains producing NDM-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 66, 9, 2002-2005.
- Nasrabadi Hadi-Mofidi, M. (1976). *Untersuchungen über die hitzestabilität von antibiotika und sulfonamiden in milch bei der pasteurisierung*. Unpublished doctoral dissertation, Uni Göttingen.
- National Institute for Health and Care Excellence [NICE] (2015). Antimicrobial stewardship: systems and processes for effective antimicrobial medicine use. Acedido em Abr. 19, 2017, em: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng15/resources/%20antimicrobial-stewardship-systems-and-processes-for-effective-antimicrobial-medicine-use-1837273110469>
- Nhung, N. T., Thuy, C. T., Trung, N. V., Campbell, J., Baker, S., Thwaites, G., Hoa, N. T. & Carrique-Mas, J. (2015). Induction of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and

- non-typhoidal *Salmonella* strains after adaptation to disinfectant commonly used on farms in Vietnam. *Antibiotics*, vol. 4, 480–494.
- Nordmann, P., Lartigue, M. & Poirel, L. (2008). B-Lactam induction of ISEcp1B-mediated mobilization of the naturally occurring *bla*CTX-M b-lactamase gene of *Kluyvera ascorbata*. *FEMS Microbiology*, vol. 288, 247-249.
- Norman, A., Hansen, L. H. & Sorensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, vol. 364, 2275–2289.
- Novais, A., Cantón, R., Coque, T. M., Moya, A., Baquero, F. & Galán, J. (2008). Mutational events in cefotaximase extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 52, 7, 2377-2382.
- Novais, A., Comas, I., Baquero, F., Cantón, R., Coque, T. M., Moya, A., González-Candelas, F. & Galán, J. (2010). Evolutionary trajectories of beta-lactamase CTX-M-1 cluster enzymes: predicting antibiotic resistance. *Plos Pathogens*, vol. 6, 1.
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *The review on antimicrobial resistance*. Chaired by Jim O'Neill. Acedido em Abr. 19, 2017, em https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
- Oliver, A., Pérez-Díaz, J. C., Coque, T. M., Baquero, F. & Cantón, R. (2001). Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 45, 2, 616-620.
- Olson, A. B., Silverman, M., Boyd, D. A., McGeer, A., Willey, B. M., Pong-Porter, V., Daneman, N. & Mulvey, M. R. (2005). Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum β -lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 49, 2112-2115.
- OMS (2015). Global action plan on antimicrobial resistance. Acedido em Abr. 19, 2017, em: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>
- OMS (2016). Fact Sheet 194. Acedido em Abr. 17, 2017, em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
- OMS (2017). Critically Important Antimicrobials for human medicine, 5th Revision 2016. Acedido em Abr. 19, 2017, em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255027/1/9789241512220-eng.pdf?ua=1>
- Orskov, F., & Orskov, I. (1992). *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 38, 699-704.
- Oteo, J., Diestra, K., Juan, C., Bautista, V., Novais, A., Perez-Vazquez, M., Moya, B., Miro, E., Coque, T.M., Oliver, A., Canton, R., Navarro, F. & Campos, J. (2009). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 34, 173–176.
- Pai, H., Choi, E. H., Lee, H. J., Hong, J. Y., & Jacoby, G. A. (2001). Identification of CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*,

- and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 39, 10, 3747-3749.
- Pallecchi, L., Bartoloni, A., Paradisi, F. & Rossolini, G. M. (2008). Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications. *Expert Review of anti-infective therapy*, vol. 6, 725–732.
- Pallecchi, L., Lucchetti, C., Bartoloni, A., Bartalesi, F., Mantella, A., Gamboa, H., Carattoli, A., Paradisi, F. & Rossolini, G. M. (2007). Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 51, 1179–1184.
- Pardon, B., Catry, B., Dewulf, J., Persoons, D., Hostens, M., De Bleecker, K. & Deprez, P. (2012). Prospective study on quantitative and qualitative antimicrobial and anti-inflammatory drug use in white veal calves. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 67, 1027–1038.
- Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 18, 4, 657-686.
- Peleg, A. Y. & Hooper, D. C. (2010). Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. *New England Journal of Medicine*, vol. 362, 19, 1804-1813.
- Philippon, A., Labia, R. & Jacoby, G. (1989). Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 33, 1131-1136.
- Platell, J. L., Johnson, J. R., Cobbold, R. N. & Trott, D. J. (2011). Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Veterinary Microbiology*, vol. 153, 99–108.
- Poirel, L., Gniadkowski, M., & Nordmann, P. (2002). Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 50, 1031-1034.
- Poirel, L., Naas, T. & Nordmann, P. (2008). Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology Infections*, vol. 14 (Suppl 1), S75-S81.
- Poirel, L., Naas, T. & Nordmann, P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 54, 24–38.
- Pol, M. & Ruegg, P. L. (2007). Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of Gram-positive mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, vol. 90, 262-273.
- Postuma, M., Stärk, K. D., Sjölund, M., Backhans, A., Beilage, E. G., Lösken, S., Belloc, C., Collineau, L., Iten, D. & Visschers, V. (2015). Alternatives to the use of antimicrobial agents in pig production: A multi-country expert-ranking of perceived effectiveness, feasibility and return on investment. *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 118, 457–466.
- Pupo, G. M., Karaolis, D. K., Lan, R., & Reeves, P. R. (1997). Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. *Infection and Immunity*, vol. 65, 7, 2685-2692.
- Queenan, A. M. & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Review*, vol. 20, 440–458.

R version 3.3.2 (2016). The R Foundation for Statistical Computing (2016©).

Randall, L., Heinrich, K., Horton, R., Brunton, L., Sharman, M., Bailey-Horne, V., Sharma, M., McLaren, I., Coldham, N., Teale, C. & Jones, J. (2014). Detection of antibiotic residues and association of cefquinome residues with the occurrence of extended-spectrum beta-Lactamase (ESBL)-producing bacteria in waste milk samples from dairy farms in England and Wales in 2011. *Research in Veterinary Science*, vol. 96, 15–24.

Rebelo, I. B. (2014). *Riscos da alimentação de vitelos com leite não aproveitado para consumo humano*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.

Regulamento nº 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*.

Regulamento nº 1441/2007. Commission Regulation (EC) on microbiological criteria for foodstuffs. *Official journal of the EU*.

Regulamento nº 1831/2003. Regulation of the European Parliament and of the Council on additives for use in animal nutrition. *Official journal of the EU*.

Regulamento nº 429/2016/EC. Regulation of the European Parliament and of the Council on transmissible animal diseases and amending and repealing certain acts in the area of animal health. *Official journal of the EU*.

Reist, M., Geser, N., Hächler, H., Schärner, S. & Stephan, R. (2013). ESBL-producing Enterobacteriaceae: occurrence, risk factors for fecal carriage and strain traits in the Swiss slaughter cattle population younger than 2 years sampled at abattoir level. *Plos One*, vol. 8, 8. Acedido em Abr. 23, 2017, em: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0071725>

Ripoll, A., Baquero, F., Novais, A., Rodríguez-Domínguez, M. J., Turrientes, M., Cantón, R. & Galán, J. (2011). *In vitro* selection of variants resistant to b-Lactams plus b-lactamase inhibitors in CTX-M β -lactamases: Predicting the *in vivo* scenario? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 55, 10, 4530-4536.

Rodríguez, M. M., Power, P., Radice, M., Vay, C., Famiglietti, A., Galleni, M., Ayala, J. A. & Gutkind, G. (2004). Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 48, 4895-4897.

Rodriguez-Villalobos, H., Bogaerts, P., Berhin, C., Bauraing, C., Deplano, A., Montesinos, I., de Mendonca, R., Jans, B. & Glupczynski, Y. (2011). Trends in production of extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of clinical interest: results of a nationwide survey in Belgian hospitals. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 66, 37–47.

Rogers, B. A., Sidjabat, H. E. & Paterson, D. L. (2011). *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 66, 1–14.

Rollin, E., Dhuyvetter, K. C. & Overton, M. W. (2015). The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 122, 3, 257–264.

- Rossolini, G. M., D'Andrea, M. M. & Mugnaioli, C. (2008). The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 14 (Suppl. 1), S33–S41.
- Rubino, M. J. & Donham, K. J. (1984). Inactivation of Bovine Leukemia virus-infected lymphocytes in milk. *American Journal of Veterinary Research*, vol. 45, 1553–1556.
- Sandegren, L. (2014). Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, vol. 119, 103–107.
- Santman-Berends, I., Swinkels, J., Lam, T., Keurentjes, J. & van Schaik, G. (2016). Evaluation of udder health parameters and risk factors for clinical mastitis in Dutch dairy herds in the context of a restricted antimicrobial usage policy. *Journal of Dairy Science*, vol. 99, 2930–2939.
- Sasaki, Y., Sekiguchi, S., Uemura, R. & Sueyoshi, M. (2015). The effect of depopulation and restocking on reproductive and growth performances on Japanese commercial swine farms. *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 78, 333–335.
- Schaeren, W. (2006). Fakten zur Verfügung von antibiotikahaltiger Milch an Kälber. In ALP Forum (vol. 35, 1-2).
- Scherpenzeel, C., den Uijl, I., van Schaik, G., Riekerink, R. O., Hogeveen, H. & Lam, T. (2016). Effect of different scenarios for selective dry-cow therapy on udder health, antimicrobial usage, and economics. *Journal of Dairy Science*, vol. 99, 3753–3764.
- Schmid, A., Hörmansdorfer, S., Messelhäusser, U., Käsbohrer, a., Sauter-Louis, C. & Mansfeld, R. (2013). Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 79, 9, 3027–3032.
- Schuurmans, J. M., van Hijum, S. A., Piet, J. R., Handel, N., Smelt, J., Brul, S. & ter Kuile, B. H. (2014). Effect of growth rate and selection pressure on rates of transfer of an antibiotic resistance plasmid between *E. coli* strains. *Plasmid*, vol. 72, 1–8
- Sefton, A. M. (2002). Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. *Drugs*, vol. 62, 4, 557–66.
- Seiffert, S., Salome, N., Hilty, M., Perreten, V. & Endimiani, A. (2013). Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? *Drug Resistance Updates*, vol. 16, 1-2, 22-45.
- Shahid, M., Al-Mahmeed, A., Murtadha, M. M., Qareeballa, A., Eltahir, M. A., Tabbara, K. S., Ismaeel, A. I., Dar, F. K., Giha, H. A. & Bindayna, K. M. (2014). Characterization of cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae for CTX-M ESBLs in Bahrain. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 7 (Suppl. 1), S212-S216.
- Shoemaker, N. B., Vlamakis, H., Hayes, K. & Salyers, A. A. (2001). Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacterioides* spp. and among *Bacterioides* and other genera in the human colon. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, 2, 561-568.
- Shterzer, N. & Mizrahi, I. (2015). The animal gut as a melting pot for horizontal gene transfer. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 61, 603–605.

- Sidjabat, H. E., Kamolvit, W., Wailan, A. & Paterson, D. L. (2013) Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria. *Microbiology Australia*, vol. 34, 43-46.
- Silva, N., Igrejas, G., Rodrigues, P., Rodrigues, T., Gonçalves, A., Felgar, A. C., Pacheco, R., Gonçalves, D., Cunha, R. & Poeta, P. (2011). Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum b-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates in wild birds from the Azores Archipelago. *Avian Pathology*, vol. 40, 5.
- Sommer, M. O. A., Dantas, G., & Church, G. M. (2009). Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*, vol. 325, 1128–1131.
- Sommer, M. O., Church, G. M. & Dantas, G. (2010). The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. *Virulence*, vol. 1, 299–303.
- Soulsby, L. (2007). Antimicrobials and animal health: a fascinating nexus. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy*, vol. 60 (suppl. 1), S77-S78.
- Sousa, J. C. (2000). Enterobacteriaceae. In: W. F. C. Ferreira e J. C. F. Sousa (Eds.) *Microbiologia* (vol.2). LIDEL – Edições Técnicas, Lda. Lisboa, Portugal.
- Speksnijder, D. C., Jaarsma, D. A., Verheij, T. J. & Wagenaar, J. A. (2015). Attitudes and perceptions of Dutch veterinarians on their role in the reduction of antimicrobial use in farm animals. *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 121, 365–373.
- Statistisches Bundesamt (2008). Milcherzeugung und – verwendung, *Statistisches Bundesamt*, Wiesbaden, Germany.
- Stevens, M., Piepers, S., Supre, K., Dewulf, J. & De Vliegher, S. (2016). Quantification of antimicrobial consumption in adult cattle on dairy herds in Flanders, Belgium, and associations with udder health, milk quality, and production performance. *Journal of Dairy Science*, vol. 99, 2118–2130.
- Sunkara, G., Navarre, C. B. & Kompella, U. B. (1999). Influence of pH and temperature on kinetics of ceftiofur degradation in aqueous solutions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 51, 3, 249–255.
- Swann, M., Baxter, K. & Field, H. (1969). Report of the joint committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. *Her Majesty's Stationary Office*, London, UK.
- Swedres-Svarm (2015). Consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden. Acedido em Abr. 23, 2017, em: http://www.sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/om_sva/publikationer/swedres_svarm2015.pdf
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, vol. 34, 5, S3-S10.
- Tivendale, K. (2000). *Assessing the role of the virulence plasmid in avian pathogenic Escherichia coli*. B.Sc. (Hons.). Melbourne, Australia. University of Melbourne.
- Todar, K. (2002). Pathogenic *E. coli* bacterial diseases of humans. *Todar's Online Textbook of bacteriology*. Acedido em Abr. 18, 2017, disponível em: <http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html>

- Toleman, M. A., Bennett, P. M. & Walsh, T. R. (2006). ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 70, 296–316.
- Van Vleck Pereira, P. R., Siler, J. D., Bicalho, R. C. & Warnick, L. D. (2014). *In vivo* selection of resistant *E. coli* after ingestion of milk with added drug residues. *Plos One*, vol. 9.
- Växa Sverige (2014). Redogörelse för husdjursorganisationens djurhälsovård 2013/2014. Stockholm, Sweden. pp. 28–29.
- Vogt, D., Overesch, G., Endimiani, A., Collaud, A., Thomann, A., & Perreten, V. (2014). Occurrence and genetic characteristics of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in Swiss retail meat. *Microbial Drug Resistance*, vol. 20, 5, 485–494.
- Waksman, S. A. & Flynn, J. E. (1973). History of the word 'antibiotic'. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, vol. 28, 284–286.
- Wales, A. D. & Davies, R. H. (2015). Co-Selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics*, vol. 4, 567–604.
- Warren, R. E., Ensor, V. M., O'Neill, P., Butler, V., Taylor, J., Nye, K., Harvey, M., Livermore, D. M., Woodford, N. & Hawkey, P. M. (2008). Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 61, 504–508.
- Wise, R. I., Viogt, A. E., Collin, M. V. & Cranny, C. L. (1955). Origin of erythromycin-resistant strains of *Micrococcus pyogenes* in infections. *A.M.A. Archives of Internal Medicine*, vol. 95, 3, 419.
- Witte, W. (2000). Selective pressure by antibiotic use in livestock. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 16, 19–24.
- Woodford, N., Turton, J. F. & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 35, 5, 736–755.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews: Microbiology*, vol. 5, 175–186.
- Yáñez-Ruiz, D. R., Abecia, L. & Newbold, C. J. (2015). Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review. *Frontiers in Microbiology*, vol. 6, 1133.
- Yingprayoon, P. (1989). Der Einfluß der Wärmebehandlung auf den Nachweis von Antibiotika in Milch. Thesis. Freie Universität Berlin, Berlin
- Yu, W. L., Winokur, P. L., Von Stein, D. L., Pfaller, M. A., Wang, M. A. & Jones, R. N. (2002). First description of *Klebsiella pneumoniae* harboring CTX-M beta-lactamases (CTX-M-14 and CTX-M-3) in Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 46, 4, 1098–1100.
- Zeba, B. (2005). Overview of b-lactamase incidence on bacterial drug resistance. *African Journal of Biotechnology*, vol. 4, 13, 1559–1562.