



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Joana Cláudia Lourenço Martins

DETEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ISOLADOS DE ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES
A ANTIBIÓTICOS EM PRODUTOS FRESCOS
PRONTOS A CONSUMIR

Dissertação no âmbito do mestrado de Segurança Alimentar,
Microbiologia Alimentar orientada pela Professora Doutora Sara
Margarida dos Santos Domingues e coorientação pela Professora
Doutora Gabriela Jorge da Silva e apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2021

1 2 9 0



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Joana Cláudia Lourenço Martins

**DETEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ISOLADOS DE ENTEROBACTÉRIAS
RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EM PRODUTOS
FRESCOS PRONTOS A CONSUMIR**

Dissertação no âmbito do mestrado de Segurança Alimentar, Microbiologia Alimentar orientada pela Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues e coorientação pela Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Coimbra, setembro de 2021

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sob a orientação da Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues e a coorientação da Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva, no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar.

Agradecimentos

Assim dou por terminada, uma fase muito importante da minha vida, onde tive oportunidade de crescer tanto a nível pessoal como profissional. Não foi etapa fácil. Escrever este documento, foi muito mais difícil do que pensava, foi necessário bastante empenho e trabalho árduo, mas agora que estou prestes a acabar posso concluir que valeu a pena.

Contudo, antes de terminar preciso de agradecer a quem me ajudou e apoiou para que conseguisse realizar e finalizar este trabalho:

Agradeço à minha orientadora Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues, por todo o apoio e incentivo que me deu para que levasse este desafio até ao fim.

Agradeço à minha coorientadora Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva por todo o apoio e disponibilidade demonstrada na realização deste trabalho.

A ambas agradeço pelos conhecimentos transmitidos, que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Sem a vossa orientação não conseguiria terminar esta fase tão importante da minha vida.

Ao colega de laboratório e doutorando Tiago Lima, por toda a ajuda que me deu, e que para mim foi muito importante na realização deste trabalho. Agradeço por toda a atenção dispensada, e principalmente pelo auxílio nos momentos em que mais precisei.

À Sandra Ferreira, assistente do laboratório, pela colaboração e apoio ao longo da realização da parte laboratorial deste estudo, por toda atenção prestada e por alegrar os meus dias.

Aos meus amigos mais próximos, por não me deixarem desistir e motivarem sempre que necessitei.

Por último, mas não menos importante: à minha Família, o meu pilar, que me ajuda sempre a seguir o meu caminho. Sem eles nada disto seria possível.

Este trabalho foi divulgado através de uma comunicação em poster no World Microbe Forum, 2021 (Anexo I).

Índice

Índice de Tabelas-----	iii
Índice de Figuras -----	iv
Lista de Abreviaturas-----	v
Resumo -----	vi
Abstract -----	viii
1. Introdução-----	1
1.1. Segurança Alimentar-----	1
1.2. A cadeia alimentar e o risco da transmissão de bactérias potencialmente patogênicas e da sua resistência aos antibióticos -----	1
1.3. Bactérias Gram-negativo-----	3
1.4. Antibióticos-----	4
1.4.1. Mecanismos de resistência -----	4
1.4.2. Transferência horizontal de genes -----	5
1.4.3. Antibióticos beta-lactâmicos -----	7
1.4.3.1. Mecanismo de ação dos beta-lactâmicos-----	9
1.4.3.2. Mecanismo de resistência dos beta-lactâmicos -----	9
1.4.4. Colistina-----	12
1.4.4.1. Mecanismo de ação da colistina -----	13
1.4.4.2. Mecanismos de resistência à colistina -----	13
1.5. A resistência a antibióticos e a microbiota intestinal-----	13
1.6. Enterobactérias resistentes a antibióticos-----	14
1.7. Objetivos-----	17
2. Metodologias-----	18
2.1. Recolha de amostras-----	18
2.2. Processamento das amostras -----	18
2.3. Identificação presuntiva de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> .-----	20
2.4. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos-----	21
2.5. Identificação das espécies bacterianas-----	22
2.5.1. Identificação fenotípica de bacilos Gram-negativo -----	22
2.5.2. Extração de ADN -----	22
2.5.3. Reação em cadeia da Polimerase -----	23
2.5.4. Eletroforese -----	23
2.5.5. Sequenciação e análise das sequências -----	23
2.5.6. Deteção de genes <i>mcr</i> -----	24

3. Resultados-----	25
3.1. Identificação presuntiva de colónias nas amostras-----	25
3.2. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos -----	26
3.2.1. Avaliação da suscetibilidade aos beta-lactâmicos pelo método de difusão em disco -----	26
3.2.2. Avaliação da suscetibilidade à colistina pelo método de microdiluição-----	27
3.3. Identificação da espécie -----	28
3.3.1. Amplificação parcial de sequências de <i>16S rARN</i> por reação de polimerase em cadeia. -----	28
3.3.2. Identificação das espécies por sequenciação Sanger-----	29
4. Discussão -----	31
5. Conclusão -----	36
Referências Bibliográficas-----	37
Anexo I-----	45

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação de Ambler com a respetiva correspondência à classificação de Bush-Jacoby, caracterização das beta-lactamases, e perfil do inibidor (26, 19) -----	10
Tabela 2 - Descrição e caracterização das amostras-----	19
Tabela 3 - Identificação dos <i>primers</i> universais de <i>16S rARN</i> -----	23
Tabela 4 - Identificação dos <i>primers mcr</i> -----	24
Tabela 5 - Resultados da identificação presuntiva de colónias de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> -----	25
Tabela 6 - Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em disco-----	26
Tabela 7 - Valores das concentrações mínimas inibitórias das bactérias em estudo -----	27
Tabela 8 - Identificação da espécie bacteriana com o respetivo perfil de suscetibilidade antimicrobiana-----	29
Tabela 9 - Identificação da espécie bacteriana com o respetivo valor da concentração mínima inibitória-----	30

Índice de Figuras

Figura 1- Representação da parede celular de uma bactéria Gram-negativo.	3
Figura 2- Representação dos mecanismos da transferência horizontal de genes.. . . .	6
Figura 3- Ilustração da estrutura química das classes dos antibióticos Beta-lactâmicos.	7
Figura 4 - Colocação dos antibióticos beta-lactâmicos na caixa de petri com gelose Mueller-Hinton.	21
Figura 5 - Imagem representativa dos resultados da amplificação parcial de sequências de 16S rARN por reação de polimerase em cadeia.	28

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AMC – Amoxicilina/Ácido clavulânico

ARN – Ácido ribonucleico

AZT – Aztreonam

BGN – Bactéria Gram-negativo

BGP – Bactéria Gram-positivo

CFZ – Ceftazidima

CMI – Concentração mínima inibitória

COL – Colistina

CTX – Cefotaxima

EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica

ESBL – Beta-lactamases de largo espectro de ação *do inglês Extended-spectrum beta-lactamases*

FOX – Cefoxitina

GRA– Genes de Resistência Antimicrobiana

IMP – Imipenemo

L-Ara4N – A 4-amino-4-desoxi-L-arabinose

LPS – Lipopolissacarídeos

pb – Pares de bases

PBP – Proteínas de ligação à penicilina *do inglês Penicillin-binding-proteins*

PCR – Reação de polimerase em cadeia *do inglês Polymerase chain reaction*

PEtN – Fosfoetanolamina

rpm – Rotação por minuto

THG – Transferência Horizontal de Genes

UFC – Unidade formadora de colónia

UV – Ultravioleta

Resumo

A resistência antimicrobiana é atualmente uma das maiores ameaças à saúde pública, particularmente as Enterobactérias multirresistentes aos antibióticos. Os genes de resistência aos antibióticos (GRA) podem passar através da cadeia alimentar para a microbiota humana ou para bactérias potencialmente patogénicas. Os produtos frescos prontos a consumir representam um risco acrescido na disseminação de GRAs, uma vez que estes alimentos são consumidos sem nenhum processamento adicional. O objetivo deste estudo visa compreender se os produtos frescos prontos a consumir, representam um importante veículo de transmissão de bactérias Gram-negativo resistentes aos antibióticos para os seres humanos.

Quarenta e duas amostras de diversos alimentos prontos a consumir, como saladas preparadas de frutas e vegetais, foram adquiridas em supermercados portugueses e processadas com e sem enriquecimento. As bactérias foram isoladas em gelose MacConkey com cefotaxima (CTX; 1 µg/mL) e colistina (COL; 2 µg/mL). O perfil de suscetibilidade antimicrobiana para seis antibióticos beta-lactâmicos foi determinado pelo método de difusão em disco e para COL pelo método de microdiluição em caldo. Das bactérias isoladas, foram selecionadas as que apresentaram uma ou mais resistência aos antibióticos, e /ou exposição aumentada a algum destes, para posteriormente se realizar a amplificação parcial do *16S rARN* por reação em cadeia da polimerase. Dessas, 25 foram selecionadas para identificação molecular por sequenciação pelo método de Sanger; as sequências foram analisadas no Sequencher 5.0 (Gene Codes) e identificadas através do BLAST e GenBank.

Através da seleção com CTX, foram identificadas maioritariamente espécies de Enterobactérias ambientais, como *Rahnella* spp., com reduzida suscetibilidade a CTX, *Citrobacter portucalensis*, resistente à cefoxitina e amoxicilina/ácido clavulânico (FOX, AMC), e *Klebsiella oxytoca*, com resistência a AMC, CTX, FOX e aztreonam (AZT).

Pela seleção com COL, identificou-se um isolado de *Yersinia enterocolitica*, suscetível a todos os antibióticos em estudo. As espécies de *Rahnella* spp. e *Serratia* spp., também foram identificadas através desta seleção, apresentando resistência à COL.

Neste estudo, não se verificou a presença das Enterobactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* nas amostras. Porém foi identificada uma bactéria patogénica oportunista, *Klebsiella oxytoca*, e ainda um isolado de *Yersinia enterocolitica* responsável por gastroenterites graves no ser humano, embora não se tenha verificado se correspondia ao serótipo patogénico.

Os resultados obtidos demonstram a importância da avaliação microbiológica dos produtos frescos prontos a consumir, assim como necessidade da realização de mais estudos para estes alimentos, de modo a colmatar dúvidas e lacunas existentes sobre tema, tais como, a minimização de contaminação cruzada ao longo da cadeia alimentar, e perceber se existem outros parâmetros de avaliação microbiológica que devem ser reavaliados ou inseridos na legislação.

Palavras-chave: produtos frescos prontos a consumir; resistência antimicrobiana; Enterobactérias

Abstract

Antimicrobial resistance is one of the current public health threats, particularly multidrug resistant Enterobacteriaceae. Antibiotic resistance genes (ARGs) may pass through the food chain to the human microbiome or to human pathogens. Ready to eat (RTE) vegetables represent an increased risk in the dissemination of ARGs, as the food is consumed without further manipulation. The aim of this study was to understand if RTE foods represent an important vehicle for the transmission of antibiotic-resistant bacteria to humans.

Forty-two RTE fresh products samples were acquired from Portuguese supermarkets and processed with and without enrichment. The bacteria were isolated in MacConkey agar with cefotaxime (CTX; 1 µg/mL) or colistin (COL; 2 µg/mL). The antimicrobial susceptibility profile for six β-lactam antibiotics was determined by disk diffusion and for COL by broth microdilution. Selected isolates, with one or more antibiotic resistance and/or increased exposure, were identified by *16S rARN* amplification by polymerase chain reaction and Sanger sequencing; sequences were analysed in Sequencher 5.0 (Gene Codes) and identified with BLAST and GenBank.

The results under CTX selection showed the prevalence of environmental Enterobacteriaceae, such as *Rahnella* spp. that showed reduced susceptibility to CTX, *Citrobacter portucalensis* resistant to cefoxitin (FOX) and amoxicillin/clavulanic acid (AMC), and *Klebsiella oxytoca*, which was resistant to AMC, CTX, FOX and aztreonam (AZT).

Under COL selection we identified one *Yersinia enterocolitica*, susceptible to all antibiotics in this study. *Rahnella* and *Serratia* species were also identified, and showed resistance to COL.

In this study, the presence of Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* was not found in the samples. However, an opportunistic pathogenic bacterium, *Klebsiella oxytoca*, was identified, as well as an isolate of *Yersinia enterocolitica*, responsible for severe gastroenteritis in humans, though it was not verified if it corresponded to the pathogenic serotype. The results obtained demonstrate the importance of the microbiological assessment of ready-to-eat fresh produce, as well as the need for further studies to be carried out on these foods, to resolve doubts and gaps that exist on this subject, such as minimising cross-contamination along the food chain, and to understand whether there are other microbiological assessment parameters that should be reassessed or included in the legislation.

Keywords: ready-to-eat fresh produce; antimicrobial resistance; Enterobacteriaceae bacteria

I. Introdução

I.1. Segurança Alimentar

A segurança alimentar é um dos principais objetivos mundiais de acordo com a Organização Mundial de Saúde, tendo como finalidade assegurar uma quantidade de alimentos suficientes para toda a população mundial, assim como a sua qualidade organoléptica e nutricional, de modo que estes não causem qualquer tipo de dano ao consumidor (1).

Também é verídica a dificuldade existente para ser cumprido este objetivo, tanto pelo crescimento populacional, como pela dificuldade de controlo das inúmeras contaminações, diretas ou indiretas, que podem ocorrer ao longo da cadeia alimentar (2).

É uma realidade atual que as doenças de origem alimentar, representam um grande problema de saúde pública a nível mundial, e cada vez mais a sociedade se mostra preocupada em assegurar o cumprimento das normas e legislação em vigor.

I.2. A cadeia alimentar e o risco da transmissão de bactérias potencialmente patogénicas e da sua resistência aos antibióticos

Atualmente, a nossa sociedade apresenta uma diversidade de estilos de vida, e escolhas alimentares, que são bastante impactantes a nível da produção alimentar (3). Estes fatores despoletaram um aumento do consumo de vegetais e frutas (4), que são saudáveis, não só devido à sua baixa densidade energética como fornecem muitos dos nutrientes que o corpo necessita, incluindo vitaminas, minerais e antioxidantes (5).

Para além disso, tem sido possível observar nas últimas décadas, a aposta do mercado no consumo de alimentos pré-preparados/prontos-a-consumir, devido não só à sua conveniência, mas também à poupança de tempo que oferece ao consumidor (6, 4). A indústria alimentar, teve a necessidade de se adaptar à sociedade, não só a nível das grandes empresas de venda de comida, das cantinas, mas também a nível individual, ou seja, a comida que compramos para nossa casa. Os supermercados, atualmente, oferecem uma vasta gama de alimentos prontos a consumir, como fruta já cortada, produtos que precisam de pouca preparação em casa, tais como saladas, que apenas precisamos de colocar no prato e temperar, ou alimentos preparados no próprio estabelecimento à vista do consumidor, como sushi (3). Apesar de todos estes alimentos serem processados de acordo com as normas de segurança alimentar exigida ao mercado, é difícil não pensar que existem questões que estamos a colocar em segundo plano (7).

De acordo com os fatores abordados anteriormente, notou-se um aumento de produção de vegetais e frutas, implicando implicitamente a utilização de novas técnicas de modo que a sua produção seja extremamente produtiva, e que assim os produtores consigam responder à exigência do mercado, durante todo ano, mesmo com produtos sazonais (3).

A exposição a contaminantes fecais mediada por práticas agrícolas específicas, como por exemplo, fertilização das culturas com estrume, ou acidentalmente, com água superficial contaminada com fezes, são as principais fontes de contaminação dos produtos vegetais. Existem também outras fontes potenciais, como solo e poeira, provenientes de produções vizinhas, animais, vida selvagem, artrópodes, trabalhadores, equipamentos contaminados e água recuperada, cada vez mais usada como água de irrigação em áreas áridas e semiáridas. Também as culturas protegidas, cultivadas em túneis baixos e estufas, apesar de estarem menos expostas à contaminação do ambiente externo, podem ser contaminadas com a água de irrigação, estrume e pelos trabalhadores (8).

No entanto, a cadeia alimentar não consiste apenas na produção agrícola, mas sim numa vasta interação de diversos intervenientes ao longo do processamento do alimento (9).

Aquando da chegada do produto ao consumidor final, este já passou por diversas etapas importantes, como o transporte, a distribuição, o seu processamento, e todos estes fatores podem comprometer a qualidade e segurança do alimento (9).

Focando nos alimentos prontos a consumir, e principalmente frutas e vegetais consumidos crus ou com pouco processamento, muitas vezes são divulgados como produtos livres de microrganismos patogénicos (6). No entanto, cada produto alimentar tem a sua própria microbiota, e apesar desta não ser potencialmente patogénica para o consumidor, pode representar um potencial risco, por exemplo, para indivíduos imunocomprometidos (10). Para além disso a utilização excessiva de antibióticos na antibioterapia humana, na produção animal e agrícola, assim como a utilização de fertilizantes orgânicos contendo resíduos de antibióticos, tem levado ao aumento de bactérias resistentes a antibióticos, com genes de resistência com capacidade de disseminação entre populações bacterianas, em alimentos de origem vegetal (11).

Este tornou-se um dos maiores problemas globais da atualidade, não só a nível clínico, mas também animal e ambiental, devendo ser abordado do ponto de vista de Uma Só Saúde (12) Uma das vias de disseminação de resistência inclui a cadeia alimentar, onde são transmitidas bactérias ambientais, comensais e também bactérias patogênicas dos alimentos para o Homem, contribuindo para o aumento da ineficácia do tratamento das infecções bacterianas com antibióticos (13).

1.3. Bactérias Gram-negativo

As bactérias de Gram-negativo (BGN) estão intrinsecamente relacionadas a um dos maiores problemas de saúde pública, devido à elevada disseminação de resistência aos antibióticos entre bactérias da mesma ou diferente espécie. Estas bactérias têm uma parede celular característica (Figura 1), que consiste em três camadas: a membrana externa, que serve de proteção e as distingue das bactérias de Gram-positivo (BGP), sendo constituída por fosfolípidos, dando-lhe a sua integridade, por lipopolissacarídeos (LPS), que se encontram ligados ao lado externo da membrana, e por proteínas da membrana externa, como por exemplo as porinas, que permitem a passagem de pequenas moléculas, como aminoácidos e pequenos sacarídeos; a segunda camada, é constituída por peptidoglicano, que determina a forma da célula; e por fim, a terceira camada que se designa, por membrana interna, uma bicamada fosfolipídica responsável por diversos processos multifuncionais, como estrutura, transporte, e biossíntese (14).

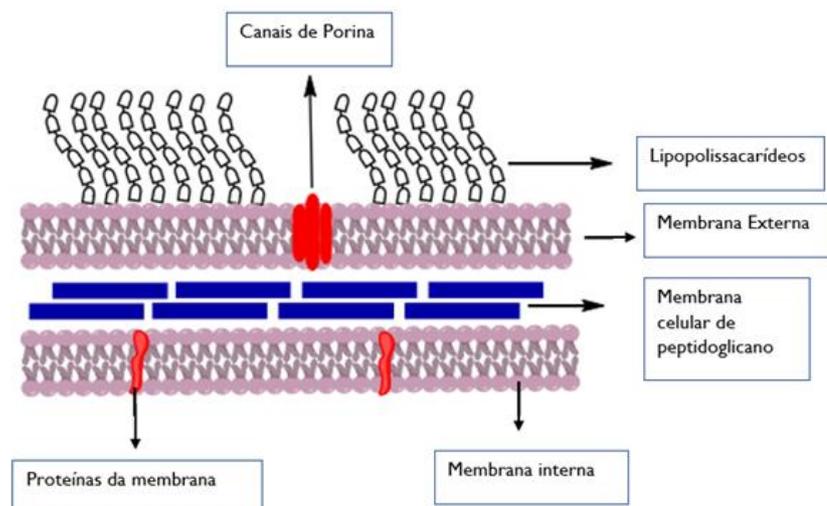


Figura 1- Representação da parede celular de uma bactéria Gram-negativo (14).

1.4. Antibióticos

Uma das maiores revoluções da medicina moderna aconteceu quando Alexander Fleming, em 1928, descobriu a primeira substância natural produzida por um fungo (*Penicillium notatum*) com propriedades antibacterianas, identificada como penicilina (15). Na década de 1930, estes compostos de origem microbiana, designados por antibióticos, eram utilizados para tratar e prevenir doenças de origem humana e animal, sendo que cerca de 20 anos depois se percebeu a capacidade destes para promover o crescimento animal produzido para a alimentação humana (16).

O antibiótico é uma molécula natural ou sintética que mata (bactericida) ou inibe (bacteriostático) o crescimento de bactérias, não exerce atividade biológica no organismo humano, e é utilizado na prevenção e tratamento de doenças infecciosas bacterianas. A classificação e agrupamento dos antibióticos são atribuídos tendo em conta os mecanismos de ação, estrutura química, origem biológica e o seu uso terapêutico (17). Os antibióticos que pertencem à mesma classe, têm mecanismo de ação idênticos, assim como os mecanismos de resistência e nível de toxicidade são também semelhantes (18, 19). Quando o antibiótico tem atividade contra um número limitado de espécies bacterianas, designa-se por espectro reduzido; quando a eficácia dos antibióticos abrange várias espécies ou géneros bacterianos, estes designam-se de antibióticos de largo espectro de ação (17).

1.4.1. Mecanismos de resistência

A resistência bacteriana não ocorre de uma forma uniforme, ou seja, uma espécie ou grupo de bactérias não será totalmente suscetível ou resistente a certos tipos de antibióticos. Para existir resistência a antimicrobianos, esta pode derivar de um processo natural ou adquirido. Caso seja um processo natural ou intrínseco, este caracteriza-se pela capacidade inata de resistência das bactérias aos antibióticos, associado às características funcionais ou estruturais inerentes das bactérias, que se opõem à ação do antibiótico, resultando assim na sua ineficácia (20). Deriva especialmente da permeabilidade da membrana externa da bactéria, particularmente nas BGN, mas também da atividade natural das bombas de efluxo e está presente em todos os elementos de uma espécie ou género. Quanto à resistência adquirida, esta está presente apenas em alguns isolados de uma espécie, advindo de mutações no ácido desoxirribonucleico (ADN) cromossómico da bactéria, ou através da aquisição de material genético exógeno, pela transferência horizontal de genes (THG) (21). A resistência adquirida pode ser temporária ou permanente, estando a THG maioritariamente associada à

transmissão de genes presentes em elementos genéticos móveis, enquanto as mutações ocorrem em genes cromossomais, surgindo naturalmente ou sendo induzidas por fatores de stress, tais como radiação ultravioleta (UV), agentes químicos ou falta de nutrientes no meio (20).

Uma causa muito importante de resistência antimicrobiana é a exposição das bactérias a concentrações subinibitórias de certos antibióticos, provocando uma seleção natural sucessiva nas gerações de estirpes hipermutáveis, que conseqüentemente irão aumentar a capacidade de adquirir resistência a diversos agentes antimicrobianos, assim como promover a mobilidade de elementos genéticos de resistência (20).

1.4.2. Transferência horizontal de genes

As bactérias possuem os seus próprios mecanismos de resistência aos antibióticos, mas a THG está relacionada com a disseminação de genes entre estirpes e/ou espécies (22), sendo considerado um dos maiores mecanismos da evolução bacteriana. A maioria dos agentes antimicrobianos utilizados a nível clínico, são compostos derivados de moléculas naturalmente presentes no ambiente. O facto de existir partilha do meio entre estes compostos naturais e as bactérias, além de ser um determinante do nível genético relativamente a resistências intrínsecas, também está relacionado à aquisição de material genético em bactérias clinicamente relevantes (23).

A THG, é a passagem de material genético entre células pertencentes à mesma geração, sendo um processo comum entre bactérias, incluindo entre espécies geneticamente não relacionadas. Os eventos de THG permitem uma rápida disseminação de genes de resistência, permitindo às bactérias evoluir e adaptarem-se às condições ambientais (24). Os três mecanismos principais de THG incluem a conjugação, a transformação natural e a transdução (Figura 2), envolvendo elementos genéticos móveis como plasmídeos e bacteriófagos (20, 25).

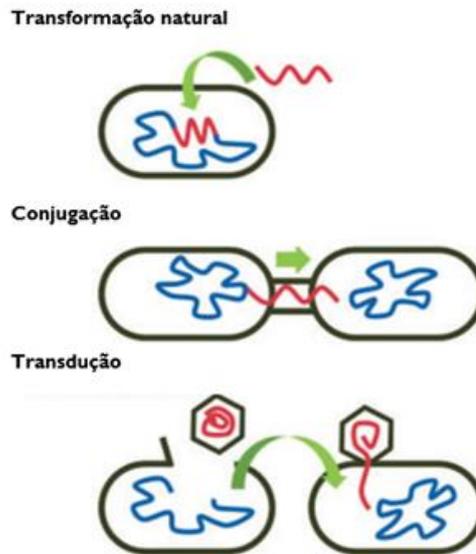


Figura 2- Representação dos mecanismos da transferência horizontal de genes (24).

Na conjugação ocorre uma transferência direta de material genético, na forma de plasmídeos ou elementos conjuntivos integrados, entre as bactérias, sendo essencial o contacto célula-a-célula, através de *pili* sexuais, podendo estar na forma de ADN em cadeia dupla ou simples (26). Este é considerado o mecanismo mais eficiente na disseminação de genes de resistência antimicrobiana, e ocorre a um nível elevado no trato gastrointestinal de indivíduos em tratamentos com antibióticos (27).

A transformação natural consiste na incorporação de material genético a partir do meio envolvente; um fragmento de ADN livre é captado e integrado no genoma da bactéria recetor, que tem de se encontrar no estado de competência (26).

À transferência de genes mediada por bacteriófagos dá-se o nome de transdução, consistindo na aquisição de material genético da bactéria dadora infetada por vírus pela bactéria recetora. Neste mecanismo não é requerido contato célula-a-célula e o ADN encapsulado no fago é protegido, sendo bastante persistente às diversas condições ambientais (26).

1.4.3. Antibióticos beta-lactâmicos

Os beta-lactâmicos são os antibióticos mais utilizados a nível mundial, incluem as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenemos e inibidores de beta-lactamases. A estrutura química que distingue a classe dos antibióticos beta-lactâmicos das restantes é o anel beta-lactâmico, sendo que cada grupo desta classe de antibióticos difere devido a radicais adicionais exclusivos de cada uma (Figura 3). Para além disso, e na generalidade, esta classe tem um espectro de ação alargado, ou seja, atua sobre uma grande variedade de espécies bacterianas.

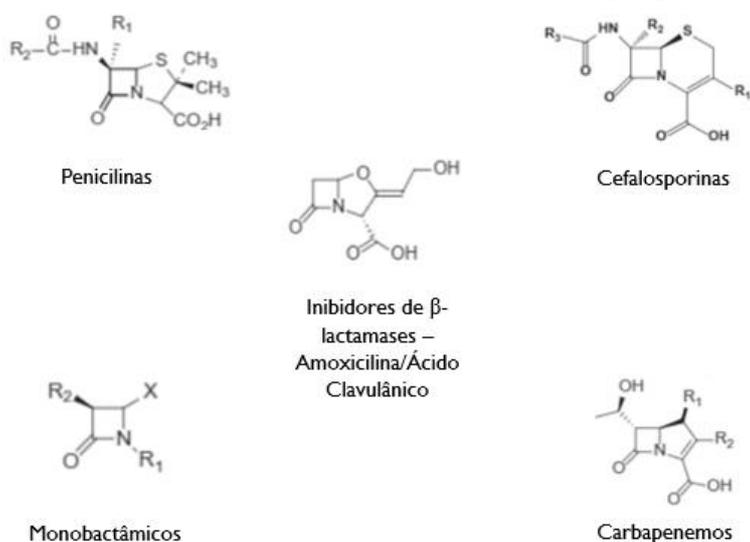


Figura 3- Ilustração da estrutura química das classes dos antibióticos Beta-lactâmicos (15).

O grupo das penicilinas, para além de fazer parte da classe dos antibióticos beta-lactâmicos, foi o primeiro grupo a ser utilizado a nível clínico, com o antibiótico denominado por penicilina G, principalmente no tratamento de infeção por estreptococos (28). Este grupo é, normalmente dividido em cinco classes, tendo como base de divisão a atividade antibacteriana, embora na mesma classe seja possível que um composto seja mais ativo que outro: penicilinas naturais – penicilina G e V; penicilinas resistentes às penicilinases – meticilina, nafcilina e isoxazoliol; aminopenicilinas – amoxicilina e ampicilina; carboxipenicilinas – carbenicilina e ticarcilina; e acil-ureidopenicilinas – azlocilina, mezlocilina e piperacilina. A classe das aminopenicilinas tem um espectro de ação igual à Penicilina G, para além de possuírem atividade contra cocos Gram-negativo e Enterobactérias não produtoras de beta-lactamases (29).

As cefalosporinas, foram introduzidas após a descoberta da cefalosporina C, que é naturalmente estável à penicilinase, revelando grande interesse para o tratamento de infecções provocadas por *Staphylococcus aureus*, tendo em conta que esta bactéria é um patógeno produtor de penicilinase (28). Neste grupo a divisão é por gerações, existindo atualmente 5 gerações de cefalosporinas (30), em que a primeira tem maior atividade nas BGP, e as maiores gerações tem mais atividade contra as BGN (23). A segunda geração de cefalosporinas, em que está inserido o antibiótico cefoxitina, normalmente apenas é utilizada como segunda opção, para, por exemplo, infecções de pele e respiratórias, devido à sua estabilidade contra bactérias produtoras de algumas beta-lactamases. No entanto, é a terceira geração de cefalosporinas, da qual fazem parte os antibióticos cefotaxima e ceftazidima, quem tem um espectro de ação mais elevado contra as beta-lactamases, fazendo deste grupo um importante meio de combate a infecções bacterianas, provocadas por bactérias multirresistentes (23). Além disso, existem ainda as cefalosporinas de quarta geração usadas como um último recurso terapêutico em algumas infecções. Tem um espectro de ação, para as BGP, idêntico à da primeira geração, e para BGN semelhante às da de terceira geração, contudo, tem maior resistência às beta-lactamases. Por fim, existe as cefalosporinas de quinta geração, com elevada atividade contra estafilococos meticilina-resistentes (31).

Os monobactâmicos são um grupo de antibióticos com um espectro de ação contra Enterobactérias aeróbias e *Pseudomonas aeruginosa* (15), e são relativamente estáveis contra as beta-lactamases. O aumento de bactérias resistentes a este grupo tornou-se uma condicionante para a utilização destes antibióticos, em que apenas o aztreonam é legislado para uso humano, sendo ainda utilizado em doentes com alergia à penicilina, pois o seu perfil de toxicidade bacteriana é idêntico aos outros grupos de antibióticos beta-lactâmicos (32). Relativamente ao grupo dos carbapenemos, usualmente são apenas utilizados em casos em que os doentes estão extremamente debilitados pela infeção, uma vez que existe a necessidade de preservar a sua eficácia o máximo possível (33). A sua estrutura química confere-lhes uma proteção e estabilidade contra a grande maioria das beta-lactamases, como as beta-lactamases de largo espectro de ação (ESBL) e as AmpC (15,33). O antibiótico imipenemo, tem sido um dos mais utilizados, no tratamento de infeções cuja causa ocorre por bactérias BGP, BGN, não fermentadoras, e anaeróbias devido à sua atividade contra estes microrganismos (15), porém existem bactérias patogénicas GN, como *Klebsiella pneumoniae*, que conseguem produzir carbapenemases que tornam estes antibióticos menos eficazes.

Os inibidores de beta-lactamases, são normalmente utilizados em conjugação com antibióticos beta-lactâmicos. O primeiro composto a ser identificado, foi o ácido clavulânico, proveniente naturalmente de *Streptomyces clavuligerus*, sendo um inibidor com um amplo espectro de atividade nas penicilinas de estafilococos, e na maioria das penicilinas codificadas por plasmídeos presentes nas bactérias entéricas, inclusive as enzimas TEM e SHV, e é também eficiente para as ESBL (28).

1.4.3.1. Mecanismo de ação dos beta-lactâmicos

O mecanismo de ação dos antibióticos beta-lactâmicos consiste na inibição da síntese da parede celular bacteriana na fase parietal, tendo um efeito bactericida.

A ação dos antibióticos beta-lactâmicos está relacionada com o anel beta-lactâmico que caracteriza este grupo. Estes têm como alvo as proteínas de ligação à penicilina (PBPs) - um grupo de enzimas presentes na membrana celular, que estão envolvidas na ligação entre as cadeias peptídicas (*cross-link*) do peptidoglicano na parede celular bacteriana, conferindo-lhe forma e rigidez. A ligação covalente entre o antibiótico e as diferentes PBPs, irá impossibilitá-las de participar na síntese da parede celular, levando à lise celular da bactéria. É ainda necessário ter em atenção que existem diferentes tipos de PBPs, que apresentam funções distintas nas diversas espécies bacterianas, assim como cada subclasse dos antibióticos beta-lactâmicos apresenta diferentes afinidades para estas enzimas (15).

1.4.3.2. Mecanismo de resistência dos beta-lactâmicos

A resistência aos antibióticos beta-lactâmicos está relacionada com quatro mecanismos diferentes (20). O mecanismo mais importante de resistência aos beta-lactâmicos ocorre devido à inativação enzimática do antibiótico por beta-lactamases. Outros mecanismos incluem a alteração do alvo do antibiótico, havendo alterações das PBPs por mutações ou aquisição de PBPs alteradas, com modificação da sua afinidade; a redução da permeabilidade da parede celular das bactérias, relacionado com alterações nas porinas, impedindo o antibiótico de atingir o seu alvo; e a atividade de bombas de efluxo, que permitem bombear o antibiótico do meio intracelular para o extracelular, levando a uma redução da sua concentração intracelular (25).

A ação enzimática pelas beta-lactamases consiste na hidrólise de alvos específicos na estrutura do anel beta-lactâmico, impossibilitando que os antibióticos se liguem às PBPs, sendo a sua produção codificada geneticamente no cromossoma das bactérias e nos plasmídeos (20, 34).

Existem duas formas de classificação para as beta-lactamases, ambas aceitas globalmente: a classificação molecular (Ambler) e a funcional (Bush-Jacoby) (20). De acordo com a classificação de Ambler, existem 4 grupos distintos, baseados nas sequências de aminoácidos, designados de A-D, enquanto na classificação de Bush-Jacoby existem 3 grupos, designados de 1 a 3, e vários subgrupos, baseados na função das beta-lactamases (Tabela 1). Na classe A, a que correspondem os subgrupos 2a, 2b, 2be, 2br, 2e e 2f, as enzimas apresentam um resíduo de serina no seu sítio catalítico. Na classe B, que corresponde ao grupo 3 da classificação de Bush-Jacoby, encontram-se as enzimas metalo-beta-lactamases, devido à presença de um íon metálico, normalmente o íon zinco, como cofator. Pertencem à classe C, do grupo 1 de Bush-Jacoby, as enzimas cefalosporinas. Por fim, existe a classe D, que correspondem os grupos 2d e 2df da classificação Bush-Jacoby, as enzimas oxacilinas. A tabela 1 resume o perfil hidrolítico das várias beta-lactamases (28).

Tabela 1- Classificação de Ambler com a respetiva correspondência à classificação de Bush-Jacoby, caracterização das beta-lactamases, e perfil do inibidor (28, 20).

Classificação de Ambler – Classe molecular ou subclasse	Classificação de Bush-Jacoby – Grupo funcional ou subgrupo	Caracterização das beta-lactamases	Perfil do inibidor
A	2a	Penicilinas que hidrolisam as Penicilinas	Ácido clavulânico e tazobactamo
	2b	Penicilinas que hidrolisam as Penicilinas, e as Cefalosporinas.	Ácido clavulânico e tazobactamo
	2be	ESBL que hidrolisam as penicilinas, as cefalosporinas, inclusive as cefalosporinas de largo espectro e os monobactâmicos.	Tazobactamo, ácido clavulânico e avibactam.
	2br	Enzimas resistentes ao ácido clavulânico, hidrolisam as penicilinas e as cefalosporinas.	Tazobactamo e avibactam.
	2e	ESBL cefalosporinas, hidrolisam as cefalosporinas de largo espectro.	Ácido clavulânico e tazobactamo.

	2f	Enzimas carbapenemases, hidrolisam todos os antibióticos beta-lactâmicos aprovados.	Avibactam, relebactam e varbobactam.
	2f	Enzimas carbapenemases, hidrolisam a penicilina, cefalosporinas, carbapenemos e os monobactâmicos, mas não as cefalosporinas de largo espectro.	Ácido clavulânico, avibactam e varbobactam.
B1, B3	3a	Enzimas metalolactamases, devido à presença de um íon metálico, normalmente o íon zinco, e as carbapenemases. Hidrolisam as penicilinas, carbapenemos e cefalosporinas.	Apenas são inibidas pelo EDTA.
B2	3b	Subgrupo do anterior, hidrolisam preferencialmente os carbapenemos.	Apenas são inibidas pelo EDTA.
C	I	Enzimas cefalosporinases (<i>AmpC</i>), hidrolisam as penicilinas e cefalosporinas, sendo mais eficazes na segunda.	Aztreonam, avibactam e varbobactam.
D	2d	Enzimas oxacilinases, hidrolisam essencialmente as penicilinas.	Pouco inibidas pelo ácido clavulânico, varia consoante a enzima.
	2df	Enzimas carbapenemases, hidrolisam as penicilinas e os carbapenemos.	Avibactam.

Denominam-se por ESBL as enzimas capazes de hidrolisar os antibióticos beta-lactâmicos, como a penicilina, mas também cefalosporinas de 1^a, 2^a e 3^a geração e aztreonam, tornando-os ineficazes (35). São um dos principais mecanismos de resistência utilizados pelas BGN, e principalmente pelas Enterobactérias. Os genes que codificam estas enzimas de resistência estão normalmente localizados em plasmídeos, daí que a sua disseminação ocorra pela mediação destes, entre as diversas espécies de bactérias (36). Os genes ESBL mais comuns são *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, sendo que a família TEM e SHV derivam dos *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-2} e *bla*_{SHV}.

i, com um espectro hidrolítico limitado, mas apenas com uma diferença de aminoácido entre si, levando a um perfil de substrato amplificado. Estes genes foram identificados e sequenciados primeiramente em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, mas posteriormente também em outros membros da família das Enterobactérias, como *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Morganella morganii* e *Enterobacter* spp. (37).

As AmpC, são cefalosporinases clinicamente importantes, codificadas nos cromossomas de muitas Enterobactérias e outros microrganismos, onde funcionam como mediadores da resistência à cefalotina, cefazolina, cefoxitina, à maioria das penicilinas e combinações de inibidores de beta-lactamases/antibiótico beta-lactâmico (38). Normalmente são codificadas nos cromossomas, mas também podem ser mediadas por genes plasmídicos. Em espécies como *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp., as enzimas *ampC* são induzíveis após a sua exposição aos antibióticos beta-lactâmicos. Os genes *ampC* incluem *bla_{CMY}*, *bla_{ACT}*, *bla_{DHA}*, *bla_{LAT}*, *bla_{BIL}*, *bla_{FOX}* e *bla_{MIR}* (37, 38).

Por fim, existem as carbapenemases, com capacidade de hidrolisar quase todos os antibióticos beta-lactâmicos, assim como resistentes à ação dos inibidores de beta-lactamases, codificadas pelos genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA}* e *bla_{NDM}* (39, 40).

O facto de existir este tipo de mecanismo, que confere às bactérias resistências a uma elevada variedade de antibióticos, faz com que tratamentos a certas infeções bacterianas não sejam eficazes, podendo resultar na morte dos doentes.

1.4.4. Colistina

Este antibiótico começou a ser utilizado há mais de 50 anos, embora a sua utilização parentérica generalizada tenha sido abolida, devido a apresentar reações adversas, de nefrotoxicidade e neurotoxicidade, tornando-se exclusiva para o tratamento de doentes com fibrose cística. Contudo a administração da colistina, por via oral e tópica, manteve-se na prática clínica, sendo principalmente aplicada para uso veterinário (41). Atualmente a colistina é utilizada como um dos últimos recursos, na terapia humana, para infeções bacterianas originadas por bacilos Gram-negativo, multirresistentes, inclusive com resistência aos carbapenemos (42, 41). Tem duas formas de apresentação disponíveis no mercado, o sulfato de colistina, que pode ser administrado por via oral, tópica e inalatória, sendo a via oral de uso exclusivo para tratamento de infeções intestinais por bacilos Gram-negativo, pois este antibiótico não é absorvido no trato gastrointestinal, tratando-se de um bactericida local. A outra forma é o colistimetato de sódio, um profármaco, que pode ser administrado por via parentérica ou inalatória (43).

1.4.4.1. Mecanismo de ação da colistina

O mecanismo de ação deste agente antimicrobiano consiste na ligação através da interação electrostática de grupos fosfato do lípido A, de carga negativa, que são componentes importantes do LPS da membrana externa das BGN, com os grupos amina livres de colistina, de carga positiva (43). Com esta interação, ocorre o desencadeamento de uma troca catiónica, em que a colistina substitui os catiões divalentes de cálcio e magnésio, que são imprescindíveis para assegurar a estrutura do LPS. Ao serem substituídos, a estrutura sofre alterações irreversíveis, que a impede de dar continuidade à integridade física da bicamada fosfolipídica da membrana citoplasmática, resultando na libertação do conteúdo intracelular e, por consequência na morte celular (44, 43).

1.4.4.2. Mecanismos de resistência à colistina

O principal mecanismo de resistência à colistina estava inicialmente relacionado com a ocorrência de mutações cromossómicas, em que apenas se observava uma transmissão vertical de genes, sendo esta incapaz de se disseminar para outras bactérias. Este está associado à modificação do LPS, em que ocorre a substituição dos grupos fosfato do lípido A, por grupos de 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) ou fosfoetanolamina (PEtN), que tem carga positiva, como os grupos amina livres de colistina. Esta substituição é desencadeada por mutações em genes específicos, que variam consoante a espécie bacteriana, podendo ser desencadeada pela exposição a estímulos ambientais adversos, como por exemplo a exposição à colistina, levando ao desenvolvimento de resistências antimicrobianas (43). Porém, percebeu-se que estava a ocorrer uma rápida disseminação de resistência à colistina entre espécies bacterianas, no caso específico de *Escherichia coli*, que não podia estar associada a mutações cromossómicas. Na China em 2015, ocorreu a primeira sequenciação de um gene *mcr-1*, comprovando assim a existência de outro mecanismo de resistência, este por mediação plasmídica. Atualmente, já foram sequenciados mais de dez genes *mcr* (42, 43).

1.5. A resistência a antibióticos e a microbiota intestinal

A microbiota intestinal humana é a base da saúde e da doença do hospedeiro, pois influencia não só o sistema imunitário do indivíduo, como a nutrição e patogénese do mesmo (45). O trato gastrointestinal, tanto do ser humano, como dos animais, fornece um ambiente

favorável para que ocorra a disseminação de genes de resistência entre as populações bacterianas que lá se encontram, devido à elevada densidade celular, assim como a exposição destas aos antibióticos (22).

Normalmente o intestino é exposto a uma grande quantidade e diversidade de bactérias, provenientes das mãos, de secreções, da água, e alimentos. Num indivíduo saudável, a sua microbiota intestinal é bastante estável, fazendo com que os microrganismos patogênicos ingeridos frequentemente, sejam eliminados com alguma facilidade. Ou seja, para ocorrer a desestabilização da microbiota intestinal, é necessário haver uma sobrecarga dos mecanismos de defesa naturais do organismo, devido a bactérias patogênicas ou vírus, consoante a sua dose infecciosa, induzindo vários sintomas clínicos (45).

Outra causa importante da desestabilização do intestino é a exposição deste a uma variedade de agentes antimicrobianos, como os antibióticos que são usados no tratamento e prevenção da infeção bacteriana na medicina humana e veterinária. Os antibióticos, particularmente os beta-lactâmicos, para além de terem efeito bactericida nas bactérias infecciosas, vão também eliminar outras bactérias suscetíveis, incluindo as da microbiota, responsáveis pela funcionalidade da barreira intestinal, fazendo com que por outro lado, haja um aumento significativo de certas estirpes bacterianas, como *Pseudomonas* spp., que se caracterizam pela resistência intrínseca a esta classe de antibióticos (45).

É assim possível perceber, a grande percentagem de morbidade e mortalidade por infeções bacterianas em indivíduos imunocomprometidos. Estes doentes, têm um organismo muito frágil e por consequência o seu epitélio intestinal está bastante modificado, o que aumenta a permeabilidade intestinal, fazendo com que as bactérias lá presentes, assim como outros microrganismos patogênicos, consigam passar para a corrente sanguínea, levando à septicemia. Para além disso, a colonização destas bactérias patogênicas, é muito rápida, o mecanismo de eliminação intestinal é extremamente lento, e a sua disseminação entre doentes é muito difícil de controlar (45).

1.6. Enterobactérias resistentes a antibióticos

A família das Enterobactérias é um grupo de BGN, não formadoras de esporos, anaeróbios facultativos, e capazes de fermentar açúcares, para além de serem importantes indicadores de higiene na cadeia alimentar (46). Para além disso, muitas espécies desta família, são responsáveis por importantes infeções do trato urinário, gastrointestinal, bacteriemia, pneumonias, entre outras doenças associadas, entre as quais se destacam, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (47).

Esta família de bactérias pode ser encontrada normalmente na microbiota da pele, boca e sobretudo intestino, ou seja, são comensais no ser humano, animais e ainda no ambiente, sendo também normal encontrá-las nos produtos alimentares. Na maioria das situações estas bactérias não são patogênicas para o consumidor, embora indivíduos imunocomprometidos ou doentes internados a nível hospitalar possam sofrer de doenças de origem alimentar ou outras infeções associadas a estas bactérias, existindo um agravamento caso estas tenham resistência aos antibióticos (10).

As Enterobactérias, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, têm-se destacado por apresentarem resistência antimicrobiana devido à produção de ESBLs, para além de outros mecanismos que lhes conferem multirresistência (47).

Escherichia coli é uma espécie comensal da microbiota gastrointestinal dos humanos e animais de sangue quente, sendo que a sua excreção ocorre através das fezes, conseguindo permanecer viável em partículas fecais, poeiras e água durante semanas ou meses (44). Das estirpes de *Escherichia coli* existentes, a sua maioria tem baixa virulência, contudo existe a possibilidade de causarem infeções oportunistas em locais extraintestinais. Quanto às estirpes patogênicas deste género, possuem fatores de virulência que permitem a colonização de superfícies mucosas, levando ao desenvolvimento de doença (48).

O grupo enterohemorrágico (EHEC) é o mais frequente de todos os grupos existentes, tem uma grande capacidade de virulência e reduzida dose infecciosa, provocando surtos de origem alimentar ao nível mundial (49, 50). O serótipo mais comum é *Escherichia coli* O157:H7, que produz verocitotoxinas do tipo Shiga (48,50). Este serótipo é muito encontrado em produtos lácteos e cárneos, no entanto, o consumo de água ou alimentos contaminados com estrume de animais tem levado ao aumento de infeções devido a ingestão de folhas verdes, vegetais frescos e frutas (50, 51).

Dependendo do grupo filogenético de *Escherichia coli*, existem diferentes níveis de resistência aos antibióticos, independentemente da aquisição dos genes de resistência, indicando assim que o histórico genético da bactéria influencia o padrão das resistências antimicrobianas. É relevante falar ainda, que a espécie *Escherichia coli*, é das Enterobactérias mais comuns produtoras de ESBL, a presença destas enzimas, como descrito anteriormente, compromete a eficácia dos antibióticos beta-lactâmicos. As enzimas TEM, SHV e CTX-M são as mais comumente identificadas na família das Enterobactérias em todo o mundo, o que indica que a utilização de toda a classe de antibióticos beta-lactâmicos está comprometida (52).

Klebsiella pneumoniae, pode ser responsável por diversas infeções, como por exemplo no trato urinário, pneumonia, bacteriemia e abscessos no fígado (53, 54, 55). Esta bactéria é

ubíqua na natureza, estando presente no solo, águas e superfícies mucosas do intestino dos animais e no trato gastrointestinal humano (53). Apesar de estar relacionada a infecções nosocomiais, já foram reportados casos em que os alimentos também são vetores de transmissão, tendo esta espécie já foi isolada em carne crua, vegetais, sumos de fruta e alimentos prontos-a-consumir (55).

As espécies de *Klebsiella*, são bactérias que nas últimas décadas tem experienciado um aumento dramático na resistência aos antibióticos, principalmente devido aos mecanismos de resistência contra o beta-lactâmicos (54). Aquando da descoberta da resistência à penicilina desta bactéria, também foi possível identificar os genes de resistência *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*, desde desta descoberta, outros genes importantes foram identificados, fazendo com que a *Klebsiella pneumoniae* seja um importante patógeno produtor de ESBL em infecções nosocomiais. Para além disso, esta espécie tem um regulador intrínseco, RamA, que consegue ativar a resistência aos beta-lactâmicos, sendo que a produção excessiva deste regulador tem um papel importante na resistência adquirida de beta-lactamases mediada por beta-lactâmicos (53). Pela pressão seletiva, devido ao tratamento de infecções provocadas por ESBL com carbapenemos, este grupo de bactérias tornou-se também um dos mais comuns com resistência aos carbapenemos (54).

Devido ao aumento de resistências aos carbapenemos, a utilização da colistina, uma das últimas linhas de defesa em infecções bacterianas graves aumentou, assim como, também aumentou a disseminação de genes de resistência a esta entre as espécies bacterianas. Atualmente tanto *Klebsiella pneumoniae* como *Escherichia coli*, fazem parte de um grupo de bactérias em que foram identificados genes plasmídicos de resistência à COL (43, 56). Como referido anteriormente, com o aumento de resistências aos antibióticos, a família das Enterobactérias, está atualmente incluída no Grupo I, de maior prioridade para a saúde pública em ambientes de produção alimentar (8).

1.7. Objetivos

Este estudo teve como objetivo geral a detecção e caracterização molecular de Enterobactérias em saladas, vegetais e frutas pré-embaladas e prontas para consumo de forma a perceber se os produtos prontos a consumir representam um importante veículo de transmissão de agentes patogénicos resistentes a antibióticos para o Homem, com potencial disseminação de genes de resistência aos antibióticos para a microbiota intestinal

Atendendo ao objetivo principal, um plano de trabalho foi elaborado com os seguintes objetivos específico:

- Isolamento e identificação presuntiva de Enterobactérias em saladas, vegetais e frutas pré-embaladas prontas a consumir.
- Determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiano.
- Identificação molecular das espécies isoladas.

2. Metodologias

2.1. Recolha de amostras

A recolha das amostras utilizadas neste projeto, ocorreu entre outubro de 2020 e maio de 2021. No total foram analisadas 42 amostras de diversos alimentos prontos a consumir, como saladas preparadas, frutas e outros vegetais (Tabela 2). Estas amostras foram obtidas em 3 estabelecimentos comerciais da cidade de Coimbra, Portugal, de marcas diferentes, designadas por SA, SB, SC e SD.

Neste estudo, a compra e realização do tratamento das amostras foi efetuada no mesmo dia, não implicando qualquer tipo de armazenamento.

2.2. Processamento das amostras

O processamento das amostras consistiu na homogeneização de 25g de amostra em 225ml de Água Peptonada (Biolab), utilizando o equipamento Stomacher, Lab-Blender 400 (Concensus), durante 3 min (57, 58). Após este procedimento, filtrou-se o produto obtido com auxílio de um funil e gaze estéreis, e reservou-se o sobrenadante num frasco estéril. Este procedimento repetiu-se 2 vezes para a mesma amostra.

De um frasco foram retirados 100 µl de solução para proceder ao método de sementeira por espalhamento, em gelose de MacConkey (Liofilchem), com uma concentração 1 µg/mL de cefotaxima (CTX; Fisher Bioreagents); este procedimento foi executado em triplicado, o mesmo processo foi realizado em gelose MacConkey (Liofilchem), com uma concentração 2 µg/mL de colistina (COL; Sigma), para as amostras B, 20, 21, 22, 23, 24, 25 e 26. As caixas semeadas foram posteriormente colocadas na estufa a 37°C, durante 48h, sendo, no entanto, examinadas ao fim de 24h.

O outro frasco foi incubado a 37°C, durante 2-3h para pré-enriquecimento. Após o pré-enriquecimento, procedeu-se à inoculação de 600 µl da solução em 5 ml de Trypticase de Soja (TS; Liofilchem), seguido de nova incubação a 37°C durante a noite (59). No dia seguinte, após examinar-se as caixas com amostra sem enriquecimento, foi possível prever quantas diluições deveriam ser realizadas. Posteriormente à realização da diluição da amostra, realizou-se o mesmo método que foi executado para o primeiro frasco.

Tabela 2 - Descrição e caracterização das amostras.

Amostras	Produto	Composição	Marca	Compra	Abertura	Validade
0 (Otimização)	Salada Iceberg	Alface Iceberg	SA	14/10/20	14/10/20	16/10/20
1	Salada Sudoeste	Alface Roxa/ Espinafre/ Rúcula Selvagem	SC	-/10/20	26/10/20	19/10/20
2	Salada Aromática	Alface Verde/ Alface Roxa/ Coentros	SA	27/10/20	27/10/20	27/10/20
3	Alface Frisada	Alface Frisada	SB	29/10/20	29/10/20	06/11/20
4	Salada Aromática	Alface Verde/ Alface Roxa/ Coentros	SC	04/11/20	04/11/20	04/11/20
5	Salada Gourmet	Alface Chicória/ Alface Radicchio/ Canonigos	SA	04/11/20	04/11/20	06/11/20
6	Rúcula/Rúcula Selvagem	Rúcula Selvagem	SC	04/11/20	04/11/20	11/11/20
7	Salada Iceberg	Alface Iceberg	SA	04/11/20	04/11/20	07/11/20
8	Salada Camponesa	Alface Multifolhas Verde/ Cenoura/ Milho/ Couve Roxa	SA	10/11/20	10/11/20	13/11/20
9	Salada Aromática	Alface Verde/ Alface Roxa/ Coentros	SC	10/11/20	10/11/20	14/11/20
10	Salada Gourmet	Alface Chicória/ Alface Radicchio/ Canonigos	SA	10/11/20	10/11/20	12/11/20
11	Salada Iceberg	Alface Iceberg	SA	25/11/20	25/11/20	28/11/20
12	Salada Iceberg	Alface Iceberg	SB	02/12/20	02/12/20	03/12/20
13	Rúcula/Rúcula Selvagem	Rúcula	SB	02/12/20	02/12/20	05/12/20
14	Rúcula/Rúcula Selvagem	Rúcula	SB	09/12/20	09/12/20	09/12/20
15	Alface Frisada	Alface Frisada	SB	09/12/20	09/12/20	12/12/20
16	Salada Ibéria	Alface Verde/ Alface Roxa/ Rúcula Selvagem	SB	14/12/20	14/12/20	20/12/20
17	Rúcula/Rúcula Selvagem	Rúcula	SB	14/12/20	14/12/20	18/12/20
18	Salada Iceberg	Alface Iceberg	SB	13/01/21	13/01/21	13/01/21
19	Rúcula/Rúcula Selvagem	Rúcula	SB	13/01/21	13/01/21	17/01/21
20	Salada Ibéria	Alface Verde/ Alface Roxa/ Rúcula Selvagem	SB	19/01/21	19/01/21	19/01/21
21	Salada Gourmet	Alface Chicória/ Alface Radicchio/ Canonigos	SB	19/01/21	19/01/21	22/01/21

22	Salada Aromática	Alface Verde/ Alface Roxa/ Coentros	SA	26/01/21	26/01/21	28/01/21
23	Salada Lollo Tango	Alface Verde/ Alface Roxa	SA	26/01/21	26/01/21	26/01/21
24	Salada Iceberg	Alface Iceberg	SB	27/01/21	27/01/21	29/01/21
25	Salada Aromática	Alface Verde/ Alface Roxa/ Coentros	SB	27/01/21	27/01/21	27/01/21
26	Salada Iceberg	Alface Iceberg	SB	27/01/21	27/01/21	29/01/21
27	Rúcula/Rúcula Selvagem	Rúcula Selvagem	SA	02/02/21	02/02/21	03/02/21
28	Salada Lollo Tango	Alface Verde/ Alface Roxa	SA	02/02/21	02/02/21	02/02/21
29	Salada Iceberg	Alface Iceberg	SA	02/02/21	03/02/21	05/02/21
30	Salada Ibéria	Alface Verde/ Alface Roxa/ Rúcula Selvagem	SA	02/02/21	03/02/21	04/02/21
A*	Fruta Cortada	Abacaxi/Mamão /Manga/Kiwi	SA	09/03/21	10/03/21	sem
B	Cenoura Ralada	Cenoura	SB	16/03/21	16/03/21	18/03/21
C	Espinafre Baby	Espinafre	SA	23/03/21	23/03/21	26/03/21
D	Agrião Baby	Agrião	SA	23/03/21	23/03/21	24/03/21
E	Espinafre	Espinafre	SB	30/03/21	30/03/21	04/04/21
F	Fruta Cortada	Manga/Uva	SD	05/04/21	06/04/21	24h após
G	Cenoura Ralada	Cenoura	SB	20/04/21	20/04/21	21/04/21
H	Coentros	Coentros	SB	27/04/21	27/04/21	27/04/21
I	Espinafre	Espinafre	SC	04/05	04/05/21	06/05/21
J	Coentros	Coentros	SB	18/05/21	18/05/21	19/05/21
K	Cenoura Ralada	Cenoura	SB	19/01/2021	19/01/2021	21/01/2021

*Data de embalagem da amostra A: 09/03/21

2.3. Identificação presuntiva de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

Após as 48h de incubação, as caixas semeadas foram analisadas com vista à identificação de unidades formadoras de colónias (UFC) suspeitas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Na gelose de MacConkey, as UFC de *Escherichia coli* apresentam uma cor rosa forte, frequentemente envolvidas por um precipitado; as colónias de *Klebsiella pneumoniae* apresentam um cor-de-rosa mais pálido, e uma mucosidade característica. Após esta identificação presuntiva, as UFC suspeitas foram isoladas em gelose Eosina, Azul de Metileno (EMB, Liofelchim) e incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24h.

2.4. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos foi determinada através do método de difusão em disco a partir de culturas puras de bactérias previamente inoculadas em gelose de TS (Pronadisa) a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante a noite.

Inicialmente fez-se uma suspensão bacteriana em 5 ml de água destilada estéril correspondente ao 0,5 da escala de Macfarland, avaliada através do turbidímetro, DEN-18 McFarland Densitometer (Biosan).

De seguida humedeceu-se uma zaragatoa na suspensão e procedeu-se ao espalhamento da amostra de forma uniforme na superfície da gelose de Mueller-Hinton (Sigma-Aldrich). Nos 15 minutos seguintes aplicaram-se os discos contendo antibiótico (OXOID), nomeadamente de amoxicilina/ácido clavulânico 20-10 μg (AMC), cefoxitina 30 μg (FOX), cefotaxima 5 μg (CTX), aztreonam 30 μg (AZT), ceftazidima 10 μg (CAZ) e imipenemo 10 μg (IPM), como é possível observar na Figura 4.

As placas foram incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 16-20h.

Finalizado o tempo de incubação, procedeu-se à medição dos halos de inibição de crescimento e análise dos resultados obtidos, de acordo com as normas EUCAST (60).

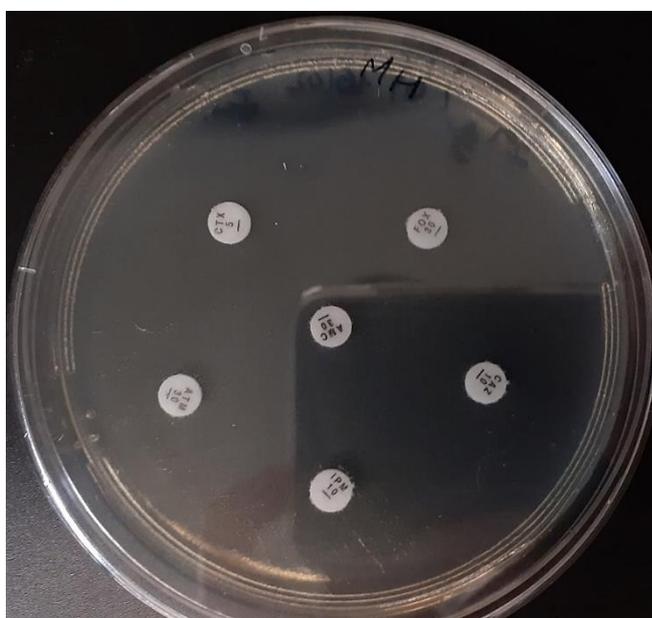


Figura 4 - Colocação dos antibióticos beta-lactâmicos na caixa de petri com gelose Mueller-Hinton.

A concentração mínima inibitória (CMI) para a colistina foi determinada através do método de microdiluição em caldo em culturas puras de bactérias previamente inoculadas em gelose TS a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante a noite.

Foi necessário repetir o processo para se obter a suspensão bacteriana, como se realizou para o método de difusão em disco.

Neste método foi necessária a preparação da solução de colistina (Sigma), assim como do meio em caldo de MH (Thermo Scientific), com o ajuste dos catiões, $[\text{Ca}^{2+}]$ e $[\text{Mg}^{2+}]$. Neste ensaio de microdiluição, seguiu-se a ISO 20776-1:2019, tal como recomendado pelo EUCAST (61), numa placa de 96 poços.

2.5. Identificação das espécies bacterianas

A identificação das espécies bacterianas isoladas foi realizada através da sequenciação de Sanger após amplificação parcial de sequências do gene *16S rARN* por reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo ainda realizada uma metodologia fenotípica, API 20E.

2.5.1. Identificação fenotípica de bacilos Gram-negativo

Foi realizada a metodologia fenotípica para identificação de bacilos GN, API 20E (Biomérieux), seguindo-se as instruções do fabricante. Esta metodologia serviu para a identificação de uma das bactérias selecionadas com COL, que apresentava semelhanças morfológicas à espécie *Klebsiella pneumoniae*. Os resultados foram analisados com o auxílio do programa APIWEB (<https://apiweb.biomerieux.com/>).

2.5.2. Extração de ADN

O primeiro passo para a identificação genotípica correspondeu à extração de ADN. A partir de uma cultura pura inoculada em gelose TS e incubada a 37°C durante a noite, procedeu-se à suspensão de algumas colónias em 200 μl de água MiliQ, seguida de homogeneização durante alguns segundos no vortéx. As suspensões foram aquecidas a 100°C durante 10 min num banho seco (Dry Block Thermostat biosan – Bio TDB – 100), seguindo-se o processo de centrifugação (Microcentrífuga de bancada Sigma I – 14) durante 2min com uma velocidade de 14000 rpm. No final, foi retirado o sobrenadante, onde se encontrava o ADN, que foi utilizado posteriormente como amostra para PCR.

2.5.3. Reação em cadeia da Polimerase

A PCR iniciou-se através da preparação de uma mistura contendo 10 µl de master mix 2x (DreamTaq Green PCR Master Mix – Thermo Scientific), 0,5 µl de cada primer 10 µM (Tabela 3), 7 µl de água sem nucleases e 2 µl do ADN obtido anteriormente. Foi também preparado o controlo negativo, que em vez de conter 2 µl de ADN, continha 2 µl de água sem nucleases, e o controlo positivo, em que se utilizou o ADN de uma amostra já identificada.

Toda a reação foi preparada em gelo.

As condições de PCR utilizadas foram as seguintes: 95°C durante 2min, 30 ciclos a 95°C durante 30s, 52°C durante 30s e 72°C durante 1min, seguidos de 72°C durante 10min (62). A temperatura de annealing, 52°C, foi obtida através do cálculo da temperatura de fusão dos *primers* utilizados, seguidos da subtração de 2°C à menor temperatura, através da seguinte fórmula:

$$Tm = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

Tabela 3 - Sequência dos *primers* universais para amplificação de 16S rARN.

Identificação dos <i>primers</i>	Sequência de Primers	Tamanho de amplificação	Referência
27F	5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'	1500 pb	62
1492R	5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'		

2.5.4. Eletroforese

A observação dos produtos amplificados foi realizada através de uma eletroforese em gel de agarose. Inicialmente, preparou-se o gel de agarose (Nzytech) a 1%, em solução tampão TAE a 1% (Thermo Scientific), contendo 2 µl de brometo de etídio (1%; AppliedChem).

Após aplicação dos produtos de amplificação e do marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific), a eletroforese foi realizada a 80V durante 80min com a solução tampão TAE a 0,5%. O resultado foi observado no transiluminador UV (UVITEC).

2.5.5. Sequenciação e análise das sequências

Os produtos de amplificação resultantes do PCR foram purificados utilizando o *kit QIAquick PCR Purification* (Qiagen), para as duas primeiras sequenciações realizadas, e o *kit GF-1 PCR Clean-up* (Vivantis) para a terceira, ambos foram realizados segundo as instruções do

fabricante. Posteriormente, as amostras de ADN purificado foram enviadas para o laboratório StabVida. As sequências nucleotídicas obtidas de cada amostra foram analisadas e alinhadas com o auxílio do programa Sequencher 5.0 (Gene Codes). O programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi utilizado para comparar as sequências nucleotídicas finais com as sequências bacterianas disponíveis no GenBank.

2.5.6. Detecção de genes *mcr*

Para a detecção de genes *mcr* (tabela 4), utilizou-se a técnica PCR multiplex. A metodologia para a preparação das amostras foi igual à que se realizou no ponto 2.5.2., contudo foi necessário ajustar o volume da água sem nucleases, tendo em consideração a quantidade de primers *mcr* utilizados. A detecção dos genes por PCR multiplex foi dividida em dois, primeiramente foram pesquisados os genes *mcr-1* e *mcr-3*, e em segundo pesquisou-se os genes *mcr-2*, *mcr-4* e *mcr-5*.

Tabela 4 - Sequência dos primers para amplificação de *mcr*.

Identificação de primers <i>mcr</i>	Sequência de Primers	Tamanho do amplificação	Referência
1 F	5' AGT CCG TTT GTT CTT GTG GC 3'	320 pb	63
1 R	5' AGA TCC TTG GTC TCG GCT TG 3'		
2 F	5' CAA GTG TGT TGG TCG CAG TT 3'	715 pb	
2 R	5' TCT AGC CCG ACA AGC ATA CC 3'		
3 F	5' AAA TAA AAA TTG TTC CGC TTA TG 3'	929 pb	
3 R	5' AAT GGA GAT CCC CGT TTT T 3'		
4 F	5' TCA CTT TCA TCA CTG CGT TG 3'	1116 pb	
4 R	5' TTG GTC CAT GAC TAC CAA TG 3'		
5 F	5' ATG CGG TTG TCT GCA TTT ATC 3'	1644 pb	
5 R	5' TCA TTG TGG TTG TCC TTT TCT G 3'		

As condições de PCR utilizadas para a detecção de genes *mcr*, foram as seguintes: 94°C durante 15min, 25 ciclos a 94°C durante 30s, 58°C durante 90s e 72°C durante 1min, seguidos de 72°C durante 10min (63). Posteriormente realizou-se a eletroforese, de acordo com o ponto 2.5.4.

3. Resultados

3.1. Identificação presuntiva de colónias nas amostras

Pela identificação presuntiva das colónias nas amostras, realizada em gelose de MacConkey com uma concentração de 1 µg/mL de CTX, é possível observar na Tabela 5, que das 42 amostras, 26 (61,9%) delas apresentaram colónias cor-de-rosa forte, envolvidas num precipitado, e/ou colónias mucosas cor-de-rosa pálido, sendo estas as características morfológicas das colónias de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* neste meio, respetivamente.

Relativamente à seleção em gelose MacConkey, com uma concentração de 2 µg/mL de COL, o ensaio foi realizado para 8 (19,1%) das amostras, tendo todas elas apresentado colónias suspeitas, como referido anteriormente.

Tabela 5 - Resultados da identificação presuntiva de colónias de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

Tipo de amostra	Nº de amostras	Amostras com colónias suspeitas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> por:	
		Seleção CTX ^a (%)	Seleção COL ^b (%)
Salada Iceberg	8	75,0	33,3
Rúcula/ Rúcula Selvagem	6	66,7	0,0
Salada Aromática	5	40,0	40,0
Salada Gourmet	3	100,0	33,3
Salada Ibéria	3	0,0	33,3
Alface Frisada	2	100,0	0,0
Salada Lollo e Tango	2	50,0	50,0
Salada Sudoeste	1	0,0	0,0
Salada Camponesa	1	0,0	0,0
Fruta Cortada	2	50,0	0,0
Cenoura Ralada	3	100,0	33,3
Espinafres	3	66,7	0,0
Agrião	1	0,0	0,0
Coentros	2	100,0	0,0

^aCTX – cefotaxima; ^bCOL – colistina

3.2. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

3.2.1. Avaliação da suscetibilidade aos beta-lactâmicos pelo método de difusão em disco

Na Tabela 6, estão descritos os perfis de suscetibilidade das colônias isoladas presuntivamente de serem *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. A interpretação dos resultados foi feita de acordo com os *breakpoints* da EUCAST (60). O método de difusão em disco foi realizado antes da sequenciação e identificação da espécie bacteriana, e serviu como um fator de seleção para quais das bactérias isoladas, seria realizada a amplificação parcial das sequências *16S rARN*.

A grande maioria das bactérias isoladas eram suscetíveis aos seis antibióticos beta-lactâmicos em estudo. Verificou-se que 25,9% das colônias isoladas eram resistentes à cefotaxima, 21% tem resistência ao aztreonam, 22,4% eram resistentes a cefoxitina, enquanto 3,5% e 0,7% eram resistentes à ceftazidima e imipenemo respectivamente. Por fim 19,6% mostraram ser resistentes à associação de antibiótico beta-lactâmico/inibidor de beta-lactamases, a amoxicilina/ácido clavulânico.

Tabela 6- Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em disco

Antibiótico	Colônias Isoladas (n=143)		
	S*	RI*	R*
Cefotaxima (S ≥ 20/ R < 17)	76	30	37
Aztreonam (S ≥ 26/ R < 21)	111	2	30
Cefoxitina (S ≥ 19/ R < 19)	111	-	32
Ceftazidima (S ≥ 22/ R < 19)	127	11	5
Imipenemo (S ≥ 22/ R < 17)	142	-	1
Amoxicilina/Ácido Clavulânico (S ≥ 19/ R < 19)	115	-	28

*Interpretação: S – suscetível; RI – suscetível, exposição aumentada; R – resistente

3.2.2. Avaliação da suscetibilidade à colistina pelo método de microdiluição

Neste ensaio foram isoladas 22 colónias presuntivas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Como se pode observar na Tabela 7, dessas 22 obtiveram-se 19 com CMI's elevadas e intermédias, e 3 com CMI's de 0,5 e 1 µg/mL, ou seja, suscetíveis à colistina.

Tabela 7 - Valores das concentrações mínimas inibitórias das bactérias em estudo.

Nº de identificação da bactéria	Tipo de Produto	CMI (µg/mL)*
1	Cenoura Ralada - B	0,5
2	Cenoura Ralada - B	129
3	Cenoura Ralada - B	512
4	Cenoura Ralada - B	256
5	Cenoura Ralada - B	160
6	Cenoura Ralada - B	160
7	Salada Gourmet - B	20
8	Salada Gourmet - B	6
9	Salada Gourmet - B	8
10	Salada Gourmet - B	512
11	Salada Gourmet - B	8
12	Salada Ibéria - B	33
13	Salada Iceberg - B	8
14	Salada Iceberg - B	512
15	Salada Iceberg - B	64
16	Salada Iceberg - B	512
17	Salada Aromática - A	0,5
18	Salada Lollo Tango - A	1
19	Salada Aromática - B	512
20	Salada Aromática - B	512
21	Salada Lollo Tango - A	512
22	Salada Aromática - B	512

*Valor médio resultante de dois ensaios

3.3. Identificação da espécie

3.3.1. Amplificação parcial de sequências de *16S rARN* por reação de polimerase em cadeia.

Das 143 bactérias isoladas, 72 foram selecionadas para se proceder à realização do método de amplificação parcial das sequências de *16S rARN* por PCR.

A Figura 5, representa um exemplo do resultado final da amplificação, onde se pode observar a existência de uma banda de aproximadamente 1500 pb, que corresponde ao tamanho esperado.

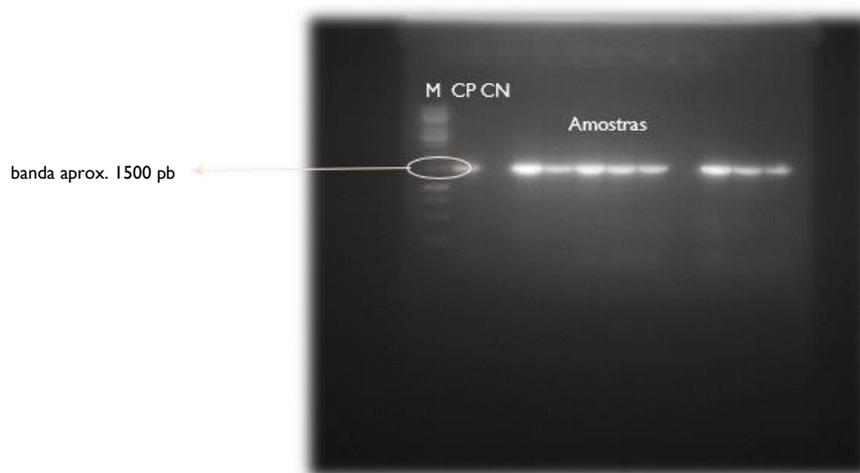


Figura 5 - Imagem representativa dos resultados da amplificação parcial de sequências de *16S rARN* por reação de polimerase em cadeia.

Legenda: M – marcador de peso molecular; CP – controlo positivo; CN – controlo negativo

Das 72 bactérias, apenas 66 (91,4%) foram amplificadas, pois 1 (1,4%) não teve crescimento bacteriano e em 5 (6,9%) não ocorreu amplificação. Para as restantes foi obtida a banda idêntica à que está representada na Figura 5, significando assim que a amplificação parcial das sequências *16S rARN*, foi bem-sucedida.

Relativamente às bactérias obtidas através da seleção com colistina, apenas foram sequenciadas as que tinham CMIs mais elevadas (512 µg/mL) e aleatoriamente uma intermédia (8 µg/mL). Excepcionalmente, uma das bactérias suscetíveis foi também sequenciada, pois pelo método fenotípico (API 20E), a bactéria foi identificada como *Yersinia enterocolitica*, sendo por isso necessário proceder-se à sua sequenciação para confirmação do resultado. Do total de 22 bactérias isoladas, procedeu-se à amplificação de 13 (59,1%), todas obtendo o resultado expectável.

3.3.2. Identificação das espécies por sequenciação Sanger

Foram selecionadas 25 bactérias de acordo com o seu perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, tendo sido privilegiadas as bactérias que apresentaram resistência ou exposição aumentada a algum dos antibióticos beta-lactâmicos. Na Tabela 8, verifica-se que não foi identificada nenhuma *Escherichia coli* nem *Klebsiella pneumoniae*, porém foi identificada uma *Klebsiella oxytoca*. As sequenciações que se verificou não pertencerem à família das Enterobactérias, não foram representadas na tabela 8, sendo essas maioritariamente do género *Pseudomonas*.

Tabela 8 - Espécies bacterianas identificadas com o respetivo perfil de suscetibilidade antimicrobiana.

Espécies/ Perfil de Suscetibilidade	CTX ^{a+} (5 µg)	AZT ^{a*} (30 µg)	FOX ^{a*} (30 µg)	CAZ ^{a*} (10 µg)	IMP ^{a*} (10 µg)	AMC ^{a*} (20-10 µg)
<i>Citrobacter portucalensis</i>	26 ^b	30 ^b	17 ^b	28 ^b	30 ^b	17 ^b
<i>Rahnella variigena</i>	18 ^b	32 ^b	28 ^b	28 ^b	36 ^b	23 ^b
<i>Rahnella</i> spp.	15 ^b	27 ^b	24 ^b	27 ^b	33 ^b	24 ^b
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0 ^b	13 ^b	0 ^b	32 ^b	31 ^b	0 ^b
<i>Rahnella</i> spp.	19 ^b	32 ^b	27 ^b	27 ^b	39 ^b	26 ^b
<i>Rahnella aquatilis</i>	17 ^b	30 ^b	26 ^b	27 ^b	34 ^b	- ^c
<i>Rahnella aquatilis</i>	18 ^b	32 ^b	28 ^b	27 ^b	35 ^b	- ^c
<i>Rahnella</i> spp.	19 ^b	33 ^b	27 ^b	32 ^b	42 ^b	- ^c

^a Interpretação das cores: verde – suscetível; amarelo – suscetível, exposição aumentada; laranja – resistente
^b Tamanho dos halos em mm
^c Não foi possível fazer a medição do halo
*CTX – cefotaxima; AZT – aztreonam; FOX – ceftaxitina; CAZ – ceftazidima; IMP – imipenemo; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico

A Tabela 9 apresenta as identificações das bactérias obtidas por meio de seleção com colistina. Neste caso, apenas foi possível avaliar a suscetibilidade aos beta-lactâmicos de *Yersinia enterocolitica*, que se verificou ser suscetível aos seis antibióticos. Sucedeu-se este equívoco, porque após a extração de ADN das bactérias *Rahnella* spp., *Serratia fonticola* e *Serratia* spp., as suas culturas bacterianas não foram conservadas.

Tabela 9 - Espécies bacterianas identificadas com o respetivo valor da concentração mínima inibitória.

Espécies	CMI Colistina ^a ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,5
<i>Rahnella</i> spp.	8
<i>Serratia fonticola</i>	512
<i>Serratia</i> spp.	512

^a Interpretação de cores: verde – suscetível; laranja -resistente

Para as amostras obtidas pela seleção com colistina, realizou-se a deteção de genes *mcr* por PCR. Os resultados obtidos, indicaram que nenhuma das bactérias em estudo, apresentava genes *mcr*.

4. Discussão

O objetivo deste estudo consistiu em avaliar se saladas, vegetais, ervas aromáticas e frutas prontas-a-consumir, poderiam ou não ser potenciais vias de transmissão de agentes patogênicos resistentes a antibióticos para o Homem.

Segundo os resultados obtidos, verificou-se, que em nenhum destes produtos alimentares se identificou as espécies *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. É possível constatar este resultado como um fator positivo em relação à qualidade microbiológica dos alimentos em estudo, uma vez que a espécie *Escherichia coli*, é utilizada como indicador de contaminação fecal na indústria alimentar.

Surge uma questão com estes resultados obtidos: Se atualmente são utilizados desinfetantes neste tipo de produtos? A resposta é afirmativa. Durante o processo de lavagem, é utilizada para desinfecção uma solução de ácido paracético (64). Este procedimento de desinfecção, certamente estar correlacionado com os resultados microbiológicos obtidos neste estudo. Para um trabalho futuro, seria interessante averiguar, se a utilização deste tipo de desinfetantes pode ou não estar relacionada, com o tipo de microbiota presente nestes produtos alimentares.

Das 42 amostras analisadas, 26 (61,9%) tinham colónias presuntivas de ser *Escherichia coli* ou *Klebsiella pneumoniae*. As inoculações realizadas para cada amostra de alimento, apresentavam colónias cor-de-rosa forte com precipitado ou colónias mucosas cor-de-rosa pálido. No entanto, esta identificação não se confirmou por métodos moleculares. A identificação presuntiva das colónias nas amostras foi realizada em gelose de MacConkey com uma concentração de 1 µg/mL de CTX, e também com COL tendo uma concentração de 2 µg/mL. A gelose de MacConkey, é um meio de cultura seletivo, pois permite o crescimento de certos tipos de microrganismos e inibe o crescimento de outros, neste caso inibe o crescimento de bactérias Gram-positivo, selecionando assim as BGN. Com a adição da CTX ou COL, ainda se tornou o meio de cultura mais seletivo, provocando alterações no padrão de crescimento das bactérias. Com base na diferença de cor das colónias, sendo esta associada à capacidade de fermentação da lactose, foram selecionadas as que fenotipicamente apresentavam semelhanças às colónias de *Escherichia coli* e/ou *Klebsiella pneumoniae*. Contudo, verificou-se que muitas das espécies ambientais observadas, formam colónias semelhantes a *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, o que conseqüentemente levou à seleção e ao isolamento de bactérias de outras espécies, na maioria não Enterobactérias.

Para além disso, a concentração de CTX utilizada permitia a seleção de isolados não resistentes, tendo-se verificado que 53,1% das bactérias isoladas eram suscetíveis a este

antibiótico. Por outro lado, a concentração de COL utilizada neste ensaio à partida selecionaria exclusivamente bactérias resistentes; contudo, após a determinação das CMI, observaram-se três resultados discordantes, ou seja, três das bactérias isoladas demonstraram ser suscetíveis à COL, o que poderá estar relacionado com a tolerância destas bactérias aquando uma exposição direta ao antibiótico, ou ainda devido ao período e temperatura de incubação (65).

Pelos resultados da sequenciação, verificou-se a identificação de uma espécie bacteriana, *Citrobacter portucalensis*, sendo que esta estirpe foi isolada pela primeira vez em Portugal, numa amostra de água de um poço (66).

Os membros do género *Citrobacter*, podem ser encontrados nos tratos gastrointestinais dos humanos e animais e, através da sua eliminação pelas fezes, irão contaminar o ambiente, como a água e o solo, tendo assim maior probabilidade de chegar aos alimentos. Já foram identificadas estirpes desta bactéria com genes no ADN cromossomal de resistência aos antibióticos, como o gene das beta-lactamases, *ampC*, e o gene *qnrB*, que confere à bactéria resistência às quinolonas. As bactérias deste género são patógenos oportunistas, associados a infeções no trato urinário, gastrointestinal e respiratório (66, 67).

O perfil de suscetibilidade do *Citrobacter portucalensis* isolado, mostra resistência ao antibiótico cefoxitina, e à associação antibiótico beta-lactâmico/inibidor de beta-lactamases, amoxicilina/ácido clavulânico, enquanto é suscetível aos outros quatro antibióticos beta-lactâmicos em estudo.

Num estudo recente, em doentes hospitalizados, foram identificadas bactérias desta espécie, com genes de resistência aos antibióticos adquiridos por THG, mediados por plasmídeos, tendo sido resultado de um surto numa unidade de terapia intensiva neonatal localizada na Colômbia, envolvendo vários géneros de Enterobactérias produtoras de beta-lactamases (68). Também em Bangladesh, isolaram *Citrobacter portucalensis*, em aves poedeiras, com um grande espetro de resistência antimicrobiana. Este isolado apresentava no genoma oito genes de resistência antimicrobiana, inclusive resistência à polimixina.(69). Esta diferença de perfis de suscetibilidade, é um indicador de como as bactérias, incluindo as da mesma espécie, estão sujeitas a diferentes pressões seletivas, dependendo do ambiente em que se encontram (70).

Neste projeto não foi identificada a espécie *Klebsiella pneumoniae*, como referido anteriormente. No entanto, foi isolada uma *Klebsiella oxytoca*, resistente à cefotaxima, aztreonam, cefoxitina e amoxicilina/ácido clavulânico, sendo suscetível à ceftazidima e imipenemo. *Klebsiella oxytoca*, é a segunda bactéria deste género, com maior registo de

provocar infeções no ser humano. Desde que foram identificadas as ESBL, as bactérias do género *Klebsiella*, são as mais comumente relacionadas com surtos infecciosos, provocados por BGN multirresistentes aos antibióticos (71).

Nos últimos anos, tem-se verificado a incidência de Enterobactérias resistentes aos antibióticos nos produtos vegetais frescos, como saladas preparadas, prontas-a-consumir, e vegetais cortados. De acordo com um estudo realizado em Espanha, detetaram vários isolados de *Klebsiella oxytoca* em diferentes alimentos, como tomates, espinafres, cenouras, saladas preparadas, alface, incluindo alface iceberg, à semelhança da isolada no presente estudo, que apresentaram resistência à ampicilina e à amoxicilina/ácido clavulânico (72). Noutro estudo realizado, na África do Sul, isolaram-se dois isolados de *Klebsiella oxytoca* em amostras de tomate, os seus perfis de suscetibilidade apresentavam resistência à cefotaxima, cefoxitina, amoxicilina/ácido clavulânico, sendo que uma delas era suscetível com exposição aumentada ao imipenemo (73).

Numa amostra de cenoura ralada, foi isolada a bactéria *Yersinia enterocolitica*. Esta é uma bactéria psicotrófica, com capacidade de crescer e sobreviver a temperaturas de refrigeração, é ubíqua na natureza, podendo ser isolada na água, solo, animais e numa grande diversidade de alimentos (74). *Yersinia enterocolitica* é caracterizada como um agente patogénico de origem alimentar bastante relevante, capaz de provocar gastroenterite autolimitante, contudo é raro isolar-se estirpes patogénicas desta espécie em produtos frescos prontos-a-consumir, sendo o porco considerado o principal reservatório do serótipo patogénico (75, 76).

Num estudo recente, verificou-se que a deteção de *Yersinia enterocolitica* nos produtos vegetais, incluindo vegetais prontos-a-consumir, é bastante comum em alguns países da União Europeia (75).

A identificação de *Yersinia enterocolitica* neste estudo, pode ser considerado um acaso, uma vez que, embora selecionada na presença de COL, este isolado foi determinado como suscetível a todos os antibióticos em estudo, inclusive à COL. Deste modo, poderia haver um número maior de isolados desta espécie que não foram detetados. Para além disso, o facto de ter sido numa amostra de cenoura ralada, vai de encontro a outros estudos (75,77).

A maioria das espécies bacterianas de Enterobactérias identificadas pertence ao género *Rahnella*, incluindo *Rahnella variigena* e *Rahnella aquatilis*. Estas espécies de Enterobactérias são de origem ambiental, possuem potencial para aplicações agrícolas e industriais (78). *Rahnella aquatilis* é comumente isolada em água doce, tecidos vegetais, solo, produtos alimentares frescos e em amostras clínicas (79). Atualmente já foram isoladas estirpes desta bactéria com

resistência à amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, cefalotina, entre outros antibióticos importantes na antibioterapia humana (80, 81). As estirpes de *Rahnella* isoladas neste estudo apresentaram suscetibilidade à maioria dos antibióticos beta-lactâmicos analisados, embora todas apresentaram ser suscetíveis com exposição aumentada para a cefotaxima, uma apresentou resistência à cefotaxima, e outra resistência à colistina.

Foram ainda isoladas duas *Serratia* spp., sendo uma delas identificada como *Serratia fonticola*. Ambas apresentaram resistência à colistina, possivelmente pela sua resistência intrínseca a este antibiótico (82). As espécies *Serratia* isoladas neste estudo, são consideradas bactérias ambientais, relativamente inofensivas, apesar de existirem registos de infeções provocadas por esta bactéria em doentes imunocomprometidos. Para além disso, por ser uma bactéria ambiental, é comumente encontrada em vegetais e frutas. Um estudo, demonstrou que esta bactéria ambiental era predominante em vegetais, como a cenoura cozida, alface iceberg, aipo escaldado e chicória, com resistência à 3^o geração de cefalosporinas (83).

O maior risco associado à presença destes géneros de Enterobactérias, tanto *Serratia* spp. como *Rahnella* spp., nos produtos frescos prontos-a-consumir, deve-se ao facto da sua permanência, ainda que temporária, no trato gastrointestinal. Apesar de serem géneros bacterianos inofensivos para um individuo saudável, podem facilitar a disseminação de genes de resistência para outras bactérias presentes naquele meio, inclusive bactérias patogénicas oportunistas (83).

Relativamente a não ter sido detetado nenhum gene *mcr* neste estudo, não quer dizer que as bactérias analisadas, não apresentem nenhum. Apenas se fez deteção para os genes *mcr* de 1-5, tendo sido já identificados genes *mcr* até ao 10 (84). Seria interessante, fazer um estudo direcionado exclusivamente, para deteção molecular de Enterobactérias resistentes à COL nos produtos frescos prontos a consumir, visto ser um tema extenso e muito importante para auxiliar na perceção da microbiota destes alimentos, e como podem ou não influenciar a saúde pública.

A obtenção destes resultados, permite-nos avaliar, a importância do controlo microbiológico nos produtos alimentares prontos-a-consumir, principalmente vegetais e frutas com mínimo processamento.

Existem imensos fatores ao longo de toda a cadeia alimentar, que podem estar na origem da contaminação dos alimentos, inclusive com bactérias potencialmente patogénicas, e/ou com capacidade de disseminação de genes de resistência aos antibióticos.

A comunidade científica, está bastante alerta quanto às repercussões, que se sucederam devido ao uso indiscriminado dos antibióticos na terapia humana e animal,

produtos fertilizantes, adubos naturais contaminados, e como isso afetou a cadeia alimentar. Está comprovado cientificamente, que o ambiente, incluindo o solo, a água, resíduos animais, e alimentos, são importantes reservatórios de genes de resistência aos antibióticos, pois é nestes que se encontram as bactérias que os transportam. Além disso, os alimentos, não servem apenas como reservatórios para bactérias potencialmente patogênicas, e/ou com capacidade de disseminação de genes de resistência aos antibióticos, mas agem como mediadores para a transferências desses genes, entre o ambiente e o ser humano, por contacto direto ou indireto através do consumo de alimentos contaminados.

Os produtos alimentares prontos-a-consumir, são veículos de genes de resistências antimicrobianos para o trato gastrointestinal dos consumidores, e apesar de neste estudo, a maioria das espécies identificadas, serem majoritariamente ambientais, algumas delas apresentam perfis de suscetibilidade, que devem ser tidos em consideração.

5. Conclusão

Em suma, a resistência aos antimicrobianos, atualmente, não é apenas um problema a nível hospitalar. É um problema global, e uma enorme ameaça para a saúde pública. Este estudo, pode ser incluído em muitos outros, onde se apura que a disseminação de genes de resistência é uma realidade.

Neste estudo não se confirmou a presença das bactérias potencialmente patogénicas pesquisadas, ou seja, nenhuma das colónias isoladas consideradas suspeitas foi identificada como pertencendo a *Escherichia coli* ou *Klebsiella pneumoniae*.

Todavia, o mesmo estudo revelou a presença de uma bactéria patogénica oportunista, *Klebsiella oxytoca*, e ainda um isolado de *Yersinia enterocolitica*, porém não foi verificado se correspondia ao serótipo patogénico.

Por outro lado, também se detetaram bactérias das espécies *Citrobacter portucalensis*, *Rahnella* spp. (*Rahnella variigena* e *Rahnella aquatilis*) e *Serratia* spp. (*Serratia fonticola*). Estas espécies são reconhecidas como bactérias ambientais, e os seus perfis de suscetibilidade devem ser tidos em consideração, pois estas bactérias podem potencializar a disseminação de genes de resistência a outras potencialmente patogénicas para o ser humano.

É necessário assegurar a prática das normas de segurança alimentar, do prado até à mesa do consumidor, principalmente em produtos frescos prontos-a-consumir minimamente processados. Também, a realização de mais estudos para estes alimentos deve ser incentivada, de modo a colmatar dúvidas e lacunas existentes sobre este tema, tais como, a possibilidade de uma maior minimização de contaminação cruzada ao longo da cadeia alimentar, assim como, perceber se existem outros parâmetros de avaliação microbiológica que devem ser reavaliados ou inseridos na legislação.

Referências Bibliográficas

1. PRZYREMBEL, H. - **Food Safety**, atual. 2020. [Consult. 6 set. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.who.int/health-topics/food-safety>.
2. FLOROS, John D. *et al.* - Feeding the world today and tomorrow: The importance of food science and technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. ISSN 15414337. 9:2010) 572–599. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00127.x.
3. BETTS, Roy - Microbial Update: Fruit & Salad. **International Food Hygiene**. 25:3 (2014) 9–11.
4. ARIENZO, Alyxandra *et al.* - Microbiological Quality of Ready-to-Eat Leafy Green Salads during Shelf-Life and Home-Refrigeration. **Foods**. 9:1421 (2020) 1–11. doi: doi:10.3390/foods9101421.
5. JUNG, Yangjin; MATTHEWS, Karl R. - Potential transfer of extended spectrum β -lactamase encoding gene, *bla*_{SHV18} gene, between *Klebsiella pneumoniae* in raw foods. **Food Microbiology**. ISSN 10959998. 60:2016) 39–48. doi: 10.1016/j.fm.2016.06.002.
6. WALIA, Sandeep *et al.* - Prevalence of multiple antibiotic-resistant Gram-negative bacteria on bagged, ready-to-eat baby spinach. **International Journal of Environmental Health Research**. ISSN 09603123. 23:2 (2013) 108–118. doi: 10.1080/09603123.2012.708916.
7. MACHADO-MOREIRA, Bernardino *et al.* - Microbial Contamination of Fresh Produce: What, Where, and How? **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. ISSN 15414337. 18 (2019) 1727–1750. doi: 10.1111/1541-4337.12487.
8. KOUTSOUMANIS, Konstantinos *et al.* - Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. **EFSA Journal**. ISSN 18314732. 19:6 (2021). doi: 10.2903/j.efsa.2021.6651.
9. CASTRO-IBÁÑEZ, Irene *et al.* - Ready-to-eat vegetables: Current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain. **LWT - Food Science and Technology**. ISSN 00236438. 85 (2017) 284–292. doi: 10.1016/j.lwt.2016.11.073.
10. KIM, Hong Seok *et al.* - Prevalence and characterization of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in ready-to-eat vegetables. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 18793460. 207 (2015) 83–86. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.049.
11. HOLVOET, Kevin *et al.* - Moderate prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from lettuce, irrigation water, and soil. **Applied and Environmental Microbiology**. ISSN 00992240. 79:21 (2013) 6677–6683. doi: 10.1128/AEM.01995-13.
12. **One Health Office Fact Sheet | One Health | CDC** - [Consult. 8 jun.

2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.cdc.gov/onehealth/who-we-are/onehealthofficefactsheet.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fonehealth%2Fmultimedia%2Ffactsheet.html>.

13.JONES-DIAS, Daniela *et al.* - Architecture of class 1, 2, and 3 integrons from gram negative bacteria recovered among fruits and vegetables. **Frontiers in Microbiology**. ISSN 1664302X. 7:1400 (2016) 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2016.01400.

14.BREIJYEH, Zeinab; JUBEH, Buthaina; KARAMAN, Rafik - Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. **Molecules**. 25:1340 (2020) 1–23. doi: 10.3390/molecules25061340.

15.BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A. - β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 6:a025247 (2016) 1–22. doi: 10.1101/cshperspect.a025247 Cite.

16.SHI, Cheng *et al.* - Approaches for the discovery of metallo- β -lactamase inhibitors: A review. **Chemical Biology and Drug Design**. ISSN 17470285. 94:2019) 1427–1440. doi: 10.1111/cbdd.13526.

17.SUÁREZ, Cristina; GUDIOL, Francesc - β -lactam antibiotics. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. ISSN 15781852. 27:2 (2009) 116–129. doi: 10.1016/j.eimc.2008.12.001.

18.ROSA, Margherita DE *et al.* - The odd couple(S): An overview of β -lactam antibiotics bearing more than one pharmacophoric group. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 22:2 (2021) 1–21. doi: 10.3390/ijms22020617.

19.VRANCIANU, Corneliu Ovidiu *et al.* - Emerging Strategies to Combat β -Lactamase.pdf. **International Journal of Molecular Sciences**. 21:8527 (2020) 1–46.

20.C. REYGAERT, Wanda - An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**. ISSN 2471-1888. 4:3 (2018) 482–501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482.

21.MARTÍNEZ, José Luis; BAQUERO, Fernando - Emergence and spread of antibiotic resistance: Setting a parameter space. **Uppsala Journal of Medical Sciences**. ISSN03009734. 119 (2014) 68–77. doi: 10.3109/03009734.2014.901444.

22.HUDDLESTON, Jennifer R. - Infection and Drug Resistance Dovepress Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. **Infection and Drug Resistance**. 7 (2014) 167–176. doi: 10.2147/IDR.S48820.

23.HARRISON, Christopher J.; BRATCHER, Denise - Cephalosporins: A Review. **Pediatrics in Review**. 29:8 (2019) 264–273. doi: 10.1007/s13205-019-1766-9.

24.BURMEISTER, Alita R. - **Horizontal Gene Transfer**. Disponível em

WWW:<URL:https://academic.oup.com/emph/article/2015/1/193/1797370>.

25.DŽIDIĆ, Senka; ŠUŠKOVIĆ, Jagoda; KOS, Blaženka - Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. **Food Technology and Biotechnology**. ISSN 13309862. 46:1 (2008) 11–21.

26.HEUER, Holger; SMALLA, Kornelia - Thematic Issue on Horizontal Gene Transfer Horizontal gene transfer between bacteria. **Environ. Biosafety Res.** 6:1 (2007) 3–13. doi: 10.1051/ebr:2007034.

27.MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. - Antibiotic Resistance Mechanisms. **Journeys in Medicine and Research on Three Continents Over 50 Years**. (2017) 95–99. doi: 10.1142/9789813209558_0015.

28.BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A. - Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**. ISSN 10986618. 33:2 (2020) 1–37. doi: 10.1128/CMR.00047-19.

29.DOI, Yohei; CHAMBERS, Henry F. - **Penicillins and β -Lactamase Inhibitors**. Eighth Edition. [S.l.] : Elsevier Inc., 2014 Disponível em WWW:<URL:http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00020-5>. ISBN 9996096742.

30.DAS, Nilanjana *et al.* - An overview of cephalosporin antibiotics as emerging contaminants: a serious environmental concern. **3 Biotech**. ISSN 21905738. 9:231 (2019) 1–14. doi: 10.1007/s13205-019-1766-9.

31.BUI, Toai; PREUSS, Charles V. - Cephalosporins. **NCBI**. (2021).

32.KURIYAMA, Tomoari; KARASAWA, Tadahiro; WILLIAMS, David W. - **Antimicrobial Chemotherapy: Significance to Healthcare**. [S.l.] : Elsevier Inc., 2014 Disponível em WWW:<URL:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397043-5.00013X>. ISBN 9780123970435.

33.NICOLAU, David P. - comparatif les différent type de carbapenemes selon le spectre d'activité Carbapenems: A potent class of antibiotics. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. ISSN 14656566. 9:1 (2008) 23–37.

34.GHAFOURIAN, Sobhan *et al.* - Extended spectrum β -lactamases: Definition, classification and epidemiology. **Current Issues in Molecular Biology**. ISSN 14673037. 17 (2015) 11–22. doi: 10.21775/cimb.017.011.

35.POETA, Patrícia *et al.* - The Role of Plasmids in the Multiple Antibiotic Resistance Transfer in ESBLs-Producing *Escherichia coli* Isolated From Wastewater Treatment Plants. **Frontiers in Microbiology**. 10:633 (2019) 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2019.00633.

36.STOHR, Joep J. J. M. *et al.* - Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) genes and plasmid replicons in Enterobacteriaceae using Plasmid SPAdes assembly of short-read sequence data. **Microbial Genomics**. 6:2020) 6–12. doi: 10.1099/mgen.0.000400.

37.TAL JASPER, Ruthy *et al.* - The complex epidemiology of extended-spectrum

β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. **Future Microbiology**. ISSN 17460921. 10:5 (2015) 819–839. doi: 10.2217/fmb.15.16.

38.PHILIPPON, Alain; ARLET, Guillaume; JACOBY, George A. - Plasmid-Determined AmpC-Type-Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 46:1 (2002) 1–11. doi: 10.1128/AAC.46.1.1.

39.DAIKOS, George L. et al. - Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: Lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. ISSN 10986596. 58:4 (2014) 2322–2328. doi: 10.1128/AAC.02166-13.

40.DOI, Yohei; PATERSON, David L. - Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. **Thieme Medical**. 36 (2015) 74–85.

41.MCEWEN, Scott A.; COLLIGNON, Peter J. - Antimicrobial Resistance: A One Health Colloquium. **Microbiology Spectrum**. 6:2 (2018) 1–26. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.Correspondence.

42.ANDRADE, Ferdinando F. et al. - Colistin update on its mechanism of action and resistance, present and future challenges. **Microorganisms**. ISSN 20762607. 8:1716 (2020) 1–12. doi: 10.3390/microorganisms8111716.

43.COSTA, Adriana; JORGE DA SILVA, Gabriela - Colistin Resistance and its Dissemination: Implications for Public Health. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**. 10:1 (2018) 47–52.

44.BARLAAM, Alessandra et al. - Global emergence of colistin-resistant *Escherichia coli* in food chains and associated food safety implications: A review. **Journal of Food Protection**. ISSN 19449097. 82:8 (2019) 1440–1448. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-19-116.

45.CARLET, Jean - The gut is the epicentre of antibiotic resistance. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**. ISSN 20472994. 1:39 (2012) 1–7. doi: 10.1186/2047-2994-1-39.

46.YE, Qinghua et al. - Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from retail food in China. **Frontiers in Microbiology**. ISSN 1664302X. 9:AUG (2018) 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2018.01709.

47.PATERSON, David L. - Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **American Journal of Infection Control**. ISSN 01966553. 34:5 (2006) 20–28. doi: 10.1016/j.ajic.2006.05.238.

48.ORTIZ, Yaraymi et al. - Natural and synthetic antimicrobials reduce adherence of enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **PLoS ONE**. 16:5 (2021) 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0251096.

49.KAPER, James B. - Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Em **Host-microbe interactions: bacteria**. p. 103–108.

50. OLIVEIRA ELIAS, Susana DE *et al.* - *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 prevalence and levels on lettuce: A systematic review and meta-analysis. **Food Microbiology**. 84:103217 (2019) 1–11. doi: 10.1016/j.fm.2019.05.001.
51. MCCONNEL, Craig S. *et al.* - Antimicrobial Resistance Profiles in *Escherichia coli* O157 Isolates from Northern Colorado Dairies. **Journal of Food Protection**. 79:3 (2016) 484–487. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-321.
52. RAMOS, Sónia *et al.* - *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Production. **Animals**. 10:2239 (2021) 2–15. doi: 10.3390/ani10122239.
53. WANG, Guoying *et al.* - The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. ISSN 16604601. 17:6278 (2020) 1–17. doi: 10.3390/ijerph17176278.
54. MARTIN, Rebekah M.; BACHMAN, Michael A. - Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. ISSN 22352988. 8 (2018) 1–15. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004.
55. HARTANTYO, Sri Harminda Pahm *et al.* - Foodborne *Klebsiella pneumoniae*: Virulence potential, antibiotic resistance, and risks to food safety. **Journal of Food Protection**. ISSN 19449097. 83:7 (2020) 1096–1103. doi: 10.4315/JFP-19-520.
56. KAZA, Parinitha *et al.* - Evaluation of risk factors for colistin resistance among uropathogenic isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: A case–control study. **Journal of Medical Microbiology**. ISSN 14735644. 68:6 (2019) 837–847. doi: 10.1099/jmm.0.000986.
57. CAMPOS, Joana *et al.* - Microbiological quality of ready-to-eat salads: An underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 18793460.166 (2013) 464–470. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.005.
58. TAKAHASHI, Hajime *et al.* - Development of a quantitative real-time PCR method to enumerate total bacterial counts in ready-to-eat fruits and vegetables. **Journal of Food Protection**. ISSN 0362028X. 69:10 (2006) 2504–2508. doi: 10.4315/0362-028X-69.10.2504.
59. SAW, S. H. *et al.* - Detection and quantification of salmonella in fresh vegetables in perak, Malaysia. **Food Research**. ISSN 25502166. 4:2 (2020) 441–448. doi: 10.26656/fr.2017.4(2).316.
60. EUCAST - **Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zonediameters**. Disponível em WWW: <URL: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf>.

61. EUCAST - EUCAST reading guide for broth microdilution (version 3.0). **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. (2021) 1–20.
62. HONGO, Yuichi *et al.* - Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of *16S rRNA* genes from a natural environment. **FEMS Microbiology Letters**. ISSN 03781097. 221:2 (2003) 299–304. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00218-0.
63. RITA REBELO, Ana *et al.* - Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. **Eurosurveillance**. 23:6 (2018) 1–11. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672.
64. CRITZER, Faith; WSZELAKI, Annette - **Using Peroxyacetic Acid (PAA) in Fruit and Vegetable Washing and Packing**. Disponível em WWW:<URL:<https://extension.tennessee.edu/publications/Documents/SP798-B.pdf>>.
65. SAMANIC, Ivica *et al.* - Bacteria tolerant to colistin in coastal marine environment: Detection, microbiome diversity and antibiotic resistance genes' repertoire. **Chemosphere**. 281:130945 (2021) 1–10. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.130945.
66. RIBEIRO, Teresa Gonçalves *et al.* - *Citrobacter portucalensis* sp. Nov., isolated from an aquatic sample. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. ISSN 14665026. 67:2017) 3513–3517. doi: 10.1099/ijsem.0.002154.
67. IGBINOSA, Etinosa O. *et al.* - crossm Draft Genome Sequence of *Salmonella*. **Genome Announcements**. 5:42 (2018) 17–18.
68. RADA, Ana M. *et al.* - Dynamics of blaKPC-2 Dissemination from Non-CG258 *Klebsiella pneumoniae* to Other Enterobacterales via *IncN* Plasmids in an Area of High Endemicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 64:12 (2020) 1–14.
69. AMIN, Md AL *et al.* - Antimicrobial resistance situation in animal health of Bangladesh. **Veterinary World**. ISSN 22310916. 13:12 (2020) 2713–2727. doi: 10.14202/vetworld.2020.2713-2727.
70. EBMEYER, Stefan; KRISTIANSSON, Erik; LARSSON, D. G. Joakim - A framework for identifying the recent origins of mobile antibiotic resistance genes. **Communications biology**. 4:8 (2021) 1–10. doi: 10.1038/s42003-020-01545-5.
71. IWU, Chidozie Declan; OKOH, Anthony Ifeanyi - Preharvest transmission routes of fresh produce associated bacterial pathogens with outbreak potentials: A review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. ISSN 16604601. 16:22 (2019) 1.34. doi: 10.3390/ijerph16224407.
72. FALOMIR, María Pilar *et al.* - *Enterobacter* and *Klebsiella* species isolated

from fresh vegetables marketed in valencia (Spain) and their clinically relevant resistances to chemotherapeutic agents. **Foodborne Pathogens and Disease**. ISSN 15353141. 10:12 (2013) 1002–1007. doi: 10.1089/fpd.2013.1552.

73.RICHTER, Loandi *et al.* - Occurrence, Phenotypic and Molecular Characterization of Extended-Spectrum- and *AmpC*- β -Lactamase Producing Enterobacteriaceae Isolated From Selected Commercial Spinach Supply Chains in South Africa. **Frontiers in Microbiology**. ISSN 1664302X. 11:638 (2020) 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2020.00638.

74.BARI, Md. Latiful *et al.* - Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods . **Journal of Pathogens**. ISSN 2090-3057. (2011) 1–13. doi: 10.4061/2011/420732.

75.VERBIKOVA, Veronika *et al.* - Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* and other *Yersinia* species found in fruits and vegetables from the European Union. **Food Control**. 85 (2017) 161–167. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.08.038.

76.SHOAIB, Muhammad *et al.* - A comprehensive review on the prevalence, pathogenesis and detection of *Yersinia enterocolitica*. **The Royal Society of chemistry**. 9 (2019) 41010–41021. doi: 10.1039/c9ra06988g.

77.MAATTA, Jenni *et al.* - Microbiological Quality of Fresh-Cut Carrots and Process Waters. **Journal of Food Protection**. 76:7 (2013) 1240–1244. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-550.

78.LI, L. *et al.* - Identification of *atpD* as an optimal reference gene to explore antibiotic resistance and stress tolerance in *Rahnella aquatilis*. **Journal of Applied Microbiology**. ISSN 13652672. 126 (2019) 1096–1107. doi: 10.1111/jam.14215.

79.MIRALLES, Marina Mira *et al.* - High-throughput *16S rRNA* sequencing to assess potentially active bacteria and foodborne pathogens: A case example in ready-to-eat food. **Foods**. ISSN 23048158. 8:480 (2019) 1–14. doi: 10.3390/foods8100480.

80.CHANG, Chulhun Ludgerus *et al.* - *Rahnella aquatilis* sepsis in an immunocompetent adult. **Journal of Clinical Microbiology**. ISSN 00951137. 37:12 (1999) 4161–4162. doi: 10.1128/jcm.37.12.4161-4162.1999.

81.ROEDER, Heidi A.; FULLER, Benjamin; SCOULAR, Sarah - Septic shock caused by *Rahnella aquatilis* bacteremia in an immunocompetent adult. **American Journal of Case Reports**. ISSN 19415923. 22:e930888 (2021) 22–25. doi: 10.12659/AJCR.930888.

82.AGHAPOUR, Zahra *et al.* - Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae. **Infection and Drug Resistance**. 12:2019) 965–975. doi: 10.2147/IDR.S199844.

83.BLAAK, Hetty *et al.* - Extended spectrum β -lactamase- and constitutively *AmpC*-producing Enterobacteriaceae on fresh produce and in the agricultural environment. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 18793460. 168:169 (2014) 8–16. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.006.

84.HAMMOOD HUSSEIN, Nadheema *et al.* - Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from I to 10: a comprehensive review. **Molecular Biology Reports.** 48:2021) 2897–2907. doi: 10.1007/s11033-021-06307-y.

Anexo I



Introduction

- The diversity of lifestyles and food choices has a huge impact in food production and their availability. Nowadays, there is an increased demand for vegetables and fruits ready-to-eat (RTE), which are consumed without further manipulation (1).
- Agricultural practices, including the use of organic fertilizers containing antibiotic residues and antibiotic resistance bacteria,

OPENS

Materials and Methods

- **Sample collection and processing:** Thirty-two RTE vegetables samples (31 salads and 1 grated carrot) were acquired from two Portuguese supermarkets, with three different brands denominated as A, B and C, between October 2020 and February 2021. Twenty-five grams of each sample was processed in Stomacher and bacteria were isolated either by direct plating or after enrichment in buffered peptone water at 37°C.

Results: Cefotaxime Selection

- Under CTX selection, we isolated bacteria belonging to 12 different species (Table 1). The isolated GNB mainly belonged to environmental species, with *Pseudomonas* spp. (66,7%) showing the highest prevalence, followed by *Rahnella* spp. (27,8%).
- *Pseudomonas* species showed the highest resistance profile to β -lactam antibiotics, which may be explained by their intrinsic resistance to these antibiotics. These group of bacteria are ubiquitous in soil, water, and plants, can also be found in animal and human tissues (5). An increasing incidence of nosocomial infections caused by environmental *Pseudomonas* has been seen (6).
- *Rahnella* spp. have a chromosomal-encoded beta-lactamase that may explain the reduced susceptibility to cefotaxime. This genus is present in fresh water, plant tissues and soil and occasionally can cause human infection, such as observed for *Rahnella aquatilis* (7).
- One isolate of *Citrobacter portucalensis* resistant to cefotaxin and amoxicillin/clavulanic acid was identified; the resistance may be explained by the

Results: Colistin Selection

- Under Colistin selection, we identified 3 *Pseudomonas* spp., 2 *Serratia* spp., 1 *Herbaspirillum* spp., 1 *Rahnella* spp. and 1 *Yersinia enterocolitica*.
- Seven out of the eight isolates identified are environmental bacteria. Nonetheless, opportunistic infections due to these species have been reported.
- Except for one isolate, all the other showed resistance to colistin, with most MIC values highly above the clinical breakpoint (2mg/L) (Table 2).
- *Serratia* species have an intrinsic resistance to colistin. The other GNB may have chromosomal mutations or acquired genes that explain the resistance profile.
- One *Yersinia enterocolitica*, a human pathogenic agent, was isolated under colistin selection, despite the susceptibility revealed by the MIC value.

Table 2. - Colistin minimum inhibitory concentration of Gram-negative isolates selected under colistin pressure

Species	MIC (mg/L)
<i>Pseudomonas</i> spp.	16
<i>Serratia</i> spp.	16
<i>Herbaspirillum</i> spp.	16
<i>Rahnella</i> spp.	16
<i>Yersinia enterocolitica</i>	16

Conclusions

- *Yersinia enterocolitica* and diverse opportunistic pathogens showing resistance to clinically important antibiotics were detected in RTE fresh produce.
- The results highlight the importance of microbiological evaluation of pre-washed RTE salads.

References and Acknowledgments

1. Betts R. Microbial Update: Fruit & Salad. Int Food Hyg. 2014;25(3):9-11.
2. Holvoet K, Sumpers I, Callens B, Dewulf J, Lytendaele M. Moderate prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from lettuce, irrigation water, and soil. Appl Environ Microbiol. 2013;79(21):6677-83.
3. Lima CM, Souza IEGL, dos Santos Alves T, Leite CC, Evangelista-Barreto NS, de