

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Ciências**  
**ULisboa**

## **Caracterização das resistências antimicrobianas de bactérias isoladas de aquaculturas**

Sara Sofia Rocha Nogueira

**Mestrado em Microbiologia Aplicada**

Dissertação orientada por:  
Ana Rosa Pombo Botelho  
Ana Maria Gonçalves Reis



O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado foi realizado no INIAV, I.P. – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. sob a orientação direta da Doutora Ana Rosa Pombo Botelho.

A Professora Doutora Ana Maria Gonçalves Reis foi a orientadora interna, designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora do INIAV, à doutora Ana Botelho, pela orientação neste percurso tão desafiante. Gostaria de agradecer pela paciência e tolerância que teve comigo, principalmente quando lhe enviava emails gigantes cheios de dúvidas, pelos conselhos que me deu, por estar sempre disponível para me auxiliar e por me desafiar a sair da minha zona de conforto. Obrigada por confiar em mim. Foi um ano muito enriquecedor em laboratório que me permitiu experienciar em primeira mão o que é ser uma investigadora em microbiologia.

Gostaria de agradecer à doutora Ana Amaro e doutora Lurdes Clemente, pela paciência que tiveram comigo e por arranjam sempre tempo para me ajudar a ultrapassar todos os percalços que foram surgindo pelo caminho laboratorial. Um agradecimento à doutora Célia Leão por toda a ajuda que me deu na componente bioinformática, sem si não teria sido possível.

À minha orientadora da Faculdade de Ciências, professora Ana Reis, um grande obrigado por me ter acompanhado nesta viagem que foi a licenciatura e o mestrado. Esta orientação não é de agora, já me ajudou em outros projetos que guardo com grande carinho. Vou igualmente guardar este projeto no meu coração e fico feliz de saber que também fez parte dele. Foi graças à professora Maria Manuela Carolino e a si que me entusiasmei pela primeira vez pela Microbiologia e agradeço muito por isso.

Um agradecimento especial a toda a equipa do Laboratório de Bacteriologia e Micologia do INIAV, pela companhia diária, pela ajuda que me deram nos vários ramos, desde o Sr. Mané nos meios de cultura (quem sabe um dia nos encontremos na Madeira), à dona Alice e à Cristina nos testes de suscetibilidade a antibióticos, à Ana e à doutora Teresa na identificação de bactérias. Não esqueço as minhas companheiras de almoço, as gargalhadas, as histórias e os ensinamentos que me transmitiram.

Gostaria de agradecer à minha família por todo o apoio que me deram durante toda a minha vida, e no meu percurso académico. Todos sabemos que não foi fácil, muita coisa aconteceu, mas se estão a ler isto, é porque consegui. Um agradecimento especial ao meu papito, ao meu padrinho Carlos e à minha melhor amiga Rita por terem sido as pessoas que mais sofreram comigo estes meses, por me ter aturado e incentivado a dar sempre o meu melhor, mas também por me terem dado na cabeça quando foi preciso.

Um agradecimento à Leonor Raposo, ao Jorge Costa da Silva e ao Konil Solanki por estarem sempre comigo durante todo o percurso. Foi muito bom desabafar com vocês e poder contar as minhas peripécias diárias. Foi igualmente bom saber que estavam a passar pelo mesmo e que estávamos juntos nisto, sempre a rir para não chorar.

Este trabalho foi co-financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) e pelo Portugal 2020, no âmbito do Projeto AquaRAM: Antimicrobial Resistance Determinants in Aquaculture Environments (referências: ALG-01-0145-FEDER-028824; PTDC/BIA-MIC/28824/2017)

## Resumo

Os antibióticos são utilizados nas explorações de aquacultura para prevenir e tratar doenças nos animais aquáticos. Como não existem antibióticos especificamente concebidos para a aquacultura, são utilizados fármacos autorizados para outras áreas da medicina, o que pode ter implicações na medicina humana e animal. A presença de elementos genéticos móveis permite a transmissão de genes de resistência a antibióticos a outras bactérias, o que impulsiona a formação de reservatórios de resistência antimicrobiana nestes ambientes. O problema acentua-se quando as explorações de aquacultura se localizam na proximidade de zonas urbanas com atividade antropogénica e quando existe um uso inconsciente de antibióticos.

Neste estudo, foi feita a caracterização fenotípica e genotípica de 19 isolados bacterianos de amostras de sedimentos de aquacultura (n=10), de miolo de ostra (n=5) e de ameijoia japonesa (n=3), e de conteúdo intestinal de dourada (n=1).

Foi utilizado o método de difusão em agar e microdiluição em caldo para aferir o perfil de resistência dos isolados, tendo sido maioritariamente detetadas resistências intrínsecas. Através da sequenciação de genoma completo dos isolados que demonstraram possuir possíveis resistências adquiridas, foram detetados genes de resistência à ciprofloxacina (*qnrD1*), trimetoprim (*dfrA1*), espectinomicina e estreptomomicina (*aadA1*) e estreptotricina (*sat-2*) no isolado *Proteus mirabilis* 5AQ e tetraciclina (*tet(M)*, *tet(L)*) em *Enterococcus faecalis* 3AQ. Foram detetadas mutações em *pbp5* que conferem suscetibilidade à ampicilina em dois isolados de *Enterococcus faecium*, 1AQ e 4AQ. Através de um ensaio de PCR *multiplex* foi detetado um integrão de classe 1 no isolado *Enterococcus hirae* 34AQ e um integrão de classe 2 no isolado *Proteus mirabilis* 5AQ.

Com os resultados obtidos neste estudo exploratório, é possível perceber que existe a necessidade de monitorizar este ambiente através de estudos mais alargados e representativos. Metodologias como a análise metagenómica podem ser alternativas mais eficazes para a caracterização do ambiente de aquacultura.

**Palavras-chave:** Aquacultura, Resistência antimicrobiana, Elementos genéticos móveis, Antibióticos, Genes de resistência a antibióticos.

## Abstract

Antibiotics are used on aquaculture farms to prevent and treat diseases in aquatic animals. As there are no antibiotics specifically designed for aquaculture, drugs authorized for other areas of medicine are used, which may have implications for human and animal medicine. The presence of mobile genetic elements allows the transmission of antibiotic resistance genes to other bacteria, which drives the formation of reservoirs of antimicrobial resistance in these environments. The problem is accentuated when aquaculture farms are located close to urban areas with anthropogenic activity and when there is an unconscious use of antibiotics.

In this study, the phenotypic and genotypic characterization of 19 bacterial isolates from samples of aquaculture sediments (n=10), oyster kernels (n=5) and Japanese clams (n=3), and intestinal contents of sea bream (n=1) were conducted.

The agar diffusion and broth microdilution methods were used to assess the resistance profile of the isolates, with intrinsic resistance being mostly detected. Resistance genes for ciprofloxacin (*qnrD1*), trimethoprim (*dfrA1*), spectinomycin and streptomycin (*aadA1*) and streptotricin (*sat-2*) were detected in isolate *Proteus mirabilis* 5AQ and tetracycline (*tet(M)*, *tet(L)*) in *Enterococcus faecalis* 3AQ by Whole Genome Sequencing. Mutations in *pbp5* that confer susceptibility to ampicillin were detected in two *Enterococcus faecium* isolates, 1AQ and 4AQ. Through a multiplex PCR assay, a class 1 integron was detected in the *Enterococcus hirae* 34AQ isolate and a class 2 integron in the *Proteus mirabilis* 5AQ isolate.

With the results obtained in this exploratory study, it is possible to perceive that there is a need to monitor this environment through more extensive and representative studies. Methodologies such as metagenomics may be more effective alternatives for characterizing the aquaculture environment.

**Keywords:** Aquaculture, Antimicrobial resistance, Mobile genetic elements, Antibiotics, Antibiotic resistance genes.

## Índice

Agradecimentos .....	I
Resumo .....	III
Abstract .....	IV
Índice .....	V
Lista de Figuras .....	VII
Lista de Tabelas .....	VIII
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	X
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. A prática de aquacultura em Portugal .....	1
1.2. Principais classes de antibióticos e os seus mecanismos de ação .....	2
1.3. Uso de antibióticos em aquacultura .....	4
1.4. Mecanismos de resistência a antibióticos .....	5
1.4.1. Transferência horizontal de genes e elementos genéticos móveis.....	8
1.5. Implicações do uso excessivo de antibióticos em aquacultura.....	10
1.5.1. Impacto na Saúde pública e Animal .....	10
1.5.2. Impacto na Saúde Ambiental .....	12
<b>2. Objetivos do estudo .....</b>	<b>12</b>
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>13</b>
3.1. Colheita das amostras .....	13
3.2. Isolamento e identificação bacteriana .....	14
3.3. Testes de suscetibilidade a antibióticos.....	14
3.3.1. Método de difusão em agar (DA) .....	14
3.3.2. Método de microdiluição em caldo (MC).....	17
3.4. Extração e quantificação de DNA dos isolados .....	19
3.5. Identificação dos determinantes de resistência por reação de polimerase em cadeia .....	19
3.5.1. Detecção de integrões da classe 1, classe 2 e classe 3.....	19
3.5.2. Detecção dos genes de resistência adquirida à colistina .....	19
3.5.3. Detecção de genes de resistência adquirida aos $\beta$ -lactâmicos.....	20
3.5.4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados.....	20
3.6. Sequenciação do Genoma Completo (WGS).....	20
<b>4. Resultados e Discussão .....</b>	<b>22</b>
4.1. Isolados bacterianos testados para avaliação da resistência antimicrobiana .....	22
4.2. Caracterização fenotípica das resistências antimicrobianas dos isolados .....	23
4.2.1. <i>Proteus mirabilis</i> .....	24

4.2.2.	<i>Aeromonas sobria</i> .....	26
4.2.3.	<i>Vibrio</i> spp.....	28
4.2.4.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	29
4.2.5.	<i>Enterococcus</i> spp.....	29
4.3.	Identificação de determinantes de resistência por PCR .....	33
4.3.1.	Deteção de integrões de classe 1, classe 2 e classe 3 .....	33
4.3.2.	Deteção de genes de resistência adquirida à colistina .....	33
4.3.3.	Deteção de genes de resistência adquirida aos $\beta$ -lactâmicos.....	34
4.4.	Sequenciação dos isolados selecionados.....	34
4.4.1.	Isolado 5AQ ( <i>Proteus mirabilis</i> ).....	35
4.4.2.	Isolados 1AQ e 4AQ ( <i>Enterococcus faecium</i> ).....	37
4.4.3.	Isolado 3AQ ( <i>Enterococcus faecalis</i> ).....	39
4.4.4.	Isolado 34AQ ( <i>Enterococcus hirae</i> ).....	40
5.	Conclusões e perspectivas futuras .....	41
	Referências bibliográficas.....	42
	Anexos .....	59

## Lista de Figuras

**Figura 1.1** - Mecanismo de ação das principais classes de antibióticos.

**Figura 1.2** - Vendas de antibióticos (mg/PCU) para o uso em animais produtores de alimentos em 31 países europeus em 2020, incluindo Portugal. As classes de antibióticos estão associadas a cores no gráfico. “Other classes” refere-se a outras classes de antibióticos como anfenicóis, cefalosporinas e quinolonas. A mg/PCU é uma unidade de medida desenvolvida pela Agência Europeia de Medicamentos para monitorar as vendas e o uso de antibióticos na Europa e tem em consideração a população animal, bem como o peso estimado de cada animal no momento do tratamento com antibióticos.

**Figura 1.3** - Diferenças entre o mecanismo de transferência vertical de genes e transferência horizontal de genes. A: Durante a replicação, a bactéria pode transferir um gene de resistência a antibióticos, contido num plasmídeo, para a próxima geração. Para além disso, podem haver mutações no seu genoma que são transmitidas à geração seguinte. B: A transmissão horizontal de genes em bactérias pode ser mediada por três mecanismos principais: transformação, transdução e conjugação. Pode ocorrer transmissão de informação entre bactérias da mesma espécie ou entre espécies diferentes.

**Figura 3.1** - Representação dos locais de colheita das amostras.

**Figura 3.2** - Representação esquemática dos ensaios de testes de suscetibilidade a antibióticos. Ambos os grupos foram testado através de dois métodos, difusão em agar e microdiluição em caldo, à temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , mas o grupo N1 (*Enterococcus* spp.) foi testado simultaneamente a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .

**Figura 3.3** - Classificação fenotípica de ESBL, AmpC e Carbapenemases segundo os critérios da EFSA e EURL-AR.

**Figura 4.1** - Distribuição dos isolados pelos ambientes de aquacultura.

**Figura 4.2** - Distribuição dos isolados pelo tipo de amostra de origem.

**Figura 4.3** - Representação esquemática de um integrão classe 2 transportado por um transposão Tn7. As cassetes *dfrA1*, *sat2*, *aadA1* e *orfX* do integrão de classe 2 estão representadas a cores diferentes. A cassette *orfX* tem uma função ainda desconhecida. O promotor da integrase e das cassetes estão representados como *PintI* e *Pc*, respetivamente. Os genes *orf1-orf11* codificam para proteínas hipotéticas. *attI1*, *attI2*, *attC1-4* representam os locais de recombinação *attI2* e *attC*.

**Figura 4.4** - Representação esquemática de um integrão de classe 1. O integrão de classe 1 é composto por duas regiões conservadas, as regiões 5'-CS e 3'-CS, e uma região variável. O segmento 5'-CS contém o gene da integrase (*intI1*), duas regiões promotoras divergentes (*Pi* para o gene da integrase e *Pc* para cassetes de genes) e um local de recombinação (*attI1*). O segmento 3'-CS geralmente contém um gene de resistência *qacED1* e *sul1* e uma ORF5, cuja uma função ainda é desconhecida. Entre os dois segmentos conservados, a região variável.

## Lista de Tabelas

**Tabela 1.1** - Classificação dos antibióticos segundo as listas CIA, VCIA e EMA, que categorizam antibióticos quanto à sua importância para a medicina humana e veterinária. Os antibióticos da lista CIA e VCIA estão divididos em três subgrupos de acordo com a sua prioridade para a medicina humana e veterinária, respectivamente. Na lista criada pela EMA, os antimicrobianos são divididos em quatro categorias (A, B, C, D), relacionando as necessidades da saúde animal com as de saúde pública.

**Tabela 3.1** - Critérios epidemiológicos (ECOFFS) e clínicos utilizados na interpretação dos halos de inibição resultantes do método de difusão em agar (DA).

**Tabela 3.2** - Critérios epidemiológicos (ECOFFs) e clínicos utilizados na interpretação dos CIMs resultantes do método de microdiluição em caldo (MC).

**Tabela 4.1** - Resistências fenotípicas de 19 isolados detetadas nos testes de suscetibilidade a antibióticos a partir dos métodos DA (Difusão em agar) e MC (Microdiluição em caldo).

**Tabela 4.2** - Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) do isolado 5AQ para os antibióticos azitromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, ácido nalidíxico e trimetoprim resultantes dos testes de suscetibilidade realizados a 28°C.

**Tabela 4.3** - Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) do isolado 6AQ para os antibióticos cefoxitina, imipenem, ampicilina e ampicilina-sulbactam resultantes dos testes de suscetibilidade realizados a 28°C.

**Tabela 4.4** - Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) dos isolado 2AQ, 10AQ, 8AQ, 9AQ, 11AQ, 12AQ, 13AQ para os antibióticos ampicilina e ampicilina-sulbactam e ticarcilina resultantes dos testes de suscetibilidade realizados a 28°C.

**Tabela 4.5** - Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) dos isolados 1AQ, 3AQ, 4AQ, 33AQ, 34AQ, para os antibióticos ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, quinupristina/dalfopristina, tetraciclina, oxitetraciclina, clindamicina, amicacina, apramicina e azitromicina resultantes dos testes de suscetibilidade realizados a 28°C e 37°C.

**Tabela 4.6** - Resultados da sequenciação do genoma completo dos isolados 1AQ, 3AQ, 4AQ, 5AQ e 34AQ.

**Tabela Suplementar 1** – Programa de amplificação e primers utilizados na detecção dos genes *intI1*, *intI2* e *intI3*, que codificam integrases.

**Tabela Suplementar 2** - Programa de amplificação e primers utilizados na detecção dos genes de resistência à colistina mediados por plasmídeos *mcr-1-mcr-9*.

**Tabela Suplementar 3** - Programa de amplificação e primers utilizados na detecção dos genes *bla<sub>TEM</sub>-Type*, *bla<sub>SHV</sub>-Type*, *bla<sub>OXA</sub>-Type*, *bla<sub>AAC</sub>-Type*, *bla<sub>FOX</sub>-Type*, *bla<sub>MOX</sub>-Type*, *bla<sub>DHA</sub>-Type*, *bla<sub>CIT</sub>-Type* e *bla<sub>AmpC</sub>*.

**Tabela Suplementar 4** - Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) do isolado 5AQ, para os restantes antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C.

**Tabela Suplementar 5** – Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) do isolado 6AQ, para os restantes antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C.

**Tabela Suplementar 6** – Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) dos isolados 2AQ, 10AQ, 8AQ, 9AQ, 11AQ, 12AQ, 13AQ, para os restantes antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C.

**Tabela Suplementar 7** – Halos de inibição (mm) dos isolados 23AQ, 25AQ, 27AQ, 29AQ, 31AQ dos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C.

**Tabela Suplementar 8** - Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) dos isolados 1AQ, 3AQ, 4AQ, 33AQ, 34AQ, para os restantes antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C e 37°C.

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

**AKN** – Amicacina

**AMC** - Amoxicilina-ácido clavulânico

**AMP** - Ampicilina

**APR** - Apramicina

**ARGs** - Genes de Resistência a Antibióticos/  
*Antimicrobial resistance genes*

**ATP** - Adenosina trifosfato/ *Adenosine triphosphate*

**AZM** - Azitromicina

**CAZ** - Ceftazidima

**CAZ/C** - Ceftazidima/Ácido clavulânico

**CEF** - Cefalotina

**CFP** - Cefoperazone

**CGE** - Centro de Epidemiologia Genômica/  
*Centre for Genomic Epidemiology*

**CHL** - Cloranfenicol

**CIA** - Antibióticos de Importância Crítica/  
*Critically Important Antimicrobials*

**CIM** - Concentração Inibitória Mínima

**CIP** - Ciprofloxacina

**CLSI** - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

**CMN** – Clindamicina

**COL** – Colistina

**CTX** - Cefotaxima

**CTX/C** - Cefotaxima/Ácido clavulânico

**DA** – Difusão em agar

**D-Ala-D-Ala** - D-alanil-D-alanina

**DAP** – Daptomicina

**DNA** - Ácido Desoxirribonucleico/  
*Deoxyribonucleic acid*

**dNTP** - Desoxinucleotídeo trifosfatado/  
*diphosphate Nucleoside Triphosphate*

**ECOFFs** – Critérios epidemiológicos/  
*Epidemiological cut-off values*

**EFSA** - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar/  
*European Food Safety Authority*

**EGM** - Elementos Genéticos Móveis/  
*Mobile Genetic Element*

**EMA** - Agência Europeia de Medicamentos/  
*European Medicines Agency*

**ENA** - *European Nucleotide Archive*

**ERY** - Eritromicina

**ESBL** -  $\beta$ -lactamases de espectro estendido/  
*Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases*

**ETP** - Ertapenem

**EUCAST** - Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana/  
*European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing*

**FAO** - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura/  
*Food and Agriculture Organization of the United Nations*

**FEP** - Cefepime

**FFC** - Florfenicol

**FOX** - Cefoxitina

**FTN** - Nitrofurantoina

**GEN** - Gentamicina

**GSP** - *Glutamate Starch Phenol Red Agar*

**IMP** - Imipenem

**IS** - Sequência de Inserção/  
*Insertion Sequences*

**LPS** - Lipopolissacárido

**LZD** - Linezolida

**MA** - *Marine Agar*

**MAC** - *MacConkey Agar*

**MAR** - Marbofloxacina

**MC** – Microdiluição em caldo

**MCR** - *Mobilized Colistin Resistance*

**MDR** - Multirresistentes/ *Multidrug Resistance*

**MEM** - Meropenem

**MHA** - *Mueller-Hinton Agar*

**MLST** - *Multilocus sequence typing*

**mPCR** - Reação em Cadeia da Polimerase variedade multiplex/ *multiplex Polymerase Chain Reaction*

**mRNA** - RNA mensageiro/ *messenger RNA*

**NAL** - Ácido nalidíxico

**NDM** - *New Delhi metallo-β-lactamase*

**OIE** - Organização Mundial da Saúde Animal

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**OT** - Oxitetraciclina

**OXA** - Enzimas hidrolisadoras de oxacilina

**PABA** - Ácido *p*-aminobenzóico/ *para-aminobenzoic acid*

**pb** - Pares de bases

**PBP** - Proteínas de Ligação à Penicilina/ *Penicillin-binding proteins*

**PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase/ *Polymerase Chain Reaction*

**PMAβ** - β-lactamases do tipo AmpC mediadas por plasmídeos/ *Plasmid-Mediated AmpC β-Lactamase*

**PRL** - Piperacilina

**QND** - Quinupristina-Dalfopristina

**RNA** - Ácido ribonucleico/ *Ribonucleic acid*

**rRNA** - RNA ribossomal/ *ribosomal RNA*

**SAM** - Ampicilina-Sulbactam

**SMX** – Sulfametoxazole

**SNP** - Single Nucleotide Polymorphisms

**SXT** - Sulfametoxazole-Trimetoprim

**TBE** - Tris-Borato-EDTA

**TCBS** - *Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar*

**TEC** – Teicoplanina

**TET** - Tetraciclina

**TGC** - Tigeciclina

**THG** - Transferência Horizontal de Genes

**TIC** - Ticarcilina

**TMP** – Trimetoprim

**TRM** – Temocilina

**TSA** - *Tryptose Soya Agar*

**TSI** - *Triple Sugar Iron Agar*

**TVG** - Transferência Vertical de Genes

**TZP** - Piperacilina-Trimetoprim

**UE** - União Europeia

**VAN** – Vancomicina

**VCIA** - Agentes Antimicrobianos de Importância Crítica Veterinária/ *Veterinary Critically Important Antimicrobial agents*

**WGS** - Sequenciação Completa do Genoma/ *Whole Genome Sequencing*

## 1. Introdução

### 1.1. A prática de aquacultura em Portugal

A aquacultura, processo de criação, reprodução e colheita de espécies aquáticas em ambientes controlados, tem-se tornado uma fonte alimentar cada vez mais importante em todo o mundo (Pérez-Sánchez et al., 2018). Este processo envolve o confinamento de uma espécie animal aquática num corpo de água ladeado por uma rede, gaiola ou cerca (Oddsson, 2020). Com o continuo aumento da população mundial e a diminuição dos recursos naturais viáveis, cada vez mais se recorre a sistemas alternativos de produção de alimentos, mais sustentáveis, seguros e confiáveis (Watts et al., 2017).

Em Portugal Continental, a aquacultura é essencialmente realizada em estuários e zonas costeiras, principalmente no centro e sul do país (Rocha et al., 2022), através de diferentes sistemas, consoante o objetivo da exploração. Os sistemas intensivos e semi-intensivos concentram um grande número de animais em pequenos espaços de água (Santos & Ramos, 2018), atingindo-se uma produção a grande escala, tal como acontece em outros setores de produção animal. A maior diferença entre estes sistemas reside no facto de no sistema semi-intensivo a alimentação ser suplementada, enquanto no intensivo, todas as necessidades alimentares dos animais são totalmente suprimidas por rações comerciais. O terceiro sistema, chamado extensivo, é o que mais se assemelha ao ambiente natural por existir pouca ou mesmo nenhuma interferência humana, inclusive não é fornecida alimentação suplementar (Oddsson, 2020). Devido à aceleração da demanda por peixe, moluscos e crustáceos em vários países da Europa, houve um aumento da utilização dos sistemas intensivos e semi-intensivos, comparativamente ao sistema extensivo (Watts et al., 2017). Em Portugal Continental, recorre-se principalmente a sistemas extensivos e semi-intensivos. Mesmo assim, o volume de produção das poucas explorações intensivas existentes é equiparável ao das explorações semi-intensivas e extensivas (Rocha et al., 2022).

A produção global do setor de aquacultura aumentou em grande escala nos últimos 30 anos (Pérez-Sánchez et al., 2018; Scarano et al., 2014) e estima-se que até 2030 venha a produzir cerca de 62% do peixe consumido mundialmente (Anokyewaa et al., 2021). Portugal é o maior consumidor de peixe *per capita* da União Europeia, e o terceiro maior consumidor mundial, com um consumo de 61,5 kg de peixe *per capita* em 2018 (Rocha et al., 2022; Salgueiro et al., 2020). Este país costeiro tem a 3.<sup>a</sup> maior zona económica exclusiva da União Europeia, praticando a tradicional pesca de captura, aliada à aquacultura. Em 2020 foram produzidas 16 999 toneladas de espécies aquáticas em aquacultura (Instituto Nacional de Estatística, 2021).

As doenças dos animais aquáticos são um dos fatores limitantes críticos nesta indústria (Manage, 2018). A sobrelotação de peixes nas instalações de aquacultura e a falta de barreiras sanitárias nos locais de cultivo são fatores que aumentam as condições de *stress* e levam a uma maior suscetibilidade à propagação de infeções nestes animais (Cabello, 2006; Mo et al., 2017). Para além disso, quando as explorações de aquacultura estão localizadas nos estuários de rios, perto de áreas altamente urbanizadas, industrializadas e de campos agrícolas, existe um risco da poluição afetar os animais das explorações (Rocha et al., 2022; Santos & Ramos, 2018). As doenças podem reduzir o desempenho reprodutivo, e comprometer o crescimento dos animais, podendo chegar a inviabilizar toda a exploração e provocar assim grandes perdas económicas (Tavares-Dias & Martins, 2017). Como estes animais são reservatórios de agentes patogénicos associados a zoonoses, existe o risco de, para além de infetarem o hospedeiro, também poderem infetar os humanos. Estas infeções podem dar-se por contacto direto nas instalações de aquacultura ou por infeções de origem alimentar (Santos & Ramos, 2018). *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Salmonella* e *Klebsiella* são bactérias patogénicas que podem ser transmitidas por feridas na pele ou por ingestão acidental de água, alimentos

ou outros materiais contaminados. *Aeromonas* e *Vibrio* são os géneros mais comuns em espécies de animais de água doce e de água salgada, respetivamente. Estes microrganismos provocam normalmente gastroenterites com vômitos e diarreia, mas quando infetam pessoas imunossuprimidas o problema pode tornar-se bastante mais grave (Ziarati et al., 2022).

Para impedir grandes perdas económicas, os produtores utilizam antibióticos para tratar doenças infecciosas dos peixes das explorações de aquacultura. O grande problema ocorre quando estes fármacos são usados rotineiramente, mesmo sem existirem sinais aparentes de doença.

## 1.2. Principais classes de antibióticos e os seus mecanismos de ação

A Agência Europeia de Medicamentos (EMA) definiu os antibióticos como “...qualquer substância com ação direta sobre bactérias que é usada para tratamento ou prevenção de infeções ou doenças infecciosas” (Pepi & Focardi, 2021). Depois da descoberta formal por Fleming em 1928, os antibióticos tornaram-se drogas essenciais para a saúde animal e humana. Podem ser derivados de fontes naturais ou ser sintéticos (Romero et al., 2012) e dividem-se em duas grandes categorias: bacteriostáticos e bactericidas, podendo inibir o crescimento bacteriano ou matar as bactérias, respetivamente. Os antibióticos podem agir contra as bactérias por meio de diferentes mecanismos, incluindo inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese de ácidos nucleicos, inibição da síntese de proteínas, alteração das membranas celulares, antagonismo competitivo e atividade antimetabolito (Pepi & Focardi, 2021). As várias classes existentes têm como base os mecanismos de ação dos antibióticos, tal como representado na Figura 1.1, sendo divididos por:  $\beta$ -lactâmicos, glicopeptídeos, quinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, anfenicóis, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, oxazolidinonas, polimixinas, lipopéptidos, sulfonamidas e trimetoprim (van Hoek et al., 2011). Alguns antibióticos são especificamente ativos contra um grupo seletivo de bactérias (antibióticos de espectro estreito), outros são ativos contra um maior número de bactérias (antibióticos de amplo espectro).

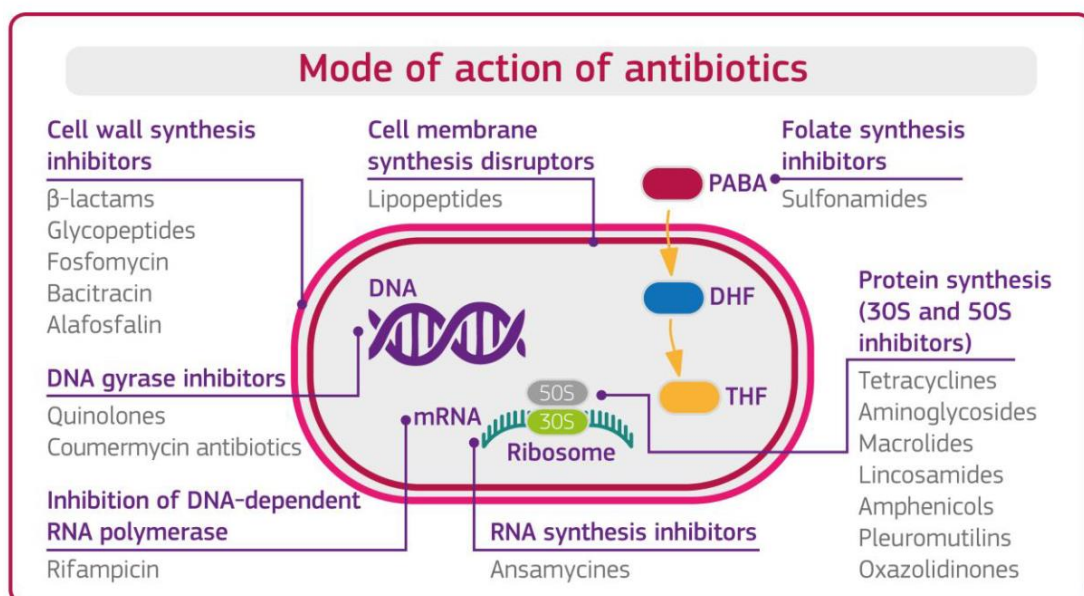


Figura 1.1. Mecanismo de ação das principais classes de antibióticos. Retirado de European Commission et al. (2018).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são agentes bactericidas que interrompem a síntese de peptidoglicano, cuja ruptura leva à lise da bactéria. Esta ampla classe de antibióticos é composta por penicilinas, cefalosporinas (de primeira, segunda, terceira, quarta e quinta geração), os carbapenemes, os monobactâmicos e os inibidores de  $\beta$ -lactamases (van Hoek et al., 2011). Embora existam características distintas entre os grupos, todos apresentam um anel  $\beta$ -lactâmico na sua estrutura química (Fernandes et al., 2013). Os principais alvos destes agentes são as proteínas de ligação à penicilina (PBP), que são enzimas transpeptidases. O anel  $\beta$ -lactâmico imita a porção D-alanil D-alanina (D-Ala-D-Ala) da cadeia peptídica que é normalmente ligada por PBP e as proteínas ao interagirem com o anel  $\beta$ -lactâmico, deixam de estar disponíveis para catalisar a transpeptidação da camada de peptidoglicano (Bush & Bradford, 2016; Fernandes et al., 2013; Kapoor et al., 2017; Kong et al., 2010).

As quinolonas são antibióticos bactericidas sintéticos que inibem a síntese dos ácidos nucleicos ao interferirem com as enzimas DNA girase e topoisomerase IV. Alguns exemplos de antibióticos são: ácido nalidíxico e as fluoroquinolonas, ciprofloxacina e marbofloxacina (Allison & Lambert, 2015). Geralmente, em bactérias gram-negativas, o principal alvo é a DNA girase, codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB*, enquanto que em bactérias gram-positivas, o alvo maioritário é a topoisomerase IV, codificada pelos genes *parC* e *parE* (Allison & Lambert, 2015; Dowling et al., 2017).

As tetraciclina são agentes bacteriostáticos, de amplo espectro, amplamente utilizados na medicina veterinária, que atuam como inibidores da tradução de mRNA. Tetraciclina e oxitetraciclina são dois exemplos de antibióticos pertencentes a esta classe (Chopra & Roberts, 2001; Dowling et al., 2017). Os antibióticos são transportados ativamente para dentro das células bacterianas e ligam-se à extremidade 3' do RNA 16S associado à subunidade ribossômica 30S, mas também a proteínas acessórias e íons de magnésio. Assim, bloqueiam a ligação do aminoacil-tRNA ao local A do ribossoma e interrompem a síntese de proteínas (Allison & Lambert, 2015; Dowling et al., 2017; Kapoor et al., 2017).

Macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B apresentam um mecanismo de ação semelhante, apesar de serem quimicamente diferentes (T. Lambert, 2012; van Hoek et al., 2011). A classe dos macrólidos envolve antibióticos como eritromicina A, azitromicina e a claritromicina que possuem uma atividade bacteriostática e são frequentemente usados em combinação com outras classes de antibióticos (Allison & Lambert, 2015). O seu mecanismo de ação passa pela inibição da síntese proteica através da sua ligação ao rRNA 23S associado à subunidade 50S do ribossoma bacteriano (Kapoor et al., 2017; van Hoek et al., 2011).

A classe das lincosamidas, que inclui os antibióticos lincomicina e clindamicina, podem ser bacteriostáticas ou bactericidas, dependendo da concentração e da espécie bacteriana onde vão atuar (Allison & Lambert, 2015; T. Lambert, 2012).

As estreptograminas são antibióticos utilizados em infeções causadas por bactérias gram-positivas, podendo ser de dois tipos, estreptogramina A e B. Quando combinados numa proporção específica, apresentam atividade bactericida, enquanto que separadas apresentam uma atividade bacteriostática. A combinação mais conhecida destes antibióticos é a quinupristina-dalfopristina, com uma proporção de 30:70. Juntos conseguem bloquear o alongamento das cadeias polipeptídicas de maneira semelhante aos macrólidos e às lincosamidas (Allison & Lambert, 2015; T. Lambert, 2012).

As polimixinas são antibióticos bactericidas que atuam principalmente contra bactérias gram-negativas. A colistina tem como alvo a membrana externa das bactérias. Devido a uma interação eletrostática que ocorre entre a polimixina carregada positivamente e os grupos fosfato da membrana do lípido A carregados negativamente, existe uma deslocação de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  que destabiliza o lipopolissacárido (LPS) (Allison & Lambert, 2015; Poirel et al., 2005).

Os aminoglicosídeos são uma classe de antibióticos bactericidas, de amplo espectro, que incluem antibióticos com a gentamicina, estreptomicina, amicacina e apramicina. Estes antibióticos atuam na síntese proteica como inibidores da subunidade 30S do ribossoma bacteriano (Allison & Lambert, 2015; Kapoor et al., 2017; Krause et al., 2016).

Os glicopeptídeos, tal como os  $\beta$ -lactâmicos, são agentes bactericidas que interrompem a síntese de peptidoglicano, mas que interferem com a reação da transglicosilação (Allison & Lambert, 2015; Kapoor et al., 2017; P. Lambert, 2005). Dois antibióticos pertencentes a esta classe são a vancomicina e a teicoplanina, ambos com atividade contra bactérias gram-positivas (Binda et al., 2014).

Os anfenicóis são um grupo de antibióticos de amplo espectro, com atividade principalmente bacteriostática, que incluem o cloranfenicol e o florfenicol (Pietro et al., 2014). Os membros desta classe bloqueiam a atividade da peptidiltransferase na subunidade ribossômica 50S (Allison & Lambert, 2015; Kapoor et al., 2017).

Os lipopéptidos, com a daptomicina, são antibióticos bactericidas, altamente ativos contra bactérias multirresistentes. Embora o mecanismo de ação ainda não esteja totalmente esclarecido, acredita-se que tenham como alvo a membrana bacteriana (Straus & Hancock, 2006).

As sulfonamidas e o trimetoprim inibem etapas distintas no metabolismo do ácido fólico, sendo combinadas para aumentar o espectro de atividade e haver eficácia contra bactérias que seriam resistentes a qualquer um dos antimicrobianos sozinhos (Kapoor et al., 2017). Estes antibióticos podem exibir efeitos bacteriostáticos ou bactericidas consoante o tipo de tratamento aplicado (Gleckman et al., 1981).

Os antibióticos da classe das oxazolidinonas ligam-se à subunidade 50S do ribossoma e bloqueiam a montagem de um complexo de iniciação funcional (Allison & Lambert, 2015; Zahedi Bialvaei et al., 2017). O antibiótico linezolida tem atividade contra uma variedade de bactérias gram-positivas, inclusive multirresistentes, sendo utilizado como um antibiótico de último recurso (Zahedi Bialvaei et al., 2017).

### **1.3. Uso de antibióticos em aquacultura**

O uso dos antibióticos nesta indústria pode ser categorizado como terapêutico, profilático ou metafilático. O uso terapêutico corresponde ao tratamento de infeções estabelecidas nos animais aquáticos, enquanto que a profilaxia é o uso preventivo de antibióticos em indivíduos ou grupos para prevenir o desenvolvimento das infeções. A metafilaxia é um termo usado para a medicação de populações inteiras, visando tratar os animais doentes e medicar os restantes indivíduos para prevenir doenças (Cabello, 2006; Pepi & Focardi, 2021; Pérez-Sánchez et al., 2018).

Não existem antibióticos especificamente concebidos para a aquacultura, sendo utilizados fármacos autorizados para outras áreas da medicina (Santos & Ramos, 2018). Portugal integra o grupo de países que adota a legislação da União Europeia (UE) que autoriza o uso de oxitetraciclina, florfenicol, sarafloxacina, eritromicina e sulfonamidas (potenciadas com trimetoprim ou ormetoprim) na aquacultura (Salgueiro et al., 2020). Até 2006 era recorrente o uso de promotores de crescimento para aumentar a produtividade nas explorações de aquacultura, sendo atualmente proibida a sua utilização na Europa (Romero et al., 2012). As classes de antibióticos mais vendidas em Portugal para uso em animais produtores de alimentos (incluindo peixes) entre 2019 e 2020 foram: tetraciclina, penicilina, macrólidos, polimixinas e fluoroquinolonas (European Medicines Agency, 2021). Na Figura 1.2 estão representadas as vendas de antibióticos para animais produtores de alimentos nos 31 países europeus, incluindo

Portugal. No entanto, a partir deste gráfico não é possível fazer a distinção entre os vários animais produtores de alimentos, nem saber efetivamente que antibióticos foram vendidos para aquacultura.

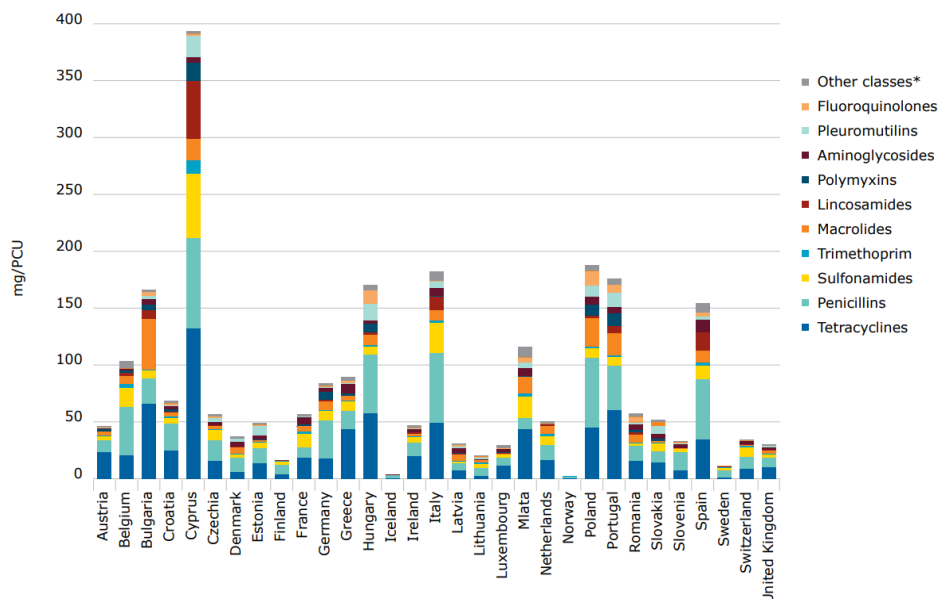


Figura 1.2. Vendas de antibióticos (mg/PCU) para o uso em animais produtores de alimentos em 31 países europeus em 2020, incluindo Portugal. As classes de antibióticos estão associadas a cores no gráfico. “*Other classes*” refere-se a outras classes de antibióticos como anfenicóis, cefalosporinas e quinolonas. A mg/PCU é uma unidade de medida desenvolvida pela Agência Europeia de Medicamentos para monitorizar as vendas e o uso de antibióticos na Europa e tem em consideração a população animal, bem como o peso estimado de cada animal no momento do tratamento com antibióticos. Retirado de European Medicines Agency (2021).

As vias mais comuns de administração de antibióticos nas explorações de aquacultura são a utilização de rações medicadas, a adição direta na água da exploração e a administração direta nos animais, por injeção (Cabello et al., 2013; Park et al., 2012). Os antibióticos que são adicionados diretamente na água são absorvidos pelos peixes através das guelras, pele e mucosas e atuam onde a taxa de circulação sanguínea é alta, como no intestino e nas guelras. A ração medicada é caracterizada pela adição e mistura de antibióticos na ração (Muziasari et al., 2014).

#### 1.4. Mecanismos de resistência a antibióticos

O uso terapêutico, profilático e metafilático de antibióticos provoca uma pressão seletiva no ambiente, resultando na ocorrência de bactérias com resistências a antibióticos (Manage, 2018), mesmo quando são administradas concentrações baixas ou muito baixas de antibióticos (concentrações sub-inibitórias) (Reygaert, 2018). A resistência antimicrobiana ocorre quando um microrganismo possui a capacidade de sobreviver à ação de um antibiótico, sendo que as bactérias podem ser naturalmente resistentes (resistência intrínseca) a certas substâncias antimicrobianas ou podem adquirir as resistências (resistência adquirida) (D’Costa et al., 2006; Manage, 2018; Santos & Ramos, 2018).

A resistência intrínseca é compartilhada por todos os membros pertencentes à mesma espécie bacteriana e independente da exposição ao antibiótico. A atividade natural das bombas de efluxo e a permeabilidade reduzida da membrana externa são dois exemplos de mecanismos que impedem que o antibiótico possa atuar dentro das células bacterianas (Reygaert, 2018).

A resistência adquirida ocorre quando um microrganismo naturalmente suscetível a um determinado antibiótico se torna resistente, devido a modificações genéticas ou à aquisição de material genético através de elementos genéticos móveis (EGM) (Done et al., 2015; Watts et al., 2017). Como tal, a informação genética que codifica a resistência pode ser transmitida à descendência através da transferência vertical de genes (TVG) ou por transferência horizontal de genes (THG) (Manage, 2018), como representado na Figura 1.3.

Muitas vezes detetam-se vários mecanismos de resistência ativos, podendo haver transferência horizontal de genes intercalada com bombas de efluxo específicas e enzimas que podem modificar o antibiótico ou o alvo do antibiótico (Peterson & Kaur, 2018).

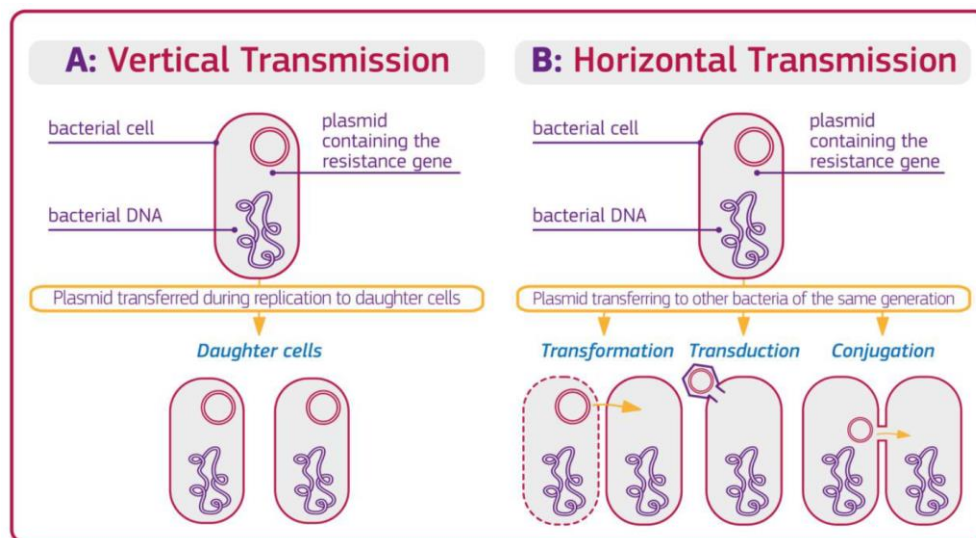


Figura 1.3. Diferenças entre o mecanismo de transferência vertical de genes e transferência horizontal de genes. A: Durante a replicação, a bactéria pode transferir um gene de resistência a antibióticos, contido num plasmídeo, para a próxima geração. Para além disso, podem haver mutações no seu genoma que são transmitidas à geração seguinte. B: A transmissão horizontal de genes em bactérias pode ser mediada por três mecanismos principais: transformação, transdução e conjugação. Pode ocorrer transmissão de informação entre bactérias da mesma espécie ou entre espécies diferentes. Retirado de European Commission et al. (2018).

O conjunto de genes de um determinado microbioma, incluindo os não expressos, que confere resistência antimicrobiana, é designado por resistoma (D'Costa et al., 2006). Engloba ARGs de resistência adquirida e de resistência intrínseca, precursores e alguns potenciais mecanismos de resistência que ainda requerem evolução ou alterações de expressão para conferir a resistência (Kim & Cha, 2021). O mobiloma é definido como todos os elementos genéticos móveis envolvidos na transferência horizontal de genes detetáveis num microbioma (Carr et al., 2021).

A resistência a antibióticos pode desenvolver-se através de vários mecanismos diferentes, sendo os principais: (I) alterações do alvo do antibiótico, (II) redução da permeabilidade da membrana celular, (III) modificação ou inativação enzimática, (IV) eliminação do antibiótico por bombas de efluxo e (V) utilização de vias metabólicas alternativas (Manage, 2018; van Hoek et al., 2011).

A resistência intrínseca é principalmente feita através dos mecanismos (II), (III) e (IV), enquanto que os mecanismos de resistência adquiridos mais descritos são (I), (III) e (IV) (Reygaert, 2018).

Mecanismo (I): Mutações ou modificações pós-traducionais na molécula alvo de antibiótico podem levar a alterações conformacionais que resultam numa diminuição da afinidade do antibiótico ao seu local de ligação. Dois exemplos deste mecanismo de resistência são mutações cromossómicas nas subunidades das enzimas DNA girase e topoisomerase IV, responsáveis pela resistência às

fluoroquinolonas, e alterações estruturais nas PBPs que conferem resistência às penicilinas (Huemer et al., 2020; Kapoor et al., 2017; P. Lambert, 2005; Reygaert, 2018).

Mecanismo (II): A membrana celular funciona como uma barreira à entrada dos antibióticos, impedindo-os de exercer o seu propósito. A estrutura e funções da camada de LPS e a existência de uma membrana externa torna as bactérias gram-negativas intrinsecamente menos permeáveis a muitos antibióticos (Blair et al., 2015). Isso resulta numa resistência intrínseca a certos grupos de antibióticos. As bactérias gram-positivas não possuem membrana externa e a restrição do acesso aos antibióticos não é tão expressiva. No entanto, no caso dos *Enterococcus*, as moléculas polares têm dificuldade em penetrar a célula bacteriana, conferindo também uma resistência (Reygaert, 2018). Os antibióticos hidrofílicos que atravessam a membrana externa (como os  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclinas e algumas fluoroquinolonas) difundem-se pelas porinas da membrana externa. Portanto, a redução da permeabilidade da membrana externa e a limitação da entrada do antibiótico na célula bacteriana é conseguida pela regulação negativa das porinas ou pela substituição das porinas por canais mais seletivos (Blair et al., 2015; Huemer et al., 2020; Peterson & Kaur, 2018).

Mecanismo (III): As bactérias conseguem inativar os antibióticos através de dois mecanismos, pela degradação do fármaco ou por modificações químicas. Já foram identificadas milhares de enzimas capazes de degradar e modificar antibióticos como  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e macrólidos (Blair et al., 2015). As  $\beta$ -lactamases são um dos melhores exemplos de resistência por hidrólise. Estas enzimas clivam o anel  $\beta$ -lactâmico e impedem a ligação entre o antibiótico e as PBPs, tornando-o ineficaz. Vários tipos diferentes de  $\beta$ -lactamases foram descritos e classificados de acordo com suas funções bioquímicas (classificação de Bush-Jacob) ou suas características estruturais (classificação de Ambler). A classificação de Ambler sugere as classes A, B, C e D. A caracterização estrutural e funcional classifica as  $\beta$ -lactamases em dois grupos, um com serina no local catalítico ativo (classes A, C, D) e outro com metaloenzimas zinco-dependentes (classe B). Na classe A estão incluídas as penicilinases, carbapenemases, cefalosporinas e  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL). Os genes que codificam as enzimas CTX-M, pertencentes à ESBL, foram encontrados associados a transposões ou sequências de inserção em *Escherichia coli* resistente a cefalosporinas (European Commission et al., 2018). As enzimas da classe B incluem as metalo- $\beta$ -lactamases, como a metalo-beta-lactamase-1 de Nova Deli (NMD-1), que necessitam de zinco como cofator para a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico (Ray et al., 2017). O gene *blaNMD* foi localizado no cromossoma do hospedeiro e em plasmídeos e é caracterizado por uma alta mobilidade num curto espaço de tempo. As  $\beta$ -lactamases da classe C e classe D são enzimas como AmpC e enzimas hidrolisadoras de oxacilina (OXA), respetivamente. A AmpC  $\beta$ -lactamase é uma cefalosporinase e o gene *blaAmpC* está localizado tanto no cromossoma como em plasmídeos. Os genes que codificam enzimas AmpC mediadas por plasmídeos derivam de cefalosporinas AmpC cromossómicas e englobam várias famílias, nomeadamente as CMY, ACT, DHA, FOX, MIR, ACC, LAT e MOX. As enzimas OXA têm a capacidade de hidrolisar a oxacilina e são frequentemente associadas a EGMs (European Commission et al., 2018; Ray et al., 2017).

Por outro lado, a adição de grupos químicos a locais vulneráveis da molécula de antibiótico por enzimas bacterianas impede que o antibiótico se ligue à sua proteína alvo (Blair et al., 2015). A acetilação é o mecanismo mais utilizado, sendo utilizado contra os aminoglicosídeos, cloranfenicol, as estreptograminas e as fluoroquinolonas. A fosforilação e a adenilação são conhecidas por serem usadas principalmente contra os aminoglicosídeos (Peterson & Kaur, 2018; Reygaert, 2018). Estas enzimas que modificam os aminoglicosídeos existem em certos elementos genéticos móveis como integrões onde permitem a transmissão de resistência (Ray et al., 2017).

Mecanismo (IV): Para um antibiótico ter efeito necessita de permanecer a altas concentrações dentro da célula bacteriana por um longo período. Por esta razão, algumas bactérias usam o transporte ativo do antibiótico para fora da célula como mecanismo de resistência. As bactérias possuem genes codificados cromossomicamente para bombas de efluxo, sendo alguns expressos constitutivamente e outros induzidos ou superexpressos (Reygaert, 2018). Essas bombas estão presentes na membrana citoplasmática e são as responsáveis pelo efluxo do antibiótico para fora da célula (Kapoor et al., 2017). Existem bombas de efluxo específicas para uma determinada classe de antibióticos e bombas com capacidade de transportar uma ampla gama de substratos estruturalmente diferentes, sendo estas últimas conhecidas como bombas de efluxo de resistência a múltiplas drogas (MDR) (Blair et al., 2015). Existem cinco famílias de bombas de efluxo em bactérias: ABC (*ATP-binding cassette transporters*), RND (*resistance-nodulation-cell division*), MF (*major facilitator*), SMR (*small multidrug resistance*) e MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) (Ray et al., 2017; Reygaert, 2018).

Mecanismo (V): As bactérias também podem ser resistentes a antibióticos por utilizarem vias metabólicas alternativas (Manage, 2018). Por exemplo, podem captar folato do ambiente ao invés de sintetizar o folato, tornando-se resistente aos antibióticos sulfonamida e trimetoprim (Saha & Sarkar, 2021).

#### **1.4.1. Transferência horizontal de genes e elementos genéticos móveis**

A resistência adquirida pode ocorrer igualmente por aquisição de material genético exógeno através de mecanismos de transferência horizontal de genes (THG). A transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos (ARGs) pode ser mediada por três mecanismos principais: transformação, transdução e conjugação (Done et al., 2015; Watts et al., 2017). A transformação é o fenômeno da absorção do DNA nu do ambiente pelas células da bactéria, a transdução ocorre quando o DNA é transferido com a ajuda de bacteriófagos. Por último, a conjugação dá-se quando o DNA é transferido usando EGMs, tais como plasmídeos, sequências de inserção (IS), transposões e elementos genéticos mobilizáveis como os integrões (localizados em transposões ou plasmídeos) com cassetes de genes (Reygaert, 2018; van Overbeek, 2019).

Os plasmídeos são elementos extracromossômicos, capazes de se replicar autonomamente e capazes de se autotransmitir entre células. Têm a capacidade de coletar vários ARGs, que codificam a resistência para diferentes classes de antibióticos, e transferi-los para a bactéria recetora, o que leva ao estabelecimento de bactérias multirresistentes no ambiente (Carroll & Wong, 2018; Lermniaux & Cameron, 2019; Rozwandowicz et al., 2018; van Hoek et al., 2011). Contêm uma origem de replicação, uma origem de transferência e genes que codificam funções específicas como autorreplicação, partição e transferência conjugativa. Os plasmídeos que abrigam genes de conjugação são chamados conjugativos. Os plasmídeos que não tem nenhum gene para compor o aparelho de conjugação, são chamados de mobilizáveis, e necessitam de usar as funções de conjugação de plasmídeos conjugativos. Existem plasmídeos que têm uma ampla gama de hospedeiros, podendo transferir a sua informação genética para diferentes espécies, enquanto outros têm uma gama de hospedeiros muito mais estreita, sendo específicos de um género ou espécie. A desvantagem deste elemento é a sua instabilidade, visto que por vezes, o plasmídeo pode ser perdido pela bactéria. Alguns estudos sugerem que isto ocorre porque o transporte de plasmídeos com genes de resistência é geralmente caro, em termos de *fitness*, para o hospedeiro na ausência de antibióticos. Isto não significa que possuir um plasmídeo com genes de resistência afeta sempre negativamente o *fitness* (Carroll & Wong, 2018) e que não são uma opção viável para a bactéria, visto que também existe um custo associado a mutações cromossômicas, que por

vezes é superior ao de EGMs (Carroll & Wong, 2018; Vogwill & MacLean, 2015). Foram definidos quatro grupos principais com base na relação genética e na estrutura do *pilus*: grupo IncF (contendo IncC, IncD, IncF, IncJ e IncS), grupo IncI (IncB, IncI e IncK), grupo IncP (IncM, IncP, IncU e IncW) e Ti (van Hoek et al., 2011).

As sequências de inserção (IS) são pequenos segmentos de DNA, geralmente flanqueados por curtas sequências repetitivas e invertidas. Carregam informação necessária à transposição do elemento, transportando pelo menos um gene de transposase. Não codificam para nenhum tipo de resistência, mas podem alterar a expressão de genes próximos. Quando estes elementos contêm genes acessórios não envolvidos na translocação do elemento, são chamados de transposões (van Hoek et al., 2011).

Os transposões têm a capacidade de se mover intra e intermolecularmente, e transportar genes, incluindo genes de resistência a antibióticos, entre plasmídeos, entre o cromossoma e um plasmídeo, e vice-versa. Existem os transposões compostos, que transportam genes acessórios que estão flanqueados por IS, e transposões não compostos, que possuem repetições terminais invertidas a flanquear o gene. Dois exemplos de transposões muito conhecidos são o Tn3, que codifica resistência a vários antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo ampicilina, e o transposição Tn21, que codifica resistência a estreptomicina e sulfonamidas. Estes transposões são comumente encontrados em membros das *Enterobacteriaceae* (Bennett, 2008).

Os integrões já foram detetados em diversos ambientes diferentes, como solos, sedimentos, biofilmes aquáticos, superfícies de plantas, sedimentos marinhos e sedimentos do fundo do mar (Gillings, 2014). Também são bastante comuns em contexto clínico. Estes elementos conseguem capturar, mobilizar e expressar cassetes de genes, incluindo ARGs e podem ser encontrados em plasmídeos, transposões e mesmo no cromossoma de algumas espécies bacterianas. As cassetes de genes podem existir numa forma circular livre ou estar inseridas em integrões (Partridge et al., 2018), podendo mesmo haver várias cassetes no mesmo integrão, inseridas sempre na mesma orientação (Partridge et al., 2009). É utilizado um mecanismo de recombinação sítio-específica que é definido pela presença de um gene *intI*, que codifica uma integrase (IntI) da família da tirosina recombinase, um local de recombinação *attI* e um promotor. A recombinação catalisada por IntI entre o local *attI* do integrão e o local *attC* de uma cassette ocorre para haver inserção ou excisão da cassette. Os integrões estão divididos com base na sequência de aminoácidos das integrases, tendo sido definidas as classes 1-5, que carregam os genes *intI1-intI5* (Partridge et al., 2009, 2018). Os integrões da classe 1 são os mais prevalentes, encontrando-se numa grande variedade de espécies e estando associados a uma grande diversidade de cassetes de genes. Comparativamente com esta classe, os integrões da classe 2 possuem uma capacidade de adquirir e rearranjar cassetes de genes muito mais restrita e os integrões de classe 3 possuem uma menor diversidade de cassetes genéticas (Gillings, 2014). Embora todas as classes de integrões tenham sido associadas a determinantes de resistência a antibióticos, as classes 1 e 2 são as mais comuns em bactérias multirresistentes (Nguyen et al., 2014).

Todos estes elementos têm um papel fundamental na dispersão de genes de resistência a antibióticos entre bactérias do ambiente, incluindo em aquicultura (R. A. Miller & Harbottle, 2018; Preena et al., 2020).

## **1.5. Implicações do uso excessivo de antibióticos em aquicultura**

Os resíduos dos antibióticos podem permanecer nos tecidos dos peixes por longos períodos (Santos & Ramos, 2018), podendo causar efeitos nocivos não apenas aos animais como também a quem os consome, como alergias, toxicidade, perda de diversidade da microbiota intestinal (J. Chen et al., 2020; Reygaert, 2018; Santos & Ramos, 2018; Vignesh et al., 2011). Para além disso, existe a possibilidade de aquisição de resistências a antibióticos não exclusivos para a aquicultura. A ameaça ambiental também é uma realidade devido à acumulação de resíduos de antibióticos nos sedimentos das explorações de aquicultura e ambiente circundante (Santos & Ramos, 2018).

A abordagem *One Health* reconhece que a saúde humana, animal e ambiental estão intrinsecamente ligadas (Udaondo & Huertas, 2020), tendo como princípios uma abordagem colaborativa, multissetorial e transdisciplinar para alcançar resultados benéficos de saúde e bem-estar para pessoas, organismos não humanos e ambiente. A resistência aos antibióticos tem sido considerada um desafio à estratégia *One Health* devido ao rápido surgimento e disseminação de bactérias e determinantes de resistência entre os três setores (Rousham et al., 2018). É necessário haver uma monitorização do consumo de antibióticos e um aumento da investigação sobre resistências antimicrobianas em humanos, animais, alimentos e meio ambiente (Santos & Ramos, 2018). Já existem estudos que incidem sobre patógenos em animais produtores de alimentos (Usui et al., 2016) e bactérias associadas a doenças zoonóticas, mas a investigação tem de ser expandida para incluir mais a aquicultura (Santos & Ramos, 2018), principalmente em Portugal. Para tentar minimizar os riscos para a saúde pública, animal e a ambiental, a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) criaram planos de ação globais e nacionais para coletar dados importantes sobre esta questão (Rousham et al., 2018; Usui et al., 2016; Zhou et al., 2022). Para além disto, os Estados-Membros das Nações Unidas (ONU) adotaram a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável, centrada na segurança alimentar (Reverter et al., 2020; Santos & Ramos, 2018).

### **1.5.1. Impacto na Saúde pública e Animal**

O uso e abuso de antibióticos em aquicultura pode levar a consequências futuras no tratamento de infeções em humanos e animais. A OMS publicou uma lista que classificava os antibióticos quanto a sua importância na medicina humana (CIA), lista que é regularmente revista e atualizada. Isto permitiu perceber quais são os antibióticos que são criticamente importantes, altamente importantes e importantes no tratamento de infeções humanas (J. Chen et al., 2020; World Health Organization, 2019). Dos 51 antibióticos utilizados pelos principais países produtores de animais de produção alimentar (incluindo aquicultura), 37 estão classificados como criticamente importantes ou altamente importantes para a medicina humana (Santos & Ramos, 2018). O uso destes antibióticos de primeira linha para a medicina humana na indústria da aquicultura pode originar resistências antimicrobianas que comprometem a medicação em clínica humana (J. Chen et al., 2020; Santos & Ramos, 2018). Um exemplo disto é o estudo de Furushita et al. (2003) em que se encontraram genes de resistência à tetraciclina, antibiótico altamente importante para a medicina humana, em bactérias isoladas de três espécies de peixes diferentes oriundos de aquicultura. O preocupante é que os genes *tet* encontrados tinham uma alta similaridade com os de bactérias isoladas de humanos, tendo possivelmente as mesmas origens. A resistência à tetraciclina é a resistência mais comumente observada nas bactérias isoladas da aquicultura (Yang et al., 2013) mas não está sempre associada ao uso de antibióticos na exploração (Karunasagar, 2020). Noutro estudo, foram identificados plasmídeos que transferiram vários genes de resistência de

bactérias existentes em peixes para bactérias patogênicas humanas, incluindo *Vibrio cholerae* e *V. parahaemolyticus* (Santos & Ramos, 2018).

Para promover o equilíbrio entre as necessidades de saúde animal e de saúde pública (Manage, 2018), a OIE criou a lista de agentes antimicrobianos de importância crítica veterinária (VCIA) (World Organization for Animal Health, 2021) e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) fez uma categorização dos antibióticos utilizados em animais (European Medicines Agency, 2020). A classificação da lista VCIA dividia-se em três categorias, antibióticos criticamente importantes, altamente importantes e importantes para a medicina veterinária. A lista criada pela EMA agrupava os antibióticos em quatro categorias: na categoria A (Evitar) estão incluídos os antibióticos que atualmente não são autorizados em medicina veterinária na UE, não podendo ser utilizados em animais produtores de alimentos. Na categoria B (Restringir) incluiu-se os antibióticos cujo uso deve ser restrito em animais para mitigar o risco à saúde pública, devido à sua extrema importância na medicina humana. A categoria C (Cuidado) reúne os antibióticos que só devem ser usados quando não houver um antibiótico da categoria D que seja eficaz. A categoria D (Prudência) abrange antibióticos que devem ser usados como tratamentos de primeira linha em animais, sempre que possível, mas com prudência (European Medicines Agency, 2020). Na Tabela 1.1 estão discriminados os antibióticos de importância crítica para a medicina humana e veterinária.

Tabela 1.1. Classificação dos antibióticos segundo as listas CIA, VCIA e EMA, que categorizam antibióticos quanto à sua importância para a medicina humana e veterinária. Os antibióticos da lista CIA e VCIA estão divididos em três subgrupos de acordo com a sua prioridade para a medicina humana e veterinária, respetivamente. Na lista criada pela EMA, os antimicrobianos são divididos em quatro categorias (A, B, C, D), relacionando as necessidades da saúde animal com as de saúde pública. Adaptado de European Medicines Agency (2020), World Health Organization (2019) e World Organization for Animal Health (2021).

Classe de antibióticos	Classificação segundo a lista CIA	Prioridade	Classificação segundo a lista VCIA	Classificação segundo a EMA
Glicopeptídeos	Criticamente importante	Prioridade Máxima	ND	Categoria A (Evitar)
Cefalosporinas de 3ª, 4ª e 5ª geração			Criticamente importante	Categoria B (Restringir)
Fluoroquinolonas			Altamente importante	
Polimixinas			Criticamente importante	Categoria C (Cuidado)
Quinolonas de 1ª geração				
Macrólidos		Prioridade Alta	ND	Categoria A (Evitar)
Carbapenemes				
Lipopeptídeos				
Oxazolidinonas			Criticamente importante	Categoria C (Cuidado)
Aminoglicosídeos				Categoria D (Prudência)
Combinações Aminopenicilinas com inibidores de β-lactamase	Altamente importante	ND	ND	Categoria A (Evitar)
Aminopenicilinas			Altamente importante	Categoria C (Cuidado)
Estreptograminas				
Anfenicóis				
Cefalosporinas de 1ª e 2ª geração			Criticamente importante	Categoria D (Prudência)
Lincosamidas				
Sulfonamidas, Trimetoprim e combinação				
Tetraciclina				

ND – Não definido.

## 1.5.2. Impacto na Saúde Ambiental

Cerca de 70-80% dos antimicrobianos administrados aos peixes de aquacultura disseminam-se no ambiente, através de fezes dos mesmos e medicamentos não consumidos (Cheng et al., 2021). Com a acumulação destes resíduos, pode promover-se uma pressão seletiva prolongada, provocando a emergência de determinantes de resistência a antibióticos. Nestas condições, o ambiente força a bactéria a adaptar-se para sobreviver, selecionando a resistência por múltiplos mecanismos (Cabello et al., 2013; Manage, 2018; Reverter et al., 2020; Santos & Ramos, 2018; Watts et al., 2017). Já foi descrita a presença de ARGs nas comunidades bacterianas ambientais de vários ecossistemas, incluindo sedimentos marinhos, solos, instalações de aquacultura, fábricas de processamento alimentar e em peixes comercializados (Helsens et al., 2020). Um estudo nas instalações de aquacultura na Finlândia revelou que genes de resistência a sulfonamidas, *sul1* e *sul2*, trimetoprim, *dfrA1*, e um gene da integrase para um integrão de classe 1, *intI1*, persistiram nos sedimentos das instalações durante seis anos (Muziasari et al., 2014). Dang et al. (2007) relataram a identificação de genes de resistência à tetraciclina semelhantes em três países próximos, a Coreia do Sul, China e Japão, mostrando o real potencial de disseminação de ARGs no ambiente (Cabello et al., 2013; Romero et al., 2012; Salgueiro et al., 2020; Watts et al., 2017). Ao longo dos anos têm sido identificados vários genes de resistência a antibióticos em fezes da dourada (*Sparus aurata*), como  $\beta$ -lactamases de amplo espectro, incluindo *blaTEM-52* e *blaSHV-12*, bem como genes de resistência ao cloranfenicol *cmlA*, à tetraciclina *tetA*, aos aminoglicosídeos *aadA*, e à sulfonamida *sul1*, *sul2* e *sul3* (Sousa et al., 2011). Em enguias (*Anguilla anguilla*) foram isoladas estirpes de *Aeromonas* spp. multirresistentes e com múltiplos plasmídeos, integrões e cassetes de genes (Watts et al., 2017), elementos que promovem a disseminação destes ARGs pelos vários ecossistemas.

## 2. Objetivos do estudo

O objetivo principal deste estudo foi identificar as resistências antimicrobianas existentes em ambiente de aquacultura.

Para isso definiram-se as seguintes estratégias:

1. Caracterizar fenotípicamente o perfil de resistência dos isolados bacterianos obtidos em explorações de aquacultura, através dos métodos de difusão em agar e de microdiluição em caldo (meio de cultura líquido).
2. Pesquisar genes de resistência a antibióticos e integrões das classes 1, 2, e 3 recorrendo a ensaios de reação de polimerase em cadeia na variante multiplex (*mPCR*).
3. Caracterizar genómicamente os isolados que apresentem perfis de multirresistência e/ou integrões por Sequenciação Completa do Genoma (WGS).

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Colheita das amostras

No âmbito do projeto AquaRAM, a equipa de investigação do Laboratório de Bacteriologia e Micologia do INIAV recolheu amostras de sedimentos de aquacultura dos estuários do Rio Sado, Rio Tejo, Ria de Aveiro e Rio Lima, tal como representado na Figura 3.1. Nas explorações escolhidas não existia administração de antibióticos por parte dos produtores.

Foram selecionadas três zonas no estuário do Sado, S1 e S2, onde estão localizadas explorações de aquacultura de ostras (*Crassostrea angulata*) que utilizam um sistema semi-intensivo, e a zona D1, onde é feito o cultivo de douradas (*Sparus aurata*) através de um sistema intensivo. Para além de sedimentos, também foram recolhidas ostras e o conteúdo intestinal de douradas, com o objetivo de testar o ambiente e os animais das explorações. As explorações S1 e S2 estão situadas em diferentes zonas do estuário, sendo que na zona S2 existem várias indústrias, pequenas ETAR's e possíveis fossas sépticas na zona urbana. Apesar de não ser tão industrializada, a zona S1 tem alguma atividade antropogénica, resultante da existência de pequenas quintas, criação de animais domésticos de particulares e algumas embarcações de pequeno porte.

No âmbito de atividades do IPMA, parceiro deste projeto, foram utilizadas amostras de sedimentos e de miolo de ameijoia japonesa (*Ruditapes philippinarum*) e de mexilhão (*Mytilus* spp.) colhidas no estuário do Tejo. A zona escolhida neste estuário, apesar de não estar oficialmente estabelecida como aquacultura, alberga atividades de recolha de bivalves para consumo humano e, como a cidade de Lisboa se localiza nas margens deste estuário, existe grande atividade antropogénica.

Os estuários do Rio Lima e Ria de Aveiro são zonas de produção de moluscos semi-intensiva bastante conhecidas, tendo sido selecionadas devido à sua importância e volume de produção.



Figura 3.1. Representação dos locais de colheita das amostras. Adaptado de [https://d-maps.com/carte.php?num\\_car=2492&lang=es](https://d-maps.com/carte.php?num_car=2492&lang=es)

### 3.2. Isolamento e identificação bacteriana

As amostras, vindas de todos os locais, foram enviadas refrigeradas a 4°C para o Laboratório de Bacteriologia e Micologia do INIAV. O isolamento e identificação dos 19 isolados bacterianos, pelos métodos abaixo indicados, foi realizado pela equipa de investigação do projeto AquaRAM, no INIAV. Os isolados foram codificados com um número seguido das letras AQ. Para o efeito, utilizaram-se os meios de cultura: *Tryptose Soya Agar* (TSA), *Marine Agar* (MA), *Columbia Blood Agar*, *MacConkey Agar* (MAC), *Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar* (TCBS) e *Glutamate Starch Phenol Red Agar* (GSP). O MAC é um meio de cultura seletivo e diferencial que limita o crescimento de bactérias gram-positivas e também permite diferenciar microrganismos gram-negativos com base no metabolismo da lactose. O meio TCBS é seletivo para o isolamento de *Vibrio* spp., enquanto que o GSP é seletivo e diferencial para deteção e diferenciação de *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp.

Após sementeira nestes meios de cultura, as placas de Petri foram incubadas 24-28h a 28°C, temperatura usada para mimetizar o ambiente aquático, em atmosfera aeróbica. Selecionaram-se as colónias que apresentavam morfologia distinta para serem repicadas e identificadas. A coloração de Gram foi feita como descrito por Coico (2006), tendo sido observada a presença de 14 isolados gram-negativos e cinco gram-positivos. Os isolados gram-negativos foram inoculados em meio *Triple Sugar Iron Agar* (TSI) e incubados a 28°C durante 24 h. Com este meio de cultura foi possível distinguir as bactérias oxidase positiva de oxidase negativa, conseguindo-se uma identificação presuntiva de *Enterobacteriaceae* com base na fermentação de glicose, lactose, sacarose e na produção de gás e H<sub>2</sub>S.

As galerias bioquímicas API 20NE (bioMérieux, França) foram utilizadas, de acordo com as instruções do fabricante, para identificar bactérias gram-negativas não-fastidiosas, não fermentadores, oxidase positiva como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio* e *Aeromonas*. A identificação foi feita usando a base de dados online apiweb™, onde se inseriu o perfil numérico de sete algarismos obtido por isolado, para ser comparado com outros perfis. Para microrganismos gram-negativos oxidase-negativa, foram utilizadas as galerias ID32 E (bioMérieux, França), que permitem a identificação de isolados pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Para a identificação das bactérias gram-positivas foram utilizadas as galerias Rapid ID 32 STREP (bioMérieux, França) que são um sistema padronizado para a identificação de *Enterococcus* e de *Streptococcus*.

Após identificação, as colónias foram repicadas do meio TSA (meio de manutenção das culturas) e transferidas para meio de conservação *Tryptose Soya Broth* com 15% de glicerol, um crioprotetor, e preservadas a -80°C.

### 3.3. Testes de suscetibilidade a antibióticos

#### 3.3.1. Método de difusão em agar (DA)

O método de difusão em agar (DA) permitiu avaliar a suscetibilidade a diversos antibióticos de todos os isolados (n=19), sendo realizado seguindo o protocolo M42-P do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005a). Este método foi padronizado para bactérias não fastidiosas de ambiente aquático como a família *Enterobacteriaceae*, mas também *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas* spp. mesófilas, *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. (apenas estirpes halófilas não obrigatórias), tendo sido testadas à temperatura de 28°C ± 2°C. Como não estão contempladas espécies de *Enterococcus* spp. no protocolo M42-P, os isolados destas espécies foram testados a duas temperaturas diferentes, 28°C ± 2°C

e a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , tal como representado na Figura 3.2, para perceber se existiam diferenças nos perfis de resistência.

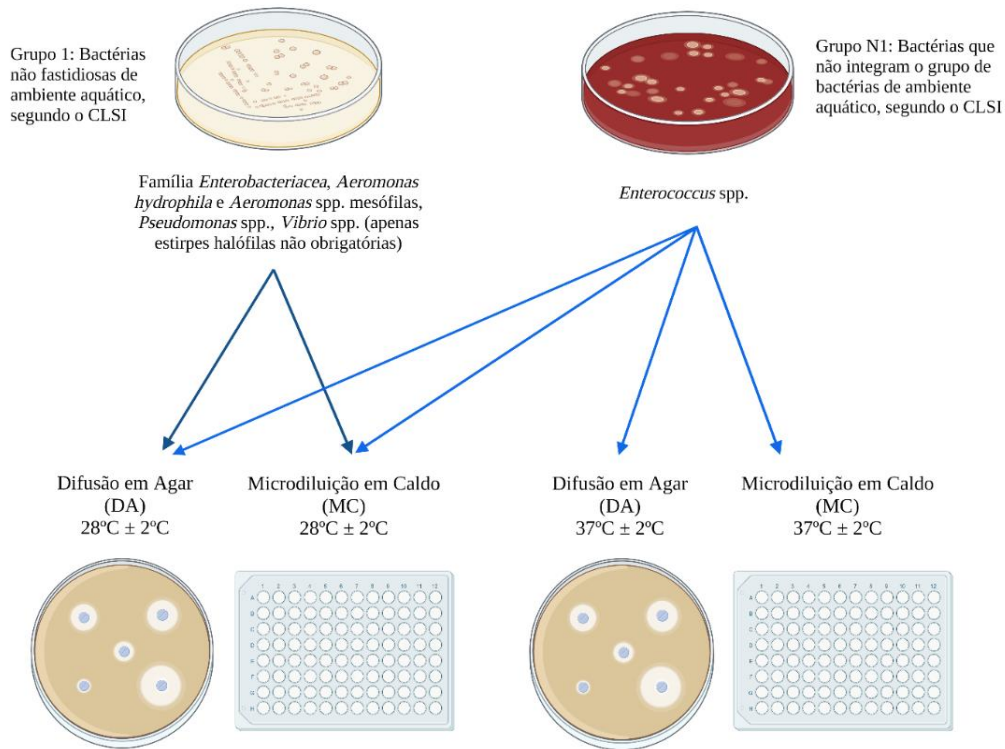


Figura 3.2. Representação esquemática dos ensaios de testes de suscetibilidade a antibióticos. Ambos os grupos foram testado através de dois métodos, difusão em agar e microdiluição em caldo, à temperatura de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , mas o grupo N1 (*Enterococcus* spp.) foi testado simultaneamente a  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*. DA – Difusão em agar. MC – Microdiluição em caldo.

Foram testados 24 antibióticos para cada um dos isolados gram-negativos ( $n=14$ ) incluindo: Amicacina (AKN, 30  $\mu\text{g}$ ), Amoxicilina-ácido clavulânico (AMC, 20/10  $\mu\text{g}$ ), Apramicina (APR, 30  $\mu\text{g}$ ), Azitromicina (AZM, 30  $\mu\text{g}$ ), Ceftazidima (CAZ, 30  $\mu\text{g}$ ), Cefalotina (CEF, 30  $\mu\text{g}$ ), Cefoperazone (CFP, 75  $\mu\text{g}$ ), Cloranfenicol (CHL, 30  $\mu\text{g}$ ), Ciprofloxacina (CIP, 5  $\mu\text{g}$ ), Cefotaxima (CTX, 30  $\mu\text{g}$ ), Ertapenem (ETP, 10  $\mu\text{g}$ ), Florfenicol (FFC, 30  $\mu\text{g}$ ), Cefoxitina (FOX, 30  $\mu\text{g}$ ), Nitrofurantoina (FTN, 300  $\mu\text{g}$ ), Imipenem (IMP, 10  $\mu\text{g}$ ), Marbofloxacina (MAR, 5  $\mu\text{g}$ ), Meropenem (MEM, 10  $\mu\text{g}$ ), Oxitetraciclina (OT, 30  $\mu\text{g}$ ), Piperacilina (PRL, 100  $\mu\text{g}$ ), Ampicilina-Sulbactam (SAM, 10/10  $\mu\text{g}$ ), Sulfametoxazole-Trimetoprim (SXT, 1,25/23,75  $\mu\text{g}$ ), Tigeciclina (TGC, 15  $\mu\text{g}$ ), Ticarcilina (TIC, 75  $\mu\text{g}$ ) e Piperacilina-Trimetoprim (TZP, 100/10  $\mu\text{g}$ ).

Para os cinco isolados gram-positivos foram testados 25 antibióticos, dos quais apenas cinco diferiram dos utilizados para os isolados gram-negativos, tendo sido retirados os antibióticos CFP, FOX, FTN e TIC do ensaio, e adicionada a Teicoplanina (TEC, 30  $\mu\text{g}$ ), Vancomicina (VAN, 30  $\mu\text{g}$ ), Ampicilina (AMP, 10  $\mu\text{g}$ ) e Clindamicina (CMN, 2  $\mu\text{g}$ ). Os discos de antibiótico AKN, AMC, CAZ, CEF, CFP, CHL, CIP, CTX, FOX, FTN, MAR, SXT, VAN, AMP, e CMN foram adquiridos ao fornecedor Bio-Rad, enquanto que os restantes foram adquiridos à Oxoid.

Antes da execução do teste de sensibilidade a antibióticos, os isolados foram inoculados em placas de TSA e incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  (os isolados gram-positivos foram igualmente incubados a  $37^{\circ}\text{C}$ ) em condições aeróbicas por 24 h. As suspensões bacterianas foram preparadas através da transferência de colónias das culturas puras para ampolas de NaCl 0,85%, seguida do ajuste da turbidez a 0,5 na escala de McFarland, por meio de um densitómetro Densimat (BioMérieux, França). Seguiu-se a inoculação da suspensão por

espalhamento em placas de Mueller-Hinton Agar (MHA) com 4 mm de espessura, utilizando uma zaragatoa estéril. Foram colocados no máximo 5 discos de antibiótico por placa de MHA com o auxílio de uma pinça. As placas de MHA foram incubadas 24-28 h a 28°C e 20-24 h a 37°C. Após a incubação, os halos de inibição foram lidos manualmente sobre uma superfície escura com auxílio de uma régua, com erro de  $\pm 0,5$ mm que é metade da menor divisão da escala.

A interpretação dos resultados obtidos devia ser feita utilizando apenas os critérios epidemiológicos (ECOFFs) determinados pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), mas devido à escassez dos mesmos, houve a necessidade de também recorrer aos critérios clínicos. Os critérios escolhidos para a interpretação dos halos de inibição estão descritos na Tabela 3.1. O ECOFF é o menor diâmetro do halo de inibição, ou valor de CIM mais alto, que distingue os microrganismos sem e com mecanismos de resistência adquirida fenotipicamente detetáveis. Pela regra, os isolados com valores de CIMs iguais ou inferiores ao ECOFF não apresentam mecanismos de resistência adquirida detetáveis ou suscetibilidade reduzida. Por outro lado, os valores de CIM superiores ao ECOFF compreendem os isolados com mecanismos de resistência adquirida detetáveis ou suscetibilidade reduzida (Schuetz, 2020). Para os halos de inibição é ao contrário, existem mecanismos de resistência adquirida quando o halo de inibição for inferior ao valor de ECOFF (ESCMID, 2022).

Segundo os critérios clínicos, os isolados são classificados como suscetíveis (S), suscetíveis com exposição aumentada (I) (anteriormente denominada resistência intermediária) e resistentes (R). Classifica-se o isolado como suscetível (S) quando o valor do halo de inibição for superior ao valor do critério clínico estabelecido pelo EUCAST e CLSI e quando o valor de CIM for inferior ao mesmo. Quando o valor do halo de inibição for inferior ao valor do critério clínico, o isolado é classificado como resistente (R). Para se obter este fenótipo de resistência o valor de CIM tem de ser superior ao valor estabelecido. Com os critérios clínicos, ainda existe a terminologia suscetível com exposição aumentada (I) que implica que o valor do halo de inibição se encontre entre os valores de suscetibilidade e resistência. Não existe valor de ECOFF para esta classificação (ESCMID, 2022).

Tabela 3.1. Critérios epidemiológicos (ECOFFs) e clínicos utilizados na interpretação dos halos de inibição resultantes do método difusão em agar (DA).

Microrganismo	Critérios utilizados	
	Epidemiológicos (ECOFFs)	Clínicos
<i>Proteus mirabilis</i>	MEM	Critérios para <i>Enterobacteriaceae</i> (CLSI-M100S), com exceção dos antibióticos MAR em que se utilizaram os critérios VET-01 do CLSI
<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i>	ND	Critérios M45-P (CLSI) para <i>Vibrio</i> spp. (excluindo <i>Vibrio cholerae</i> )
<i>Aeromonas sobria</i>	ND	Critérios M45-P (CLSI) para o complexo de <i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ND	Critérios para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CLSI-M100S)
<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus hirae</i>	IMP, TEC ( <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> ) e TGC ( <i>E. faecalis</i> )	Critérios do CLSI para <i>Enterococcus</i> spp. (M100S) para os antibióticos AMP, CIP, TEC, VAN e CHL. Critério para o antibiótico CMN (R $\leq$ 14) retirado de Li et al. (2014)

ND – Não definido. AKN – Amicacina; AMP – Ampicilina; CHL – Cloranfenicol; CIP – Ciprofloxacina; CMN – Clindamicina; IMP – Imipenem; MAR – Marbofloxacina; MEM – Meropenem; TEC – Teicoplanina; TGC – Tigeciclina; TIC – Ticarcilina; VAN – Vancomicina. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

Para controlo de qualidade, utilizaram-se nos ensaios as estirpes de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Os valores dos halos de inibição das estirpes de controle de qualidade tinham de estar dentro de intervalos aceitáveis de acordo com o EUCAST (ESCMID, 2022), para que os resultados do ensaio fossem considerados válidos.

### 3.3.2. Método de microdiluição em caldo (MC)

Para complementar os resultados do método de difusão em agar, foi também determinada a concentração inibitória mínima (CIM), que corresponde à concentração mais baixa de antibiótico que inibe o crescimento bacteriano. Para isso, foram utilizadas microplacas de microdiluição em caldo nutritivo comerciais EUVSEC, EUVSEC2 e EUVENC (Sensititre®, Trek Diagnostic Systems, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante para *Enterococcus* spp. e o protocolo M49-P para bactérias não fastidiosas de ambiente aquático (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005b).

As microplacas de 96 poços, EUVSEC, incluem os seguintes antibióticos: Ampicilina (AMP), Azitromicina (AZI), Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ), Cloranfenicol (CHL), Ciprofloxacina (CIP), Colistina (COL), Gentamicina (GEN), Meropenem (MEM), ácido nalidíxico (NAL), Sulfametoxazole (SMX), Tetraciclina (TET), Tigeciclina (TGC), Trimetoprim (TMP).

As microplacas EUVEC2 permitem testar outros antibióticos, complementando assim a informação retirada da EUVSEC, e determinar os fenótipos presumíveis de ESBL, AmpC e carbapenemase. Inclui a Cefepime (FEP), Cefotaxima (CTX), Cefotaxima/Ácido clavulânico (CTX/C), Cefoxitina (FOX), Ceftazidima (CAZ), Ceftazidima/Ácido clavulânico (CAZ/C), Ertapenem (ETP), Imipenem (IMP), Meropenem (MEM) e Temocilina (TRM).

Para o ensaio dos isolados gram-positivos foi utilizada a microplaca EUVENC que contém antibióticos como a Ampicilina (AMP), Cloranfenicol (CHL), Ciprofloxacina (CIP), Daptomicina (DAP), Eritromicina (ERY), Gentamicina (GEN), Linezolida (LZD), Quinupristina-Dalfopristina (QND), Teicoplanina (TEI), Tetraciclina (TET), Tigeciclina (TGC) e a Vancomicina (VAN).

A suspensão bacteriana foi preparada como descrito em 3.3.1, em ampolas de NaCl a 0,85%, com turbidez padrão de 0,5 na escala de McFarland, lida no densitómetro Densimat (BioMérieux, França). Transferiu-se 50 µL da suspensão para um tubo de caldo Mueller-Hinton com catiões ajustados com TES (Thermo Scientific™). Usando um dispensador automático Sensititre AIM™ (ThermoFisher Scientific), as microplacas EUVSEC, EUVSEC2 e EUVENC foram inoculadas com 50 µL de suspensão bacteriana por poço, seguindo-se a selagem das mesmas com película adesiva.

As placas seladas foram incubadas a 28°C durante 24h-28h e a 37°C por 24 h. Os painéis de antibióticos foram lidos usando um sistema de visualização digital semiautomático de CIMs Sensititre Vizion™ (ThermoFisher Scientific) e o sistema de software Scientific™ Sensititre™ SWIN™ (Thermo Scientific™). Os valores de CIMs foram interpretados segundo os critérios reunidos na Tabela 3.2, dando primazia aos critérios epidemiológicos que estão disponíveis.

Tabela 3.2. Critérios epidemiológicos (ECOFFs) e clínicos utilizados na interpretação dos CIMs resultantes do método de microdiluição em caldo (MC).

Microrganismo	Critérios utilizados	
	Epidemiológicos (ECOFFs)	Clínicos
<i>Proteus mirabilis</i>	AMP, CAZ, CIP, GEN, MEM, TET, TGC	Critérios para <i>Enterobacteriaceae</i> (CLSI-M100S) para os restantes antibióticos das microplacas EUVSEC e EUVSEC2
<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i>	ND	Critérios M45-P (CLSI) para <i>Vibrio</i> spp. (excluindo <i>Vibrio cholerae</i> )
<i>Aeromonas sobria</i>	ND	Critérios M45-P (CLSI) para o complexo de <i>Aeromonas hydrophila</i> . Critério para o antibiótico AMP ( $R \geq 32$ ) retirado de Aravena-Román et al. (2012)
<i>Enterococcus faecium</i>	AMP, CHL, CIP, DAP, ERY, GEN, LNZ, TEC, TET, TGC e VAN	Critérios do CLSI para <i>Enterococcus</i> spp. (M100S) e critérios do EUCAST (v. 11.0) para <i>Enterococcus</i> spp. para os restantes antibióticos da microplaca EUVENC
<i>Enterococcus faecalis</i>		
<i>Enterococcus hirae</i>		

ND – Não definido. AMP – Ampicilina; CAZ – Ceftazidima; CHL – Cloranfenicol; CIP – Ciprofloxacina; GEN – Gentamicina; ERY – Eritromicina; LNZ – Linezolida; MEM – Meropenem; TEC – Teicoplanina; TGC – Tigeciclina; TET – Tetraciclina, VAN - Vancomicina. CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*. EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*.

Com a microplaca EUVSEC2 é também possível classificar fenotipicamente o tipo de  $\beta$ -lactamases, como sendo do tipo ESBL, AmpC e/ou Carbapenemases com base nos critérios da EFSA e EURL-AR (European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control, 2021). As regras da classificação fenotípica em ESBL, AmpC e Carbapenemases estão resumidas na Figura 3.3.

<u>Fenótipo ESBL</u>	<u>Fenótipo AmpC</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- CIM da CTX ou CAZ &gt; 1 mg/L e</li> <li>- CIM do MEM <math>\leq</math> 0,12 mg/L e</li> <li>- CIM da FOX <math>\leq</math> 8 mg/L e</li> <li>- Existência de *sinergia: CTX/C e/ou CAZ/C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CIM da CTX ou CAZ &gt; 1 mg/L e</li> <li>- CIM do MEM <math>\leq</math> 0,12 mg/L e</li> <li>- CIM da FOX &gt; 8 mg/L e</li> <li>- Ausência de *sinergia: CTX/C e/ou CAZ/C (não excluir a presença de ESBL)</li> </ul>
<u>Fenótipo ESBL + AmpC</u>	<u>Fenótipo Carbapenemase</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- CIM da CTX ou CAZ &gt; 1 mg/L e</li> <li>- CIM do MEM <math>\leq</math> 0,12 mg/L e</li> <li>- CIM da FOX &gt; 8 mg/L e</li> <li>- Existência de *sinergia: CTX/C e/ou CAZ/C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CIM do MEM &gt; 0,12 mg/L (não excluir a presença de ESBL e/ou AmpC)</li> </ul>

Figura 3.3. Classificação fenotípica de ESBL, AmpC e Carbapenemases segundo os critérios da EFSA e EURL-AR. CTX - Cefotaxima; CAZ - Ceftazidima; FOX - Cefoxitina; MEM - Meropenem; C - ácido clavulânico; \* sinergia existe quando a diferença entre as CIMs da Cefotaxima e/ou da Ceftazidima e as CIMs das combinações destas com o ácido clavulânico (CTX/C e CAZ/C) é igual ou superior a 3 diluições de base 2. Não existe sinergia quando esta diferença é inferior a 3 diluições de base 2. Adaptado de Ferreira (2022).

Foram utilizadas as estirpes de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 para controle de qualidade dos ensaios.

### 3.4. Extração e quantificação de DNA dos isolados

O processo de extração de DNA dos isolados que apresentaram resistências fenotípicas (n=14) foi realizado com o kit comercial GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific™), seguindo os protocolos para bactérias gram-negativas e gram-positivas, de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação foi feita através do espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific™). A concentração do DNA foi determinada medindo a absorbância a 260 nm (A<sub>260</sub>) e a pureza do DNA foi avaliada através dos raios 260/280 e 260/230, que tiveram de ser superiores a 1,8 e 1,9, respetivamente. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão 1x Tris-Borato-EDTA (TBE), corado com Red Safe (© iNtRON Biotechnology).

Os DNAs que foram selecionados para a sequenciação completa do genoma (WGS), também foram quantificados através Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen) com o equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen), devido à sua maior sensibilidade e precisão.

O DNA extraído foi mantido a -20°C até ao momento da sua utilização.

### 3.5. Identificação dos determinantes de resistência por reação de polimerase em cadeia

#### 3.5.1. Detecção de integrões da classe 1, classe 2 e classe 3

A presença de genes que codificam as integrases foi avaliada através da realização de ensaios de reação de polimerase em cadeia na variante *multiplex* (mPCR). O objetivo era detetar os genes *intI1*, *intI2* e *intI3* em todos os isolados (n=19) e estudar a sua prevalência no ambiente da aquacultura e a sua distribuição entre as classes de integrões.

A mistura de reação num volume de 25 µL incluía: H<sub>2</sub>O estéril, tampão de reação 1x (Nzytech, Portugal), 2,0 mM MgCl<sub>2</sub> (Nzytech), 400 µM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Nzytech), 1U de DNA Polimerase Taq (Nzytech) 0,4 µM de cada *primer forward* e *reverse*, e 2 µL de DNA de cada isolado. Foram utilizando os *primers* descritos por Kargar et al. (2014) e Machado et al. (2005). As reações de *mPCRs* realizaram-se num termociclador Biometra Tone (Analytik Jena), utilizando o programa e as sequências nucleotídicas dos *primers* descritas na Tabela Suplementar 1. Foram usados DNA de estirpes da coleção do Laboratório de Bacteriologia e Micologia do INIAV como controlos positivos, e H<sub>2</sub>O estéril como controlo negativo.

#### 3.5.2. Detecção dos genes de resistência adquirida à colistina

Para a deteção dos genes de resistência à colistina mediados por plasmídeos foram pesquisadas nove variantes do gene *mcr* em todos os isolados (n=19): *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8* e *mcr-9*.

A mistura de reação foi preparada para um volume de 25 µL com: H<sub>2</sub>O estéril, tampão de reação 1x (Nzytech, Portugal), 2,0 mM MgCl<sub>2</sub> (Nzytech), 400 µM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Nzytech), 0,2 µM de cada *primer forward* e *reverse*, 1U de DNA Polimerase Taq (Nzytech) e 2 µL de DNA de cada isolado. As reações de amplificação processaram-se no termociclador Biometra Tone (Analytik Jena), com os *primers* descritos por Rebelo et al. (2018) (*mcr-1-5*) e por Borowiak et al. (2020) (*mcr-6-9*). Informações sobre o programa e as sequências nucleotídicas dos *primers* estão descritas na

Tabela Suplementar 2. Como controlo positivo para as reações de amplificação foi utilizado DNA de isolados disponibilizados pelo Laboratório Comunitário de Referência aos Antibióticos (DTU, National Food Institute, Dinamarca), e como controlo negativo foi utilizada H<sub>2</sub>O estéril.

### 3.5.3. Detecção de genes de resistência adquirida aos $\beta$ -lactâmicos

Para a caracterização molecular dos mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos procedeu-se à pesquisa dos genes através de ensaios de *mPCR*. Os *primers* e condições de amplificação utilizadas para os três ensaios de reação de polimerase em cadeia foram os descritos por Dallenne et al. (2010) e Mammeri et al. (2008), e estão discriminadas na Tabela Suplementar 3. As misturas de reação num volume de 25  $\mu$ L continham H<sub>2</sub>O estéril, tampão de reação 1x (Nzytech), 1,5-2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Nzytech) (2,5 mM no *mPCR* da AmpC), 400  $\mu$ M de dNTPs (Nzytech), 1U de Taq polimerase (NZYTech), e 1-2  $\mu$ L de DNA dos isolados. A concentração dos *primers* variou entre 0,2-0,5  $\mu$ M. As amplificações foram realizadas no termociclador Biometra Tone (Analytik Jena). Como controlo positivo foi utilizado DNA de estirpes da coleção do Laboratório de Bacteriologia e Micologia do INIAV, e como controlo negativo foi utilizada H<sub>2</sub>O estéril.

### 3.5.4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados

Os produtos obtidos nas reações de *PCR* foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5-2,5% de agarose, dependendo do tamanho do fragmento, em 1x tampão TBE. Os géis foram corados com Red Safe (©iNtRON Biotechnology), o marcador de peso molecular utilizado foi o de 100 pb (HyperLadder™ 100bp Bioline) ou 500 pb (NZYDNA Ladder V) (no caso do ensaio de pesquisa do gene *bla*<sub>AmpC</sub>). O volume do DNA aplicado nos poços do gel foi de 8  $\mu$ L por reação. Os produtos de amplificação foram visualizados e fotografados, utilizando o sistema de análise de imagem UV BioDoc (It™ Imaging System, UVP), e o seu tamanho (pb) determinado por comparação com o do controlo positivo e com o marcador de pesos moleculares.

## 3.6. Sequenciação do Genoma Completo (WGS)

A sequenciação de cinco isolados foi feita pelas empresas *CeGaT* (Alemanha) e *Eurofins* (Alemanha) usando o sistema *Illumina* NovaSeq 6000. Foram gerados *reads* de 100 pb e 150 pb, respetivamente.

O controlo de qualidade das sequências e a montagem *de novo* do genoma inteiro foram realizadas no software ARIES (Galaxy, Roma) (Knijn et al., 2020), através dos programas FastQC v0.72, Trimmomatic v0.38.1, SPAdes v3.14.1 e Quast v5.0.2. Foram utilizadas as configurações padrão dos programas, exceto nos programas Trimmomatic e SPAdes. No primeiro, foi escolhido *reads paired-end* e alterado o valor na opção qualidade média necessária para 15, enquanto que no segundo foi utilizado um *cut-off* de 2.0.

A análise dos ficheiros FASTA decorreu neste software e através das ferramentas de bioinformática disponibilizadas pelo Centro de Epidemiologia Genómica (Center for Genomic Epidemiology, 2011). Dentro das ferramentas da CGE, foi possível confirmar a identificação dos isolados, identificar os genes de resistência aos antibióticos adquiridos e as mutações cromossômicas, genes de virulência e confirmar a presença de plasmídeos e elementos genéticos móveis através do *SpeciesFinder* v2.0 e *KmerFinder*

v3.2, *ResFinder* v4.1, *VirulenceFinder* v3.2, *PlasmidFinder* v2.0 e MGE v1.0.3, respectivamente. A tipificação por MLST foi realizada no MLST v2.0, mas não foi possível para todos os isolados, visto os isolados *Enterococcus hirae* e *Proteus mirabilis* não estarem descritos na base de dados. Foram utilizadas as configurações padrão nas ferramentas da CGE, com limites de 60% de cobertura e 90% de identidade no ResFinder e limites de 60% de cobertura e 95% de identidade no PlasmidFinder.

No software ARIES foi também possível fazer a tipificação por MLST através do pubMLST v2.16.1 e a identificação dos genes de resistência a antibióticos através do ABRICATE v1.0 que reúne as seguintes bases de dados: *ResFinder* (CGE, DTU, Dinamarca), ARG-ANNOT (IHU Méditerranée Infection), CARD (McMaster University) e NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) (Knijn et al., 2020).

Os dados brutos das sequências dos cinco isolados sequenciados foram submetidos ao *European Nucleotide Archive* (ENA) com os seguintes números de acesso: ERS14907564, ERS14907565, ERS14907566, ERS14907567 e ERS14907569.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Isolados bacterianos testados para avaliação da resistência antimicrobiana

Os isolados identificados pela equipa de investigação do Laboratório de Bacteriologia e Micologia do INIAV advieram de vários locais de exploração de aquacultura, como mencionado no capítulo anterior. Como é possível observar na Figura 4.1, 63% dos isolados eram provenientes de amostras do estuário do Sado, de uma das três zonas de colheita S1, S2 e D1. O seguinte local de colheita mais representado foi o estuário do Tejo com 21% dos isolados. A representatividade da Ria de Aveiro e do estuário Rio Lima foi de 11% e 5%, respetivamente.

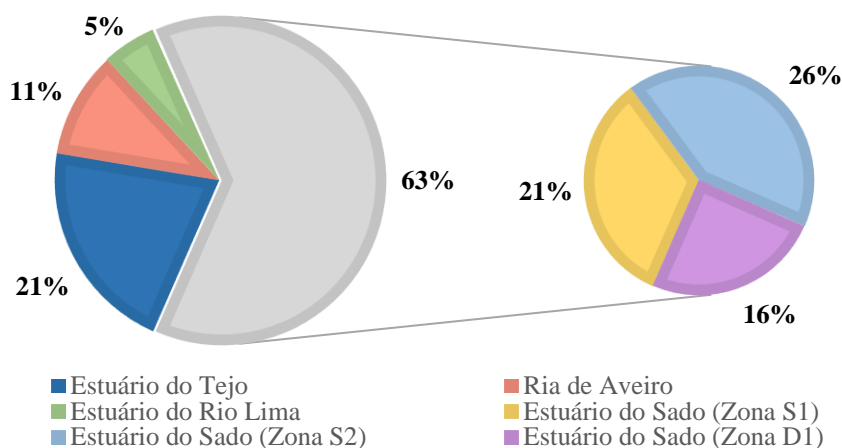


Figura 4.1. Distribuição dos isolados pelos ambientes de aquacultura.

Os isolados testados quanto às resistências antimicrobianas eram provenientes de diferentes tipos de amostras do ambiente de aquacultura, como mostra a Figura 4.2. Foi possível notar que 53% dos isolados tinham sido cultivados a partir de amostras de sedimentos das explorações de aquacultura, enquanto que amostras de miolo de Ostras e Ameijoas Japonesas, e de conteúdo intestinal de Dourada representaram 26%, 16% e 5% dos isolados.

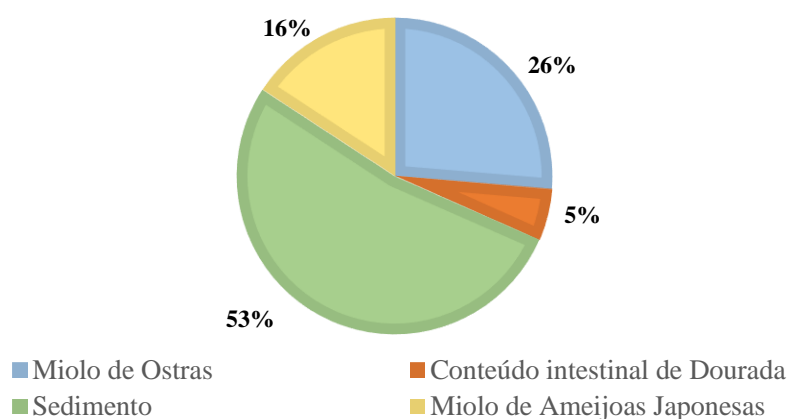


Figura 4.2. Distribuição dos isolados pelo tipo de amostra de origem.

Dos 19 isolados, 73% eram microrganismos gram-negativos pertencentes às espécies *Aeromonas sobria* (n=1), *Proteus mirabilis* (n=1), *Pseudomonas fluorescens* (n=5), *Vibrio alginolyticus* (n=2), *Vibrio parahaemolyticus* (n=2), *Vibrio vulnificus* (n=3). Os cinco isolados gram-positivos pertenciam a espécies de *Enterococcus*, como *Enterococcus faecium* (n=3), *Enterococcus faecalis* (n=1) e *Enterococcus hirae* (n=1).

## 4.2. Caracterização fenotípica das resistências antimicrobianas dos isolados

Foram registadas resistências fenotípicas em 73,7% dos isolados discriminadas na Tabela 4.1. Os isolados 23AQ, 25AQ, 27AQ, 29AQ e 31AQ, não apresentaram resistências fenotípicas.

Tabela 4.1. Resistências fenotípicas de 19 isolados detetadas nos testes de suscetibilidade a antibióticos a partir dos métodos DA (Difusão em agar) e MC (Microdiluição em caldo).

Amostra	Isolado	Resistências registadas através do método DA	Resistências registadas através do método MC
Miolo de Ostra - Estuário do Sado (Zona S1)	1AQ - <i>Enterococcus faecium</i>	AKN <sup>1</sup> , APR <sup>1</sup> , FOX <sup>1</sup> , CTX <sup>1</sup> , CAZ <sup>1</sup> , ETP <sup>1</sup> , IMP <sup>1</sup> , MEM <sup>1</sup> , CIP	SR
Miolo de Ostra - Estuário do Sado (Zona S1)	2AQ - <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AMP <sup>2</sup>	AMP <sup>2</sup>
Sedimento - Estuário do Sado (Zona S1)	10AQ - <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AMP <sup>2, (1)</sup>	AMP <sup>2, (1)</sup>
Sedimento - Estuário do Sado (Zona S1)	11AQ - <i>Vibrio vulnificus</i>	AMP <sup>2</sup> , TIC <sup>2</sup>	AMP <sup>2</sup>
Miolo de Ostra - Estuário do Sado (Zona S2)	3AQ - <i>Enterococcus faecalis</i>	AKN <sup>1</sup> , APR <sup>1</sup> , FOX <sup>1</sup> , CTX <sup>1</sup> , CAZ <sup>1</sup> , CMN <sup>1</sup>	QND <sup>1</sup> , TET
Miolo de Ostra - Estuário do Sado (Zona S2)	4AQ - <i>Enterococcus faecium</i>	AKN <sup>1</sup> , APR <sup>1</sup> , FOX <sup>1</sup> , CTX <sup>1</sup> , CAZ <sup>1</sup> , ETP <sup>1</sup> , IMP <sup>1</sup> , MEM <sup>1</sup> , CIP <sup>(1)</sup>	SR
Miolo de Ostra - Estuário do Sado (Zona S2)	5AQ - <i>Proteus mirabilis</i>	FTN <sup>1</sup> , OT <sup>1</sup> , CIP <sup>(1)</sup>	AZM, CIP, COL <sup>1</sup> , NAL, TMP, TET <sup>1</sup> , CHL <sup>(1)</sup>
Sedimento - Estuário do Sado (Zona S2)	12AQ - <i>Vibrio vulnificus</i>	AMP <sup>2</sup> , TIC <sup>2</sup>	AMP <sup>2</sup>
Sedimento - Estuário do Sado (Zona S2)	13AQ - <i>Vibrio vulnificus</i>	AMP <sup>2</sup> , TIC <sup>2</sup>	AMP <sup>2</sup>
Conteúdo intestinal de Dourada - Estuário do Sado (Zona D1)	6AQ - <i>Aeromonas sobria</i>	SAM <sup>1</sup> , FOX <sup>(1),2</sup>	AMP <sup>1</sup> , FOX <sup>2</sup> , IMP <sup>(1),2</sup>
Sedimento - Estuário do Sado (Zona D1)	8AQ - <i>Vibrio alginolyticus</i>	AMP <sup>2</sup> , TIC <sup>2</sup>	AMP <sup>2</sup>
Sedimento - Estuário do Sado (Zona D1)	9AQ - <i>Vibrio alginolyticus</i>	AMP <sup>2</sup> , TIC <sup>2</sup>	AMP <sup>2</sup>
Miolo de Ameijoja Japonesa - Estuário do Tejo	33AQ - <i>Enterococcus faecium</i>	AKN <sup>1</sup> , APR <sup>1</sup> , FOX <sup>1</sup> , CTX <sup>1</sup> , CAZ <sup>1</sup> , ETP <sup>1</sup> , IMP <sup>1</sup> , MEM <sup>1</sup>	SR
Miolo de Ameijoja Japonesa - Estuário do Tejo	34AQ - <i>Enterococcus hirae</i>	AKN <sup>1</sup> , APR <sup>1</sup> , FOX <sup>1</sup> , CTX <sup>1</sup> , CAZ <sup>1</sup> , ETP <sup>1</sup> , MEM <sup>1</sup> , CMN	QND
Miolo de Ameijoja Japonesa - Estuário do Tejo	31AQ - <i>Pseudomonas fluorescens</i>	SR	NA
Sedimento - Estuário do Tejo	27AQ - <i>Pseudomonas fluorescens</i>	SR	NA
Sedimento - Ria Aveiro	23AQ - <i>Pseudomonas fluorescens</i>	SR	NA
Sedimento - Ria Aveiro	29AQ - <i>Pseudomonas fluorescens</i>	SR	NA
Sedimento - Estuário do Rio Lima	25AQ - <i>Pseudomonas fluorescens</i>	SR	NA

DA – Difusão em Agar. MC – Microdiluição em caldo. NA – Não aplicável. SR – Sem resistências. <sup>1</sup> - Resistência intrínseca à espécie ou género já bem caracterizada (no caso dos isolados de *Enterococcus* spp., também estão incluídos os antibióticos considerados intrinsecamente ineficazes contra este género, segundo o EUCAST, mas que não têm critérios definidos). <sup>2</sup> – Possível resistência intrínseca a ser confirmada. (I) - Suscetibilidade com exposição aumentada. SR – Sem resistências. AKN – Amicacina; AMC - Amoxicilina-ácido clavulânico; AMP – Ampicilina; APR – Apramicina; AZM – Azitromicina; CAZ – Ceftazidima; CHL – Cloranfenicol; CIP – Ciprofloxacina; CMN – Clindamicina; COL – Colistina; CTX – Cefotaxima; ERY – Eritromicina; ETP – Ertapenem; FOX – Cefoxitina; FTN – Nitrofurantoina; IMP – Imipenem; MEM – Meropenem; NAL - Ácido nalidíxico; OT – Oxitetraclina; QND - Quinupristina-Dalfopristina; TET – Tetraciclina; TIC – Ticarcilina; TMP – Trimetoprim.

Foram realizados ensaios a partir de dois métodos diferentes para obter o perfil de resistência mais completo para cada isolado. Foi detetado um baixo número de resistências fenotípicas potencialmente adquiridas, que necessitaram de ser confirmadas, incluindo ácido nalidíxico (NAL), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CHL), clindamicina (CMN), quinupristina/dalfopristina (QND), tetraciclina (TET) e trimetoprim (TMP). Foram igualmente detetadas várias resistências fenotípicas que estão descritas na bibliografia como resistências intrínsecas das espécies ou géneros, com destaque para a ampicilina (AMP) e ticarcilina (TIC), detetadas em 42,1% e 26,3% dos isolados testados, respetivamente.

Os isolados de miolo de ostra do estuário do Sado (zona S2), comparativamente aos isolados de outros tipos de amostras e de explorações, foram os que apresentaram mais resistências fenotípicas potencialmente adquiridas, com destaque para o isolado *Proteus mirabilis* 5AQ que apresentou resistência a pelo menos três classes de antibióticos diferentes, quinolonas, anfenicóis e trimetoprim. Os isolados *Enterococcus faecalis* 3AQ e *Enterococcus faecium* 4AQ apresentaram resistência a um antibiótico da classe das tetraciclinas e fluoroquinolonas, respetivamente.

Dos isolados que advieram de sedimentos de aquacultura, apenas o isolado *Enterococcus hirae* 34AQ se destacou, tendo sido registadas resistências fenotípicas a duas classes de antibióticos diferentes, lincosamidas e estreptograminas.

Para a interpretação dos resultados dos dois métodos é preciso ter em consideração que a sensibilidade e a margem de erro são diferentes. O método DA é qualitativo, sendo os halos de inibição medidos com uma régua, enquanto que o resultado das microplacas é quantitativo, visto que é a determinação da concentração inibitória mínima, e é lida por um software. Através do método MC também foi possível presumir a presença de  $\beta$ -lactamases presentes nos isolados.

Para além disso, a falta de critérios epidemiológicos (ECOFFS) e clínicos disponíveis para a interpretação dos resultados de ambos os métodos também foi algo a ter em consideração desde o início do estudo. Os ECOFFs são utilizados em isolados ambientais para detetar mecanismos de resistência que podem ser, ou não, clinicamente significativos, com o objetivo de monitorizar a emergência da resistência antimicrobiana (Kahlmeter & Turnidge, 2022; Schuetz, 2020). Os critérios clínicos são importantes para prever o sucesso ou insucesso da terapia de um paciente. Os critérios mais adequados para este estudo seriam os ECOFFs, mas nos casos em que os mesmos não estavam disponíveis, utilizaram-se os critérios clínicos na interpretação dos resultados.

Os valores de halo de inibição para os antibióticos Cefalotina, Florfenicol e Sulfametoxazole-Trimetoprim por não terem cumprido os parâmetros de qualidade com as estirpes *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, não foram tidos em consideração nos resultados.

Para a caracterização fenotípica das resistências antimicrobianas, foram analisadas as diferentes espécies a que pertencem os isolados em estudo.

#### **4.2.1. *Proteus mirabilis***

*Proteus mirabilis* faz parte da microbiota do trato intestinal de humanos e animais, sendo também encontrada no solo e água, onde sua presença é considerada resultante de contaminação fecal. É naturalmente resistente à tetraciclina (TET), colistina (COL), nitrofuranos e tigeciclina (TGC) (Girlich et al., 2020).

Para além das resistências intrínsecas, o isolado *Proteus mirabilis* 5AQ apresentou resistências fenotípicas a pelo menos três classes de antibióticos, quinolonas, trimetoprim e anfenicóis. Os resultados

destes antibióticos que produziram fenótipos de resistência adquirida e de outros de interesse estão discriminados na Tabela 4.2. Os restantes resultados estão discriminados na Tabela Suplementar 4.

Tabela 4.2. Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) do isolado *Proteus mirabilis* 5AQ para os antibióticos azitromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, ácido nalidíxico e trimetoprim resultantes dos testes de suscetibilidade realizados a 28°C.

Antibiótico	<i>P. mirabilis</i> (n=1)		
	ECOFFs	Crítérios clínicos	5AQ
<b>AZM</b>			
Halo de inibição	ND	ND	16
CIM	ND	R $\geq$ 32, S $\leq$ 16	<b>64</b>
<b>CHL</b>			
Halo de inibição	ND	R $\leq$ 12, S $\geq$ 18	<b>30</b>
CIM	ND	R $\geq$ 32, S $\leq$ 8	<b>16</b>
<b>CIP</b>			
Halo de inibição	ND	R $\leq$ 21, S $\geq$ 26	<b>24</b>
CIM	R $>$ 0,064, S $\leq$ 0,064	NA	<b>4</b>
<b>NAL</b>			
CIM	ND	R $\geq$ 32, S $\leq$ 16	<b>&gt;128</b>
<b>TMP</b>			
CIM	ND	R $\geq$ 16, S $\leq$ 8	<b>&gt;32</b>

ND – Não definido. NA – Não aplicável. ECOFFs – Critérios epidemiológicos. AZM - Azitromicina. CHL – Cloranfenicol. CIP – Ciprofloxacina. GEN – Gentamicina. NAL – Ácido nalidíxico. TMP - Trimetoprim. A vermelho estão destacados os valores de halo de inibição e CIM que indicam que existe uma suscetibilidade reduzida ao antibiótico, a laranja os que produzem um fenótipo de suscetibilidade com exposição aumentada (I) e a verde os valores que indicam suscetibilidade ao antibiótico. A preto estão representados os valores cujo fenótipo não é possível caracterizar pela falta de critérios disponíveis.

No método DA foram registados halos de inibição que codificaram para a suscetibilidade com exposição aumentada (I) à ciprofloxacina (CIP). No método MC, foram registados valores de CIM que codificam para a resistência à azitromicina (AZM), ciprofloxacina (CIP), ácido nalidíxico (NAL) e trimetoprim (TMP), e para a suscetibilidade com exposição aumentada (I) ao cloranfenicol (CHL). O isolado 5AQ não apresentou fenótipo presumível ESBL, AmpC nem carbapenemase.

No caso da ciprofloxacina (CIP), uma fluoroquinolona, apesar de ter sido registado um fenótipo de suscetibilidade com exposição aumentada (I) no método DA, existe uma grande probabilidade de haver um mecanismo de resistência adquirida presente neste isolado, visto que o valor do CIM foi superior ao ECOFF. A mesma ilação não pode feita para o ácido nalidíxico (NAL), outro antibiótico da classe das quinolonas. Como não estava disponível nenhum valor de ECOFF para este antibiótico, não é possível prever a presença de um determinante de resistência, apenas a existência de uma resistência.

A diminuição da suscetibilidade às quinolonas e fluoroquinolonas em *Enterobacterales* pode ser causada por mutações nos genes que codificam para a DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) ou topoisomerase IV (*parC* e *parE*), e pela presença de genes de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos (PMQR). Os genes PMQR incluem genes *qnr*, que codificam as proteínas Qnr que protegem a DNA girase e a topoisomerase IV das quinolonas, o gene *aac(6')-Ib-cr*, que codifica para uma aminoglicosídeo acetiltransferase, e os genes *qepA* e *oqxA* que codificam bombas de efluxo ativas pertencentes às superfamílias de proteínas de transporte MFS e RND, respetivamente (Girlich et al., 2020; Minarini & Darini, 2012; Miranda et al., 2022). Estudos mostram que bactérias da ordem *Enterobacterales* podem apresentar vários níveis de resistência às quinolonas e fluoroquinolonas (Jacoby, 2005; Miranda et al., 2022). Está descrito que a acumulação de duas ou mais mutações, ou a presença de mais do que um

determinante de resistência, provoca um fenótipo de alta resistência (Nakano et al., 2019), enquanto que os determinantes de PMQR fornecem apenas resistência de baixo nível às quinolonas (Jacoby, 2005; Wang et al., 2009). A presença de genes PMQR em isolados de *Proteus* spp. de ambiente clínico na Europa já foi bastante documentada (Guillard et al., 2014; Kotb et al., 2019; Mazzariol et al., 2012; Miranda et al., 2022), mas ainda pouco se sabe sobre a prevalência desses genes em ambientes aquáticos.

Em relação ao antibiótico cloranfenicol (CHL), foi registrado um halo de inibição que produz um fenótipo de suscetibilidade, e um CIM que sugere um fenótipo de suscetibilidade com exposição aumentada (I). Como não existe um valor de ECOFF definido para o antibiótico cloranfenicol nesta espécie, não é claro se existe um determinante de resistência adquirida no isolado 5AQ. Segundo a bibliografia, existe a enzima cloranfenicol acetiltransferase (CAT) que está presente em muitos gêneros de bactérias e que confere resistência a este antibiótico da classe dos anfenicóis. O gene cromossômico *cat* já foi registrado em isolados de *P. mirabilis* em pelo menos dois estudos (Charles, Harford, et al., 1985; Charles, Keyte, et al., 1985; Schwarz et al., 2004), tendo sido igualmente identificado inseridos em plasmídeos (Schwarz et al., 2004). Existem elementos genéticos móveis que podem transportar outros genes de resistência a este antibiótico, como o gene *floR* (Bie et al., 2017; He et al., 2021; X. Li et al., 2016). São frequentemente reportados genes de resistência a antibióticos associados a elementos genéticos móveis em *Proteus* spp., como plasmídeos, integrões, sequências de inserção e ICEs (Girlich et al., 2020). Já foram descritos elementos ICE da família SXT/R391, que possuem uma forte capacidade de transmissão entre diferentes espécies bacterianas, com genes que codificavam para a resistência a sulfametoxazole (*sul2*), trimetoprim (*dfrA*), cloranfenicol (*floR*) e estreptomicina (*strA/B*) (Bie et al., 2017; He et al., 2021; X. Li et al., 2016).

A resistência ao trimetoprim (TMP) é causada por modificações na enzima alvo dihidrofolato redutase, codificada pelos genes *dfr* que são transmitidos por elementos genéticos móveis (Brolund et al., 2010; X.-X. Zhang et al., 2009). O gene *dfrA* é o mais comumente descrito em isolados ambientais, principalmente *dfrA1*, por ser um dos genes de resistência que está localizado na região conservada do integrão de classe 2 (Ahmed et al., 2006; Kaushik et al., 2018; Lu et al., 2022; Xu et al., 2011; X.-X. Zhang et al., 2009). Como já foi discutido, também existem elementos ICE da família SXT/R391 que contem um gene de resistência ao trimetoprim (Bie et al., 2017; He et al., 2021; X. Li et al., 2016).

A resistência a macrólidos ainda não está totalmente descodificada em *Proteus mirabilis* mas a maioria das bactérias gram-negativas são consideradas intrinsecamente resistentes aos macrólidos, por possuírem uma membrana externa altamente impermeável a substâncias hidrofóbicas e sistemas de bomba de efluxo muito eficientes (Meerwein et al., 2020; Stock, 2003).

#### 4.2.2. *Aeromonas sobria*

*Aeromonas* spp. são bactérias gram-negativas, cujas espécies móveis *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas bestiarum* e *Aeromonas caviae* são consideradas patógenos facultativos que afetam principalmente peixes doentes (Igbinsosa et al., 2017; Kadlec et al., 2011; Patil et al., 2016). Estas espécies estão amplamente distribuídas pelos ambientes aquáticos, podendo também ser isolados de alimentos (Nguyen et al., 2014).

Na Tabela 4.3 estão discriminados os antibióticos com que o isolado *A. sobria* 6AQ produziu fenótipos de resistência e suscetibilidade com exposição aumentada (I). Os restantes resultados estão discriminados na Tabela Suplementar 5.

O isolado 6AQ registou resistências à ampicilina (sozinha e combinada com o sulbactam), o que está de acordo com a bibliografia visto tratar-se de uma resistência intrínseca (Ghenghesh et al., 2013; Odeyemi & Ahmad, 2017; Silva et al., 2023).

Tal como aconteceu com o isolado de *P. mirabilis*, a ausência de ECOFFS disponíveis impediu que fosse possível prever a presença de mecanismos de resistência adquirida neste isolado.

Para o antibiótico  $\beta$ -lactâmico cefoxitina (FOX), no método DA foi registado um fenótipo suscetibilidade com exposição aumentada (I), enquanto que o fenótipo obtido no método MC foi de resistência. O único antibiótico da classe dos carbapenemes em que o isolado 6AQ demonstrou suscetibilidade reduzida foi o imipenem (IMP) no método MC.

Tabela 4.3. Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) do isolado *Aeromonas sobria* 6AQ para os antibióticos cefoxitina, imipenem, ampicilina e ampicilina-sulbactam resultantes dos testes de suscetibilidade realizados a 28°C.

Antibiótico	<i>A. sobria</i> (n=1)		
	ECOFFs	Crítérios clínicos	6AQ
<b>FOX</b>			
Halo de inibição	ND	R $\leq$ 14, S $\geq$ 18	16
CIM	ND	R $\geq$ 32, S $\leq$ 8	64
<b>IMP</b>			
Halo de inibição	ND	R $\leq$ 13, S $\geq$ 16	32
CIM	ND	R $\geq$ 16, S $\leq$ 4	8
<b>AMP</b>			
CIM	ND	R $\geq$ 32, S $\leq$ 8	32
<b>SAM</b>			
Halo de inibição	ND	R $\leq$ 11, S $\geq$ 15	6

ND – Não definido. ECOFFs – Critérios epidemiológicos. AMP – Ampicilina; FOX – Cefoxitina; IMP – Imipenem; SAM - Ampicilina-Sulbactam. A vermelho estão destacados os valores de halo de inibição e CIM que indicam que existe uma suscetibilidade reduzida ao antibiótico, a laranja os que produzem um fenótipo de suscetibilidade com exposição aumentada (I) e a verde os valores que indicam suscetibilidade ao antibiótico. A preto estão representados os valores cujo fenótipo não é possível caracterizar pela falta de critérios disponíveis.

Já foi descrito na bibliografia que as espécies de *Aeromonas* spp. (com exceção de *A. caviae*) para além de possuírem uma penicilinase (Classe D), possuem uma cefalosporinase (Classe C), e uma metalo- $\beta$ -lactamase (Classe B) que são intrínsecas (Bertran et al., 2021; P.-L. Chen et al., 2012; Poole et al., 2023; Rosso et al., 2019; Rossolini et al., 1996; Walsh, 1997).

Foi também descrito que na presença dos indutores adequados (cefoxitina ou imipenem) pode haver produção de uma  $\beta$ -lactamase induzível (Abd El-Ghany, 2023; P.-L. Chen et al., 2012) e que uma única mutação pode resultar na inibição coordenada do repressor das três  $\beta$ -lactamases cromossomicamente mediadas, aumentando significativamente a expressão de  $\beta$ -lactamases (Walsh, 1997). A regulação única da expressão destas enzimas pode ser a resposta aos fenótipos obtidos para os antibióticos cefoxitina e imipenem.

Outra possível justificação para os resultados do isolado 6AQ é o facto do género *Aeromonas*, tal como *Vibrio*, por pertencer ao ambiente aquático, possuir muitas vezes genes que codificam  $\beta$ -lactamases que conferem resistência aos  $\beta$ -lactâmicos de espectro estreito (Govender et al., 2021). O isolado 6AQ não

apresentou fenótipo presumível ESBL, nem AmpC, mas pode ser produtor de carbapenemases por ter um valor de CIM > 0,12 mg/L no antibiótico Meropenem (MEM).

#### 4.2.3. *Vibrio* spp.

As espécies do género *Vibrio* estão globalmente distribuída em ambientes marinhos e estuarinos (Jeamsripong et al., 2020; Scarano et al., 2014), e são descritas como os agente patogénicos que mais afetam a aquacultura no Mar Mediterrâneo (Scarano et al., 2014).

Os isolados de *Vibrio alginolyticus* (n=2) e *Vibrio vulnificus* (n=3) obtiveram resultados muito similares nos antibióticos apresentados na Tabela 4.4. Ambos apresentaram resistência a ampicilina (AMP) nos métodos DA e MC e registaram halos de inibição ≤ 12 mm no antibiótico ticarcilina (TIC), uma carboxipenicilina. Infelizmente não existem valores de ECOFFs nem de critérios clínicos para o antibiótico TIC, não tendo sido possível fazer nenhuma interpretação direta do fenótipo produzido nos isolados de *Vibrio* spp.

Tabela 4.4. Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) dos isolados 2AQ, 10AQ, 8AQ, 9AQ, 11AQ, 12AQ, 13AQ para os antibióticos ampicilina e ampicilina-sulbactam e ticarcilina resultantes dos testes de suscetibilidade realizados a 28°C.

Antibiótico	ECOFFs	Critérios clínicos	<i>V. parahaemolyticus</i> (n=2)		<i>V. alginolyticus</i> (n=2)		<i>V. vulnificus</i> (n=3)		
			2AQ	10AQ	8AQ	9AQ	11AQ	12AQ	13AQ
<b>AMP</b>									
Halo de inibição	ND	R≤13, S≥17	14	15	9	11	11	13	12
CIM	ND	R≥32, S≤8	32	16	>64	>64	>64	64	>64
<b>SAM</b>									
Halo de inibição	ND	R≤11, S≥15	24	27	22	24	20	22	22
<b>TIC</b>									
Halo de inibição	ND	ND	32	19	12	12	12	6	10

ND – Não definido. ECOFFs – Critérios epidemiológicos. AMP – Ampicilina; SAM - Ampicilina-Sulbactam; TIC – Ticarcilina. A vermelho estão destacados os valores de halo de inibição e CIM que indicam que existe uma suscetibilidade reduzida ao antibiótico, a laranja os que produzem um fenótipo de suscetibilidade com exposição aumentada (I) e a verde os valores que indicam suscetibilidade ao antibiótico. A preto estão representados os valores cujo fenótipo não é possível caracterizar pela falta de critérios disponíveis.

Os isolados de *Vibrio parahaemolyticus* (n=2) registaram uma ligeira diferença nos valores da ampicilina (AMP) relativamente às outras duas espécies. O isolado *V. parahaemolyticus* 2AQ apresentou um fenótipo de suscetibilidade com exposição aumentada (I) no método DA e resistência no método MC, enquanto que no isolado *V. parahaemolyticus* 10AQ se registou um fenótipo de suscetibilidade com exposição aumentada (I) em ambos os métodos. Também estão discriminados na tabela 3.4. os valores do antibiótico Ampicilina-Sulbactam (SAM) obtidos para mostrar que o fenótipo de resistência muda drasticamente nos sete isolados quando a ampicilina é utilizada em sinergia com o Sulbactam, um inibidor de β-lactamases.

Este perfil de resistência a penicilinas pode ser explicado por um mecanismo descoberto recentemente em *Vibrio parahaemolyticus*. Percebeu-se que este microrganismo deteta penicilinas através de um sistema de dois componentes chamado VbrK/VbrR (L. Li et al., 2016) e expressa uma  $\beta$ -lactamase hidrolisadora de carbenicilina de classe A da família CARB-17 que é codificada cromossomicamente (L.-H. Lee et al., 2018; P. Li et al., 2020). Os estudos que têm sido realizados apontam esta resistência como intrínseca no género *Vibrio*, tendo sido identificada a histidina quinase VbrK (receptor  $\beta$ -lactâmico) e o gene que codifica a  $\beta$ -lactamase em mais espécies de *Vibrio* spp. (L. Li et al., 2016).

Um estudo realizado em estirpes de *Vibrio fluvialis*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio metschnikovii*, isoladas de explorações de aquacultura italiana, registou resultados que estão de acordo com os obtidos neste estudo, pois registaram resistência à ampicilina e resistência à carbenicilina, um antibiótico da mesma classe da ticarcilina, carboxipenicilinas (Laganà et al., 2011). Elhadi et al. (2022) testou estirpes de *V. parahaemolyticus* isoladas de águas da costa da Arabia Saudita e registou fenótipos de suscetibilidade com exposição aumentada (I) à ampicilina e ticarcilina em 80% dos isolados.

Em relação ao tipo de  $\beta$ -lactamases, nenhum isolado de *Vibrio* spp. (n=7) demonstrou um fenótipo presumível ESBL, nem AmpC, nem carbapenemase.

Os resultados não apresentados na Tabela 4.4 estão discriminados na Tabela Suplementar 6.

#### **4.2.4. *Pseudomonas fluorescens***

Em relação aos isolados identificados como *Pseudomonas fluorescens* (n=5), estes não apresentaram nenhuma resistência, contrariamente ao que seria de esperar visto que, de acordo com o EUCAST, esta espécie possui as mesmas resistências intrínsecas de *Pseudomonas aeruginosa* (Silverio et al., 2022). Está descrita nesta espécie uma AmpC cromossômica induzível (Girlich et al., 2010), que é apenas expressa quando a bactéria sofre pressão seletiva, que parece não ter sido o caso em nenhum dos isolados.

Os resultados completos dos testes de suscetibilidade a antibióticos de cada isolado de *P. fluorescens* (n=5) estão discriminados na Tabela Suplementar 7.

#### **4.2.5. *Enterococcus* spp.**

Nos isolados de *Enterococcus faecium* (n=3), *Enterococcus faecalis* (n=1) e *Enterococcus hirae* (n=1) os testes de suscetibilidade a antibióticos foram feitos a duas temperaturas diferentes, 28°C e 37°C. Os resultados mais relevantes estão discriminados na Tabela 4.5. Os resultados dos restantes antibióticos reunidos na Tabela Suplementar 8.

As espécies *E. faecium* e *E. faecalis* apresentam resistência intrínseca a antibióticos de várias classes diferentes, incluindo  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, estreptograminas A (apenas descrita em *E. faecalis*), sulfonamidas (e a combinação trimetoprim/sulfametoxazole) e ácido fusídico (Hollenbeck & Rice, 2012; Kateete et al., 2019; Marinho et al., 2016). *E. faecalis* também apresenta resistência intrínseca à clindamicina (Isnard et al., 2013; Sirichoat et al., 2020).

Não foi possível determinar o tipo de  $\beta$ -lactamases produzidas nos isolados de *Enterococcus* spp. (n=5) porque a microplaca utilizada (EUVENC) não testava antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

Tabela 4.5. Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) dos isolados 1AQ, 3AQ, 4AQ, 33AQ, 34AQ, para os antibióticos ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, quinupristina/dalfopristina, tetraciclina, oxitetraciclina, clindamicina, amicacina, apramicina e azitromicina resultantes dos testes de suscetibilidade realizados a 28°C e 37°C.

Antibióticos	<i>E. faecium</i> (n=3)								<i>E. faecalis</i> (n=1)				<i>E. hirae</i> (n=1)			
	ECOFFs	Critérios clínicos	1AQ		4AQ		33AQ		ECOFFs	Critérios clínicos	3AQ		ECOFFs	Critérios clínicos	34AQ	
			28 °C	37 °C	28 °C	37 °C	28 °C	37 °C			28 °C	37 °C			28 °C	37 °C
<b>AMP</b>																
Halo de inibição	ND	R≤16, S≥17	23	28	24	28	26	25	ND	R≤16, S≥17	34	28	ND	R≤16, S≥17	28	28
CIM	R>8, S≤8	NA	2	1	2	8	2	1	R>4, S≤4	NA	1	1	ND	R≥16, S≤8	2	1
<b>CIP</b>																
Halo de inibição	ND	R≤15, S≥21	12	22	16	19	23	21	ND	R≤15, S≥21	24	25	ND	R≤15, S≥21	27	28
CIM	R>8, S≤8	NA	8	2	8	4	2	2	R>4, S≤4	NA	1	1	ND	R≥4, S≤1	0,5	0,5
<b>ERY</b>																
CIM	R>4, S≤4	NA	4	2	4	4	4	2	R>4, S≤4	NA	≤1	≤1	R>1, S≤1	NA	≤1	≤1
<b>QND</b>																
CIM	ND	R≥4, S≤1	1	1	≤0,5	1	≤0,5	≤0,5	ND	R≥4, S≤1	8	8	ND	R≥4, S≤1	4	4
<b>TET</b>																
CIM	R>4, S≤4	NA	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	R>4, S≤4	NA	128	128	R>4, S≤4	NA	≤1	≤1
<b>OT</b>																
Halo de inibição	ND	ND	36	32	40	29	38	30	ND	ND	6	6	ND	ND	34	29
<b>CMN</b>																
Halo de inibição	ND	R≤14	33	33	32	12	35	30	ND	R≤14	9	9	ND	R≤14	10	12
<b>AKN</b>																
Halo de inibição	ND	ND	13	14	13	13	11	12	ND	ND	6	8	ND	ND	8	10
<b>APR</b>																
Halo de inibição	ND	ND	10	12	11	11	8	8	ND	ND	7	6	ND	ND	9	9
<b>AZM</b>																
Halo de inibição	ND	ND	14	13	14	13	14	13	ND	ND	26	27	ND	ND	28	27

ND – Não definido. NA – Não aplicável. ECOFFs – Critérios epidemiológicos. AKN – Amicacina; AMP – Ampicilina; APR – Apramicina; AZM – Azitromicina; CAZ – Ceftazidima; CIP – Ciprofloxacina; CMN – Clindamicina; CTX – Cefotaxima; ERY – Eritromicina; ETP – Ertapenem; IMP – Imipenem; MEM – Meropenem; OT – Oxitetraciclina; QND - Quinupristina-Dalfopristina; TET – Tetraciclina. A vermelho estão destacados os valores de halo de inibição e CIM que indicam que existe uma suscetibilidade reduzida ao antibiótico, a laranja os que produzem um fenótipo de suscetibilidade com exposição aumentada (I) e a verde os valores que indicam suscetibilidade ao antibiótico. A preto estão representados os valores cujo fenótipo não é possível caracterizar pela falta de critérios disponíveis.

A resistência à ampicilina (AMP) em *E. faecalis* é rara, mas em *E. faecium* é comum, sendo umas das resistências mais documentadas, principalmente em ambiente hospitalar. Por essa razão, um resultado que chamou à atenção nos isolados de *E. faecium* (n=3) foi a suscetibilidade total à ampicilina por parte dos três isolados. A resistência a este antibiótico pode ser atribuída à expressão de proteínas de ligação à penicilina PBP5. Uma variação da sequência de PBP5 é suficiente para distinguir dois grupos de *E. faecium*, um que possui altos nível de resistência à ampicilina (denominado Pbp5-R) com valores de CIM de 16 mg/L ou superior, associado ao ambiente hospitalar, e uma variante associada à comunidade (Pbp5-S) que resulta em valores de CIM inferiores a 2 mg/L. Também existe um terceiro tipo de padrão de PBP5 (PBP5-S/R), descrito como um PBP5 “híbrido” que origina valores de CIM de 4 mg/L (W. R. Miller et al., 2014; Pietta et al., 2014; Sifaoui et al., 2001). Foram analisadas sequências de *pbp5* de isolados de *E. faecium* com diferentes níveis de suscetibilidade a este antibiótico e verificou-se que a variabilidade das sequências de PBP5 se deve principalmente a alterações em posições específicas da proteína, sugerindo que a acumulação de mutações pode ter contribuído para a resistência (Gagetti et al., 2019). É provável que existam outros fatores, como regulação, expressão e modificações translacionais do gene *pbp5* ou outros genes que podem interferir nos valores de CIM dos isolados de *E. faecium* (Gião et al., 2022).

No método DA realizado a 28°C, temperatura do ambiente aquático, para além dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, os isolados *E. faecium* 1AQ e 4AQ apresentaram resistência e suscetibilidade com exposição aumentada (I), respetivamente, ao antibiótico ciprofloxacina (CIP). No método MC, ambos os isolados registaram valores de CIM iguais ao valor do ECOFF para este antibiótico. A 37°C, o isolado 4AQ manteve o fenótipo de suscetibilidade com exposição aumentada (I) à ciprofloxacina, enquanto que 1AQ registou uma alteração de fenótipo para a suscetibilidade no método DA. Ambos os isolados apresentaram uma redução do valor de CIM nesta temperatura. Os isolados de *E. faecalis* e *E. hirae* mostraram-se suscetíveis a este antibiótico.

Os fenótipos obtidos no método DA podem ser justificados por uma possível resistência de baixo nível, que pode ser motivada apenas por mutações em *parC*, o alvo primário das fluoroquinolonas nas bactérias gram-positivas, ou pela presença de genes *qnr* ou pela atividade das bombas de efluxo (García-Solache & Rice, 2019; Geraldles et al., 2022). Por outro lado, os valores de CIM terem sido iguais ao valor do ECOFF sugere que os isolados 1AQ e 4AQ não apresentem, teoricamente, mecanismos de resistência adquirida detetáveis. Com os resultados obtidos, existe a necessidade de efetuar uma pesquisa de determinantes de resistência e assim aferir a presença de uma resistência adquirida à ciprofloxacina, antibiótico pertencente a umas das classes de antibióticos mais vendida em Portugal para uso em animais produtores de alimentos (incluindo peixes) entre 2019 e 2020 (European Medicines Agency, 2021). Esta necessidade também é justificada pelo facto de já terem sido reportados casos de isolados de *Enterococcus* spp. com valores de CIM iguais ao valor do ECOFF, em que foram identificados genes de resistência a antibióticos (Cai et al., 2019; Gião Santana Oliveira e Silva, 2021)

O isolado *E. faecalis* 3AQ foi o primeiro isolado do estudo a registar uma possível resistência adquirida a um antibiótico da classe das tetraciclinas (possivelmente dois antibióticos desta classe visto que foi registado um halo de inibição de 6 mm à oxitetraciclina). A oxitetraciclina (OT) é autorizada em aquacultura em Portugal, sendo que já se previa que pudessem ser encontrados isolados com resistência a este antibiótico e análogos. Foi considerado que se podia tratar de uma resistência adquirida pelo valor do CIM ter sido superior ao ECOFF da tetraciclina (TET). Em *Enterococcus* spp., a resistência às tetraciclinas geralmente ocorre por meio de proteção do alvo, mediada pelos genes *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(T)* e *tet(W)*, ou por efluxo de antibióticos através de bombas de efluxo codificadas por *tet(K)* e *tet(L)* (Choi & Woo, 2015).

Mussa et al. (2022) realizaram um estudo em estirpes de *Enterococcus* spp. isoladas de animais aquáticos em Portugal e mostraram que o gene de resistência à tetraciclina mais prevalente em isolados de *E. faecalis* foi o *tet(M)*, seguido do gene *tet(L)* e da combinação de dois genes de resistência. Isto significa que a resistência a este antibiótico pode ser ribossomal, por efluxo ou uma combinação de ambos os tipos. Neste estudo também foi investigada a relação entre os genes de resistência e a presença de elementos genéticos móveis nos isolados, tendo sido identificados transposões Tn916 e/ou Tn5397 altamente associados ao gene *tet(M)* sozinho e combinado com *tet(L)*. Isto foi importante para perceber que existe possibilidade de transmissão dos determinantes de resistência para o ambiente aquático e para outras bactérias.

Di Cesare et al. (2013) detetaram que o perfil de genes de resistência mudou quando os isolados de *Enterococcus* spp. do mar adriático foram incubados na presença de tetraciclina. Houve o aparecimento do gene *tet(O)* e perda de *tet(L)*, enquanto que *tet(M)* foi detetado nas duas condições. Os genes *tet(O)* e *tet(M)* são genes de proteção ribossomal que conferem um alto nível de resistência, enquanto que *tet(L)* é caracterizado por um baixo nível de resistência por codificar o efluxo dos antibióticos desta classe. Os dados presentes indicaram uma possível contribuição do uso autorizado de antibióticos desta classe na aquacultura para a seleção de determinantes genéticos que conferem um alto nível de resistência. A longo prazo pode haver consequências drásticas porque as tetraciclinas persistem por mais tempo no ambiente ao contrário de outros antibióticos como as penicilinas (Marinho et al., 2016).

Foram registadas resistências à clindamicina (CMN) e quinupristina/dalfopristina (QND) no isolado 3AQ, que segundo a bibliografia se tratam de resistências intrínsecas da espécie (Gião Santana Oliveira e Silva, 2021).

O facto de ainda pouco se saber sobre as resistências intrínsecas da espécie *E. hirae*, tendo sido apenas documentada a resistência aos aminoglicosídeos (del Campo et al., 2005), e a falta de critérios dificultaram a interpretação dos resultados do isolado *E. hirae* 34AQ. Foi registada a resistência à quinupristina/dalfopristina (QND) e clindamicina (CMN), e possíveis fenótipos de suscetibilidade reduzida a cefalosporinas, carbapenemes (com exceção do imipenem). É provável que esta espécie partilhe características com as restantes do género, incluindo as resistências intrínsecas. Alguns mecanismos que podem explicar a resistência à clindamicina e quinupristina/dalfopristina estão relacionados com a expressão de bombas de efluxo através de genes como *msrA*, *msrC*, *msrD*, *lsaA*, *vgaB*, *mefA*, possíveis modificações dos alvos por metilases do gene rRNA codificadas por *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(F)* e *erm(T)* e enzimas inativadoras como liases (gene *vgbA*) ou transferases (genes *InuB*, *vatB*, *vatD*, *vatE*) (Roberts et al., 1999).

Fazer os testes de suscetibilidade a 28°C e a 37°C tinha como objetivo perceber como é que a temperatura influenciava os resultados fenotípicos dos isolados que não estavam incluídos no protocolo destinado ao ambiente aquático. Como a amostragem é pequena (n=5) e não foram feitas réplicas dos testes, apenas nos permitiu abrir um caminho para que no futuro se façam mais estudos para assim aumentar o rigor nos testes de suscetibilidade a antibióticos de isolados aquáticos.

Na Tabela 4.5 é possível ver que os valores registados variaram consoante a temperatura, principalmente no método DA, mas que em geral não existiram grandes alterações nos fenótipos, tendo sido apenas registada uma mudança de fenótipo no isolado 1AQ no antibiótico ciprofloxacina e no isolado 4AQ na clindamicina, ambos detetados no método DA. Como foi realizada a sequenciação do genoma completo

nestes dois isolados, a procura por genes que codifiquem as resistências foi feita e os resultados foram discriminados mais abaixo.

### **4.3. Identificação de determinantes de resistência por PCR**

#### **4.3.1. Detecção de integrões de classe 1, classe 2 e classe 3**

Foi detetada por um ensaio de reação de polimerase em cadeia na variante *multiplex* (mPCR) a integrase de integrões de classe 1 ou classe 2 em 10,5% dos isolados, com a mesma prevalência, através da amplificação dos genes *intI1* e *intI2*, respetivamente. O integrão de classe 1 pertencia ao isolado *E. hirae* 34AQ e o integrão de classe 2 ao *P. mirabilis* 5AQ. Todos os restantes isolados foram negativos à presença de integrões.

Os integrões de classe 1 são descritos como os mais comuns no ambiente, tendo já sido reportados em aquacultura, tanto em bactérias patogénicas de animais aquáticos como no próprio ambiente (Lin et al., 2016; Muziasari et al., 2014; Ndi & Barton, 2011). Apesar da maioria dos estudos demonstrarem que existe uma alta prevalência de integrões desta classe associados a microrganismos gram-negativos, já foram identificados em bactérias gram-positivas, incluindo *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, entre outros (Deng et al., 2015). Por poder estar associado a uma gama variada de hospedeiros, os integrões de classe 1 (e as suas respetivas cassetes de genes) são considerados alvos importantes para estudar a disseminação de determinantes de resistência na aquacultura (Preena et al., 2020). Os integrões de classe 2 partilham uma estrutura comum com os integrões de classe 1 na região 5', mas possuem um gene de integrase distinto (*intI2*) (Rodriguez et al., 2006). Estes integrões ocorrem com menos frequência na natureza (Lin et al., 2016; Shah et al., 2014) e têm uma baixa diversidade de cassetes de genes, comparativamente aos integrões de classe 1.

Não foram observados integrões da classe 3, o que está de acordo com vários estudos que referem ser a classe menos frequente (Kargar et al., 2014), tendo apenas sido reportada em algumas espécies e em alguns países. Em Portugal, foi identificada em *Klebsiella pneumoniae* (Deng et al., 2015; Jones-Dias, Manageiro, et al., 2016).

A abundância relativa de integrões no ambiente geralmente aumenta com a exposição de antibióticos em excesso e outros stresses ambientais (Preena et al., 2020). A baixa deteção destes EGMs pode ser um indicativo das boas práticas usadas nas explorações, mas o tamanho reduzido da amostragem não foi suficiente para generalizar este indicador.

#### **4.3.2. Detecção de genes de resistência adquirida à colistina**

Não foram detetados genes *mcr* em nenhum dos isolados (n=19). Esta pesquisa foi crucial porque acredita-se que a aquacultura é um dos principais reservatórios de genes de resistência à colistina mediados por plasmídeos, principalmente *mcr-1* (Cherak et al., 2021; Hassan et al., 2020; Shen et al., 2019, 2020). A colistina é um antibiótico criticamente importante para a medicina humana segundo a lista CIA e da altamente importante para a medicina veterinária pela lista VCIA, sendo eficaz no controle de infeções por bactérias gram-negativas resistentes a carbapenemes (Hassan et al., 2020).

### 4.3.3. Detecção de genes de resistência adquirida aos β-lactâmicos

Para a caracterização molecular dos mecanismos de resistência aos β-lactâmicos procedeu-se à pesquisa dos genes através de ensaios de mPCR nos isolados de *Aeromonas sobria* (n=1) e *Vibrio* spp. (n=7). Estes isolados foram escolhidos por apresentarem resistência a penicilinas, e cefalosporinas de primeira e segunda geração nos testes de suscetibilidade a antibióticos.

Foi investigada a presença dos genes *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>* nos isolados de *Vibrio* spp. No isolado de *A. sobria* a pesquisa também incidiu sobre os genes que codificam β-lactamases do tipo AmpC mediadas por plasmídeo *bla<sub>P<sub>MAβ</sub></sub>* (*bla<sub>ACC</sub>*, *bla<sub>FOX</sub>*, *bla<sub>MOX</sub>*, *bla<sub>DHA</sub>*, *bla<sub>CIT</sub>* e *bla<sub>EBC</sub>*) e gene da AmpC cromossômica *bla<sub>AmpC</sub>* (incluindo o promotor, atenuador e região codificadora do gene).

Como nenhum dos isolados de *Vibrio* spp. apresentou um fenótipo ESBL foi posta a hipótese das resistências resultarem da presença de uma da variante mais prevalente da família TEM, a TEM-1 ou TEM-2, ou da variante SHV-1 da família SHV (Bajpai et al., 2017; Dahanayake et al., 2020). Também foi possível pesquisar o gene *bla<sub>OXA</sub>* por PCR *multiplex*. Já foram descritas várias variantes destas enzimas OXA que são consideradas ESBL, por hidrolisarem cefalosporinas de terceira geração, mas também existem outras variantes que hidrolisam carbapenemes (Munita & Arias, 2016). mas havia uma baixa probabilidade de ser o gene responsável pelas resistências visto ser muito encontrado em isolados ESBL (Sawa et al., 2020). O facto de nos isolados de *Vibrio* spp. (n=7) o resultado da pesquisa dos genes *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>OXA</sub>* ter sido negativo reforçou a suspeita de que as resistências apresentadas por estes isolados sejam intrínsecas, como discutido em 4.2.3.

Pesquisaram-se genes relacionados com AmpC mesmo sem um fenótipo presumível de AmpC no isolado *A. sobria* 6AQ por causa da resistência à cefoxitina e imipenem (I), antibióticos relatados na bibliografia como possíveis indutores de uma AmpC cromossômica (P.-L. Chen et al., 2012). Para além da β-lactamase AmpC plasmídica FOX que produz uma resistência à cefoxitina, a CMY possui seis variantes que estão relacionadas à AmpC cromossômica de *Aeromonas* spp., a CMY-1, -8, -9, -10, -11 e -19, que quando presentes contribuem para a redução da sensibilidade aos carbapenemes (Santiago et al., 2016; Sawa et al., 2020). Os resultados negativos na pesquisa dos genes *bla<sub>P<sub>MAβ</sub></sub>* confirmaram a premissa de que estas resistências são resultado de um conjunto de β-lactamases que ocorrem naturalmente nesta espécie, uma cefalosporinase, uma penicilinase e uma metalo-β-lactamase (Bertran et al., 2021; P.-L. Chen et al., 2012; Rosso et al., 2019; Rossolini et al., 1996). O resultado negativo na amplificação do gene *bla<sub>AmpC</sub>* mostra que ainda existe a necessidade de estudar as várias espécies de *Aeromonas* para perceber que enzimas provocam a resistência intrínseca, visto que se postula que sejam enzimas específicas para cada espécie de *Aeromonas*, *A. sobria*, *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. bestiarum* e *A. caviae* (Bertran et al., 2021).

A diminuição da suscetibilidade a estes antimicrobianos também pode estar relacionada com a presença bombas de efluxo, ou diminuição do número de porinas na membrana celular (Jacoby, 2009).

### 4.4. Sequenciação dos isolados selecionados

A sequenciação do genoma completo (WGS) foi realizada para isolados 1AQ, 3AQ, 4AQ, 5AQ e 34AQ. Foi escolhido o isolado *P. mirabilis* 5AQ por apresentar resistências fenotípicas a pelo menos três classes de antibióticos, quinolonas, trimetoprim e anfenicóis e por possuir um integrão de classe 2. Os isolados *E. faecium* 1AQ e 4AQ foram sequenciados para investigar as resistências registadas ao antibiótico ciprofloxacina, para perceber se existem determinantes de resistência a macrólidos (visto que não havia

critérios disponíveis para a interpretação dos resultados) e descodificar a causa da suscetibilidade à ampicilina (AMP). Foi efetuada a sequenciação do isolado *E. faecalis* 3AQ por demonstrar a presença de determinantes de resistência à tetraciclina (TET), e para perceber se estes determinantes são transferíveis por elementos genéticos móveis para o ambiente. Por fim, o isolado *E. hirae* 34AQ chamou a atenção por apresentar resistência a clindamicina (CMN) e quinupristina/dalfopristina (QND), sendo que nenhuma das duas resistências é referenciada na bibliografia, e por possuir um integrão de classe 1. A sequenciação deste isolado permitiu ainda investigar outros antibióticos para além dos discutidos, visto que praticamente nada se sabe sobre as resistências intrínsecas e adquiridas nesta espécie.

Os isolados escolhidos, pertencentes a espécies descritas na literatura como patógenos oportunistas de peixes (Petersen & Dalsgaard, 2003), foram cultivadas a partir de amostras de miolo de ostra recolhidas no Estuário do Sado (zona S1 e S2) e de ameijoja japonesa recolhidas no Estuário do Tejo, as zonas com mais atividade antropogénica das investigadas neste estudo e teoricamente mais inerentes a perturbações ambientais. A coexistência de genes de resistência e virulência pode complicar ainda mais as opções de tratamento existentes para humanos e animais de produção, incluindo aquacultura (Mussa et al., 2022).

Os resultados da sequenciação estão discriminados na Tabela 4.6, incluindo determinantes de resistência e elementos genéticos móveis de cada isolado.

#### 4.4.1. Isolado 5AQ (*Proteus mirabilis*)

O isolado de *P. mirabilis* 5AQ apresentou genes de resistência à ciprofloxacina (*qnrD1*), trimetoprim (*dfpA1*), espectinomicina e estreptomicina (*aadA1*) e estreptotricina (*sat-2*), tetraciclina (*tet(J)*) e cloranfenicol (*cat*). Estes resultados estão concordantes com os fenótipos de resistência apresentados nos testes de suscetibilidade a antibióticos. Foi detetado neste isolado um plasmídeo *Col3M*, um integrão de classe 2 (por *mPCR*), um transposão Tn7 e uma sequência de inserção *ISVsa5*.

O gene *qnrD1* é um gene de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos (PMQR) que codifica a resistência ao antibiótico ciprofloxacina (CIP) (Cavaco et al., 2009), mas não explica a resistência ao ácido nalidíxico (NAL). Teorizamos que este fenótipo pode ser explicado pela presença de mutações pontuais em *gyrA*, *gyrB*, ou *parC*, tal como foi descrito em isolados de *P. mirabilis* por Albornoz et al. (2014). Infelizmente não foi possível detetar mutações pontuais através das ferramentas do CGE para *Proteus* spp., sendo algo a ser investigado no futuro por protocolos bioinformáticos mais avançados.

Os resultados da sequenciação também mostraram que o gene *qnrD1* está localizado no plasmídeo *Col3M*, através da sua posição no *contig*, o que não é inédito em *P. mirabilis* (Bitar et al., 2020), já tendo sido inclusive reportado em Portugal, em estirpes isoladas de frangos (Jones-Dias, Clemente, et al., 2016). O uso de antibióticos da classe das quinolonas e fluoroquinolonas para além de não ser permitido na aquacultura, deve ser restringido na medicina veterinária por ser criticamente importantes para a medicina humana. O facto do gene *qnrD1* já ter sido descrito em isolados de diferentes membros da ordem *Enterobacterales* em diversos países mostra a sua capacidade de disseminação nos vários setores, e a necessidade urgente de monitorização (Jacoby et al., 2014; Literak et al., 2012; Ma et al., 2022; S. Zhang et al., 2013).

Tabela 4.6. Resultados da sequenciação do genoma completo dos isolados 1AQ, 3AQ, 4AQ, 5AQ e 34AQ

Código do isolado	Estirpe	MLST	Determinantes de resistência a antibióticos detetados	Plasmídeos	Sequências de inserção	Transposões	Genes de virulência
1AQ	<i>E. faecium</i>	ST1532	<i>pbp5</i> (p.R34Q), <i>pbp5</i> (p.P667S), <i>pbp5</i> (p.E525D), <i>pbp5</i> (p.N496K), <i>pbp5</i> (p.E100Q), <i>pbp5</i> (p.T172A), <i>pbp5</i> (p.G66E), <i>pbp5</i> (p.T324A), <i>pbp5</i> (p.S27G), <i>pbp5</i> (p.D204G), <i>pbp5</i> (p.K144Q), <i>pbp5</i> (p.V24A), <i>pbp5</i> (p.A68T), <i>pbp5</i> (p.L177I), <i>pbp5</i> (p.A499T), <i>pbp5</i> (p.E85D), <i>pbp5</i> (p.A216S), <i>aac(6')-Ii</i> , <i>msr(C)</i> , <i>eat(A)</i> , <i>efmA</i>	<i>rep29</i> , <i>rep1</i> , <i>repUS15</i> , <i>rep2</i>	ISEfa10, ISS1N	-	<i>acm</i> , <i>efaAfm</i>
3AQ	<i>E. faecalis</i>	ST249	<i>lsa(A)</i> , <i>dfrE</i> , <i>efrA</i> , <i>efrB</i> , <i>emeA</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i>	<i>repUS43</i> , <i>rep9b</i> , <i>rep6</i>	ISS1N	-	<i>cCF10</i> , <i>cad</i> , <i>tpx</i> , <i>elrA</i> , <i>srtA</i> , <i>ace</i> , <i>cOB1</i> , <i>camE</i> , <i>ebpA</i> , <i>agg</i> , <i>ebpC</i> , <i>efaAfs</i> , <i>fsrB</i> , <i>gelE</i> , <i>hylA</i> e <i>hylB</i>
4AQ	<i>E. faecium</i>	ST22 CC17	<i>pbp5</i> (p.T324A), <i>pbp5</i> (p.R34Q), <i>pbp5</i> (p.A216S), <i>pbp5</i> (p.D204G), <i>pbp5</i> (p.E100Q), <i>pbp5</i> (p.N496K), <i>pbp5</i> (p.T172A), <i>pbp5</i> (p.E525D), <i>pbp5</i> (p.S27G), <i>pbp5</i> (p.E85D), <i>pbp5</i> (p.A68T), <i>pbp5</i> (p.G66E), <i>pbp5</i> (p.P667S), <i>pbp5</i> (p.A499T), <i>pbp5</i> (p.V24A), <i>pbp5</i> (p.L177I), <i>pbp5</i> (p.K144Q), <i>aac(6')-Ii</i> , <i>msr(C)</i> , <i>eat(A)</i> , <i>efmA</i> , <i>clpl</i> , <i>gyrA</i> (p.N708Y)	<i>rep1</i> , <i>repUS15</i>	ISEfm1, ISS1N, IS256, ISEfa10, ISEfa11, ISEfm2	-	<i>acm</i> , <i>efaAfm</i>
5AQ	<i>P. mirabilis</i>	ND	<i>tet(J)</i> , <i>aadA1</i> , <i>sat-2</i> , <i>qnrD1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>cat</i>	<i>col3M</i>	ISVsa5	Tn7	ND
34AQ	<i>E. hirae</i>	ND	<i>aac(6')-Ii</i>	-	-	-	-

ND – Não definido.

Outra forma comum de disseminação de resistência em *Enterobacteriales* é mediada por transposições (He et al., 2020), sendo o Tn7 o mais descrito em isolados de *P. mirabilis* (X. Chen et al., 2022; He et al., 2020). O gene *aadA1* codifica um aminoglicosídeo adeniltransferase que afeta apenas os antibióticos espectinomicina e estreptomicina, o que explica a suscetibilidade detetada aos restantes antibióticos aminoglicosídeos como amicacina (AKN), apramicina (APR) e gentamicina (GEN). O gene *sat-2* codifica para uma estreptotricina acetiltransferase e *dfrA1* codifica uma dihidrofolato redutase.

Estes três genes encontram-se localizados num integrão classe 2, como representado na Figura 4.3, que é transportado por um transposição Tn7 (Fonseca & Vicente, 2022). Os integrões de classe 2 possuem um gene *intI2* não funcional devido a um codão *stop* interno e, provavelmente como consequência, abrigam uma variedade limitada de cassetes de genes (Kaushik et al., 2018; Partridge et al., 2018).

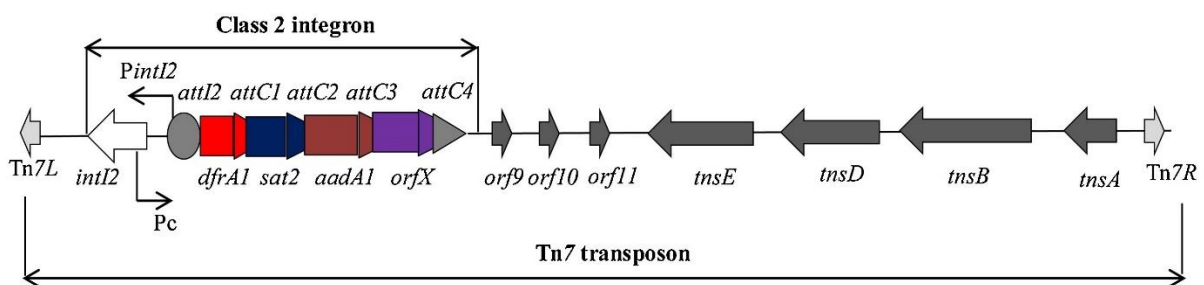


Figura 4.3. Representação esquemática de um integrão classe 2 transportado por um transposon Tn7. As cassetes *dfrA1*, *sat2*, *aadA1* e *orfX* do integrão de classe 2 estão representadas a cores diferentes. A cassette *orfX* tem uma função ainda desconhecida. O promotor da integrase e das cassetes estão representados como PintI e Pc, respetivamente. Os genes *orf1* - *orf11* codificam para proteínas hipotéticas. *attI1*, *attI2*, *attC1*-*4* representam os locais de recombinação *attI2* e *attC*. Figura retirada de Tchuente et al. (2020).

Tal como se esperava, o gene *catA* (que codifica a enzima cloranfenicol acetiltransferase) e *tet(J)* foram encontrados na sequência cromossômica do isolado 5AQ porque ambos estão relacionados à resistência intrínseca ao cloranfenicol e à tetraciclinas, respetivamente, de *P. mirabilis* (Biswas et al., 2012; Bonnin et al., 2020; Charles, Harford, et al., 1985; Shaw, 1975).

#### 4.4.2. Isolados 1AQ e 4AQ (*Enterococcus faecium*)

Os isolados *E. faecium* 1AQ e 4AQ, que pertencem às linhagens ST1532 e ST22 CC17, respetivamente, demonstraram resultados muito parecidos na sequenciação do genoma completo.

As diferenças registadas entre eles foram a deteção de uma mutação no gene *gyrA* e a presença do gene *clpI* no isolado 4AQ. Para além disso, foram detetados em ambos os isolados os genes de resistência intrínseca *aac(6')-II*, *msr(C)*, *eat(A)* e *efmA*.

Quatro replicões de plasmídeos foram identificados em 1AQ, nomeadamente *rep29*, *rep1*, *rep2* e *repUS15*, enquanto que em 4AQ foram identificados somente *rep1* e *repUS15*. A família mais prevalente em isolados de *E. faecium* é *rep2* seguido de *rep1*, sendo que a família *rep2* tem uma diversidade de hospedeiros limitada principalmente a estirpes de *E. faecium* e *E. faecalis*, enquanto que *rep1* pode ser encontrada em diversas bactérias gram-positivas (Jensen et al., 2010). Em ambos os isolados de *E. faecium* nenhum dos plasmídeos nem sequências de inserção encontradas estavam associados à mobilização de determinantes de resistência a antibióticos. Foi registada a presença de dois genes de virulência, *acm* e *efaAfm*.

A linhagem ST22 é conhecida por ser o ancestral primário de várias estirpes de *E. faecium* resistentes a antibióticos. O complexo clonal 17 (CC17) coleta clones específicos de *E. faecium* do ambiente nosocomial (Pietta et al., 2014).

Em relação aos resultados da ciprofloxacina (CIP), os isolados 1AQ e 4AQ tiveram resultados diferentes para este antibiótico nos dois métodos e entre temperaturas. Não foi detetada nenhuma mutação no isolado 1AQ, mas foi detetada uma mutação em *gyrA* desconhecida no isolado 4AQ. A mutação em *gyrA* N708Y não está descrita na bibliografia, não sendo claro se causa alterações na enzima alvo DNA girase. O mecanismo que pode justificar uma possível resistência de baixo nível nestes dois isolados é a presença do gene *efmA* que codifica uma bomba de efluxo MDR em *E. faecium*. Este gene é constitutivamente expresso em *E. faecium* a bomba de efluxo EfmA contribui para a resistência intrínseca a antibióticos como ciprofloxacina e norfloxacina, e pode desempenhar outras funções fisiológicas nesta espécie (Messele et al., 2022; Nishioka et al., 2009; Urshev & Yungareva, 2021).

Os isolados de *E. faecium* registaram a presença de mutações pontuais no gene *pbp5*, que codifica a proteína de ligação à penicilina PBP5. Geralmente estas mutações estão associadas a uma afinidade reduzida da molécula PBP5 para antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, resultando em valores de CIM elevados (Bakthavatchalam et al., 2021; Gião et al., 2022; Montealegre et al., 2017; Pietta et al., 2014). O que impediu que o fenótipo em ambos os isolados fosse de resistência, registando valores de CIM inferiores a 2 mg/L a 28°C, foi a ausência de duas mutações específicas, M485A e E629V, que ocorrem principalmente em torno da região do sítio ativo da proteína e de mutações associadas à adição de uma serina na posição 466. Foi demonstrado por Rice et al. (2004) que a presença de substituições únicas nas posições 485, 499, 629 e 466' não impactavam muito os valores de CIM da ampicilina (AMP), mas quando essas mutações estavam presentes em combinação, os níveis de resistência foram muito superiores, que foi exatamente o que faltou nos isolados 1AQ e 4AQ. Isto não é inédito em isolados de *E. faecium* e já foi registado em Portugal em isolados clínicos, de animais produtores de alimento (Gião et al., 2022) e de aves (Poeta et al., 2007). Outros fatores, como regulação, expressão e modificações translacionais do gene *pbp5* ou outros genes, também podem interferir nos valores de CIM da ampicilina (Gião et al., 2022).

No isolado 4AQ foi detetado o gene *clpI*, que codifica para chaperona ClpL que é uma importante proteína de choque térmico que está envolvida em vários processos celulares, como a resposta de tolerância ao stress, sobrevivência a longo prazo, virulência e resistência a antibióticos, os mecanismos moleculares detalhados são pouco claros (Tao & Biswas, 2013). Pensa-se que esta chaperona possa modular as enzimas biossintéticas da parede celular e levar à diminuição da suscetibilidade à penicilina. Não foi testada a penicilina nestes isolados, mas foi testada a ampicilina (AMP), antibiótico pertencente ao grupo da penicilina dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, que apenas difere da penicilina pela presença do grupo amino que ajuda o antibiótico a penetrar na membrana externa das bactérias gram-negativas (Weinstein, 2001). É de notar que nos isolados 1AQ e 33AQ foi registada uma descida nos valores de CIM de 28°C para 37°C, enquanto que em 4AQ ocorreu uma subida do valor de CIM de 28°C para 37°C. Teorizamos que essa subida de valor pode corresponder ao efeito da chaperona de choque térmico neste isolado, mas que devido à ausência das mutações de *pbp5* descritas acima não chegou a haver uma perda de suscetibilidade, apenas um decréscimo da mesma. Esta proteína está amplamente distribuída em bactérias gram-positivas, estando ausente em bactérias gram-negativas, mas o decréscimo da suscetibilidade à penicilina ainda foi pouco documentada em *E. faecium* (Huang et al., 2022)

Isto mostra o quão importante é testar estes microrganismos à temperatura do ambiente de que foram recolhidos, que neste caso é 28°C. Mudanças de temperatura durante o estudo pode influenciar os resultados, mesmo que ligeiramente.

O gene cromossômico *aac(6')-Ii* codifica uma enzima modificadora de aminoglicosídeo (AME) que confere resistência intrínseca de baixo nível a alguns antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (Zaheer et al., 2020). O efeito deste gene na gentamicina (GEN) ainda não foi bem esclarecido pois existem autores que defendem que existe uma resistência de baixo nível intrínseca codificada por este gene (Urshev & Yungareva, 2021), enquanto outro consideram que não haja efeito do gene no fenótipo deste antibiótico (Rosvoll et al., 2012). No entanto, o programa Resfinder identificou a gentamicina como um dos antibióticos que apresentavam uma resistência codificada pelo gene *aac(6')-Ii*.

O gene *msrC* em *E. faecium* codifica uma bomba de efluxo ABC que produz uma resistência intrínseca de baixo nível a macrólidos e estreptogramina B (Sharkey et al., 2016; Urshev & Yungareva, 2021, 2021; Zaheer et al., 2020). Se for adquirido um determinante de resistência à estreptogramina A, as estirpes de *E. faecium* que forem portadoras do gene intrínseco *msrC* iriam expressar altos níveis de resistência ao antibiótico quinupristina-dalfopristina (QND), o que não se verificou, visto que foram obtidos valores de CIM iguais e inferiores a 1 mg/L em todos os isolados de *E. faecium* testados.

Estes isolados 1AQ e 4AQ registaram valores de CIM iguais ao valor de ECOFF do antibiótico eritromicina, um macrólidos, mas contrariamente ao que aconteceu com o antibiótico ciprofloxacina, detetou-se um determinante de resistência. Provavelmente existem muitos antibióticos que produzem baixos níveis de resistência que não são identificados quando os resultados dos testes de suscetibilidade são comparados com os critérios disponíveis.

O gene *eat(A)* (que significa Enterococcus ABC-transporter) é um gene intrínseco que codifica para a resistência a lincosamidas, estreptogramina A e pleuromutilinas, mas a sua presença no genoma dos isolados de *E. faecium* não significa que haja um fenótipo. Só existe fenótipo LSAP que o gene está mutado, denominado *eat(A)* (Isnard et al., 2013)

#### 4.4.3. Isolado 3AQ (*Enterococcus faecalis*)

Foram identificados no isolado *E. faecalis* 3AQ, pertencente à linhagem ST249, os genes de resistência *tet(L)*, *tet(M)*, *lsa(A)*, *dfpE*, *efrA*, *efrB* e *emeA*. Não foram identificadas mutações em *pbp5*, *gyrA* ou *parC*.

Os replicões de plasmídeos *repUS43*, *rep9b* e *rep6* também foram registados.

A resistência à tetraciclina (TET) e possível resistência à oxitetraciclina (OT) registadas no isolado de *E. faecalis* podem ser justificadas pela presença de dois genes, *tet(M)* e *tet(L)*, que codificam uma proteína de proteção ribossomal e uma bomba de efluxo específica de tetraciclina, respetivamente (Mussa et al., 2022). Estes determinantes de resistência já foram documentados em aquacultura no Mediterrâneo (Di Cesare et al., 2012), mar adriático (Di Cesare et al., 2013) e no Brasil (Araújo et al., 2021) e em animais aquários em Portugal (Mussa et al., 2022). Os genes *tet* estão quase invariavelmente associados a elementos genéticos móveis (Poole, 2007), o que pode justificar a presença de um plasmídeo *repUS43* no mesmo *contig* que os genes *tet(M)* e *tet(L)*, a montante dos mesmos.

Em *E. faecalis*, o gene responsável pela resistência intrínseca aos antibióticos clindamicina (CMN) e quinupristina/dalfopristina (QND) é o gene *lsa(A)*. Este gene codifica uma proteína putativa que é estruturalmente semelhante às bombas de efluxo ABC, que é responsável pela resistência LSAP intrínseca, ou seja, resistência a lincosamidas, estreptogramina A e pleuromutilinas (Hollenbeck & Rice, 2012; Singh et al., 2002).

Existe também uma resistência intrínseca ao trimetoprim através do gene intrínseco *dfrE* que codifica uma diidrofolato redutase. Este antibiótico não foi testado nos testes de suscetibilidade a antibióticos logo não é possível prever que tipo de fenótipo teria produzido no isolado 3AQ, mas Zaheer et al. (2020) sugere que todos os isolados desta espécie carregam este gene de resistência apesar de serem suscetíveis ao trimetoprim (TMP).

EmeA e EfrAB são bombas de efluxo MDR que pertencem aos transportadores da família MFS e ABC, respetivamente, e que contribuem para a resistência intrínseca de fluoroquinolonas em *E. faecalis*. A presença dos genes *emeA*, *efrA* e *efrB* ocorre em todos os isolados de *E. faecalis*, independentemente do fenótipo à ciprofloxacina (CIP) (Esfahani et al., 2020; E.-W. Lee et al., 2003; Sánchez Valenzuela et al., 2013).

#### 4.4.4. Isolado 3AQ (*Enterococcus hirae*)

Não foi possível identificar a linhagem nem complexo clonal deste isolado. O único gene de resistência detetado foi *aac(6')-lid*, que codifica uma aminoglicosídeo acetiltransferase que provoca a resistência aos antibióticos tobramicina e amicacina (AKN) (del Campo et al., 2005). Estes resultados não permitiram o esclarecimento dos resultados dos testes de suscetibilidade a antibiótico do isolado de *E. hirae* que detetaram resistência à clindamicina (CMN) e quinupristina/dalfopristina (QND).

O único elemento genético móvel identificado foi um integrão de classe 1. Estes integrões são caracterizados por uma região conservada 5' que consiste num gene da integrase *intI1*, local de recombinação *attC* e um promotor Pc, tal como mostra a representação esquemática na Figura 4.4. A região 3' conservada contém os genes *qacΔE1* e *sul1*, responsáveis pela resistência a compostos de amônio quaternário e sulfonamidas, respetivamente.

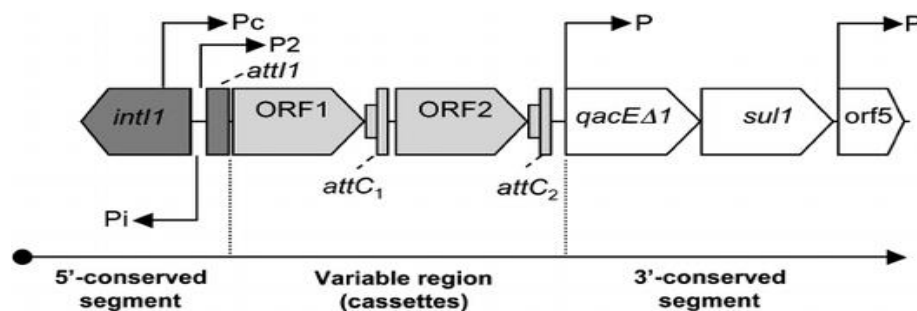


Figura 4.4. Representação esquemática de um integrão de classe 1. O integrão de classe 1 é composto por duas regiões conservadas, as regiões 5'-CS e 3'-CS, e uma região variável. O segmento 5'-CS contém o gene da integrase (*intI1*), duas regiões promotoras divergentes (Pi para o gene da integrase e Pc para cassetes de genes) e um local de recombinação (*attI1*). O segmento 3'-CS geralmente contém um gene de resistência *qacED1* e *sul1* e uma ORF5, cuja uma função ainda é desconhecida. Entre os dois segmentos conservados, a região variável. Figura retirada de Leon et al. (2010).

No isolado 3AQ não foi identificado nenhum gene de resistência às sulfonamidas, nem compostos de amônio quaternário, nem transposões ou plasmídeos, o que nos faz crer que por alguma razão só está presente no genoma do isolado parte do integrão, a região 5'-CS.

Não é a primeira vez que é detetado um integrão de classe 1 sem a região 3'-CS, já tendo sido identificado em isolados de origem alimentar, animal e humana (Naas et al., 1998; Sáenz et al., 2010). Ainda pouco se sabe sobre a sua prevalência e distribuição, mas pensa-se que possa acontecer devido a rearranjos cromossómicos em integrões previamente completos (Cury et al., 2016).

Os integrões de resistência de classe 1 estão localizados em elementos móveis como transposões e plasmídeos e, portanto, estão envolvidos na disseminação de genes de resistência a antibióticos em bactérias por transferência lateral de genes (Koczura et al., 2016).

## 5. Conclusões e perspectivas futuras

Ao ritmo que a aquacultura tem vindo a crescer em Portugal, tornou-se imperativo perceber se as bactérias que habitam estes ambientes apresentam resistências a antibióticos e se ocorre a transferência dos determinantes de resistência por elementos genéticos móveis.

A identificação de bactérias como *Aeromonas sobria*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Pseudomonas fluorescens* em sedimentos, peixes e miolo de moluscos, mostrou a diversidade de patógenos existentes em ambientes de aquacultura.

Apesar das explorações estarem localizadas em estuários e próximas de zonas urbanas, que podem ser fontes de contaminação de resíduos de antibióticos advindos das variadas indústrias, o estudo não identificou muitos isolados com resistências adquiridas, tendo sido detetadas resistências intrínsecas na maioria deles. Isto pode ser justificado, em parte, pelo número reduzido de isolados em estudo, aliado ao facto de os produtores das explorações testadas não administrarem antibióticos, tal como referiram em inquéritos realizados no início do estudo. A baixa amostragem devida às dificuldades de colheita de amostras a partir de 2020, impediu que este estudo fosse mais representativo e alargado.

Nos isolados em que foram detetadas resistências adquiridas foram identificados genes de resistência a antibióticos associados a elementos genéticos móveis. Estes genes, associados a plasmídeos, sequências de inserção, transposões ou integrões, conferem um risco de disseminação dos determinantes de resistência no ambiente aquático e envolvente. O cenário complica-se quando se trata de genes que codificam para a resistência a antibióticos que não são autorizados na aquacultura, como a ciprofloxacina, espectinomicina, estreptomina e estreptotricina. A ciprofloxacina, para além de não ser autorizada em aquacultura, é um antibiótico criticamente importante em medicina humana e veterinária e só deve ser utilizado em veterinária quando não houver um antibiótico da categoria D que seja eficaz.

Os resultados obtidos no estudo levam à conclusão de que existe a necessidade de monitorizar a emergência da resistência antimicrobiana nas explorações de aquacultura e no meio ambiente envolvente. O estabelecimento de mais critérios epidemiológicos também é imperativo, visto que até ao momento existem muito poucos critérios para bactérias de ambiente aquático. Sem estes critérios não é possível prever a existência de determinantes de resistência adquirida, sem se recorrer a métodos de pesquisa de genes.

É importante que no futuro sejam realizados mais estudos para inferir o resistoma e mobiloma deste ambiente, abrangendo mais explorações de estuários, mas também a aquacultura em mar aberto (maricultura), onde a atividade antropogénica pela proximidade de grandes cidades não é uma variável a ter tanto em consideração, mas sim a poluição pela passagem de barcos, cruzeiros, petroleiros, entre outros. Também era interessante estudar o cultivo de outros peixes, como o linguado e sardinha, que são bastante consumidos em Portugal.

Métodos de microbiologia clássica podem não ser os mais exaustivos para este tipo de estudo, sendo a análise metagenómica uma alternativa potencialmente mais eficaz. Através da análise metagenómica é possível analisar os genomas das várias bactérias, cultiváveis e não cultiváveis, presentes numa amostra e assim caracterizar o ambiente de onde a amostra é originária.

## Referências bibliográficas

- Abd El-Ghany, W. A. (2023). A review on aeromoniasis in poultry: A bacterial disease of zoonotic nature. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 17(01), 1–9. <https://doi.org/10.3855/jidc.17186>
- Ahmed, A. M., Hussein, A. I. A., & Shimamoto, T. (2006). *Proteus mirabilis* clinical isolate harbouring a new variant of *Salmonella* genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), 184–190. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl471>
- Albornoz, E., Lucero, C., Romero, G., Rapoport, M., Guerriero, L., Andres, P., Galas, M., Corso, A., & Petroni, A. (2014). Analysis of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of the tribe Proteaceae from Argentina: First report of *qnrD* in the Americas. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2(4), 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.05.005>
- Allison, D. G., & Lambert, P. A. (2015). Modes of Action of Antibacterial Agents. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 583–598). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00032-9>
- Anokyewaa, M. A., Amoah, K., Li, Y., Lu, Y., Kuebutornye, F. K. A., Asiedu, B., & Seidu, I. (2021). Prevalence of virulence genes and antibiotic susceptibility of *Bacillus* used in commercial aquaculture probiotics in China. *Aquaculture Reports*, 21, 100784. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100784>
- Araújo, A. J. G., Grassotti, T. T., & Frazzon, A. P. G. (2021). Characterization of *Enterococcus* spp. Isolated from a fish farming environment in southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 81(4), 954–961. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.232503>
- Bajpai, T., Pandey, M., Varma, M., & Bhatambare, G. S. (2017). Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Beta-Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna Journal of Medicine*, 07(01), 12–16. <https://doi.org/10.4103/2231-0770.197508>
- Bakthavatchalam, Y. D., Vasudevan, K., Babu, P., Neeravi, A. R., Narasiman, V., & Veeraraghavan, B. (2021). Genomic insights of *optrA*-carrying linezolid-resistant *Enterococcus faecium* using hybrid assembly: First report from India. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 25, 331–336. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.04.005>
- Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria: Plasmid-encoded antibiotic resistance. *British Journal of Pharmacology*, 153(Supl.1), S347–S357. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707607>
- Bertran, X., Rubio, M., Gómez, L., Llovet, T., Muñoz, C., Navarro, F., & Miro, E. (2021). Taxonomic Identification of Different Species of the Genus *Aeromonas* by Whole-Genome Sequencing and Use of Their Species-Specific  $\beta$ -Lactamases as Phylogenetic Markers. *Antibiotics*, 10(4), 354. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040354>
- Bie, L., Wu, H., Wang, X.-H., Wang, M., & Xu, H. (2017). Identification and characterization of new members of the SXT/R391 family of integrative and conjugative elements (ICEs) in *Proteus mirabilis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(2), 242–246. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.045>
- Binda, E., Marinelli, F., & Marcone, G. (2014). Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. *Antibiotics*, 3(4), 572–594. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3040572>

- Biswas, T., Houghton, J. L., Garneau-Tsodikova, S., & Tsodikov, O. V. (2012). The structural basis for substrate versatility of chloramphenicol acetyltransferase CAT I: Structural Analysis of CAT I - Substrate Complexes. *Protein Science*, *21*(4), 520–530. <https://doi.org/10.1002/pro.2036>
- Bitar, I., Mattioni Marchetti, V., Mercato, A., Nucleo, E., Anesi, A., Bracco, S., Rognoni, V., Hrabak, J., & Migliavacca, R. (2020). Complete Genome and Plasmids Sequences of a Clinical *Proteus mirabilis* Isolate Producing Plasmid Mediated NDM-1 From Italy. *Microorganisms*, *8*(3), 339. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030339>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Bonnin, R. A., Girlich, D., Jousset, A. B., Gauthier, L., Cuzon, G., Bogaerts, P., Haenni, M., Madec, J.-Y., Couvé-Deacon, E., Barraud, O., Fortineau, N., Glaser, P., Glupczynski, Y., Dortet, L., & Naas, T. (2020). A single *Proteus mirabilis* lineage from human and animal sources: A hidden reservoir of OXA-23 or OXA-58 carbapenemases in Enterobacterales. *Scientific Reports*, *10*(1), 9160. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66161-z>
- Borowiak, M., Baumann, B., Fischer, J., Thomas, K., Deneke, C., Hammerl, J. A., Szabo, I., & Malorny, B. (2020). Development of a Novel mcr-6 to mcr-9 Multiplex PCR and Assessment of mcr-1 to mcr-9 Occurrence in Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Isolates From Environment, Feed, Animals and Food (2011–2018) in Germany. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 80. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00080>
- Brolund, A., Sundqvist, M., Kahlmeter, G., & Grape, M. (2010). Molecular Characterisation of Trimethoprim Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a Two Year Intervention on Trimethoprim Use. *PLoS ONE*, *5*(2), e9233. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009233>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016).  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(8), a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, *8*(7), 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
- Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., & Buschmann, A. H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health: Aquacultural antimicrobial use and antimicrobial resistance. *Environmental Microbiology*, *15*(7), 1917–1942. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>
- Cai, J., Schwarz, S., Chi, D., Wang, Z., Zhang, R., & Wang, Y. (2019). Faecal carriage of *optrA*-positive enterococci in asymptomatic healthy humans in Hangzhou, China. *Clinical Microbiology and Infection*, *25*(5), 630.e1–630.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.07.025>
- Carr, V. R., Shkoporov, A., Hill, C., Mullany, P., & Moyes, D. L. (2021). Probing the Mobilome: Discoveries in the Dynamic Microbiome. *Trends in Microbiology*, *29*(2), 158–170. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.003>
- Carroll, A. C., & Wong, A. (2018). Plasmid persistence: Costs, benefits, and the plasmid paradox. *Canadian Journal of Microbiology*, *64*(5), 293–304. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0609>

- Cavaco, L. M., Hasman, H., Xia, S., & Aarestrup, F. M. (2009). QnrD , a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in Salmonella enterica Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 603–608. <https://doi.org/10.1128/AAC.00997-08>
- Center for Genomic Epidemiology. (2011). *Center for Genomic Epidemiology*. Disponível em <http://www.genomicepidemiology.org>. Acedido a 25 de novembro de 2022.
- Charles, I. G., Harford, S., Brookfield, J. F., & Shaw, W. V. (1985). Resistance to chloramphenicol in Proteus mirabilis by expression of a chromosomal gene for chloramphenicol acetyltransferase. *Journal of Bacteriology*, 164(1), 114–122. <https://doi.org/10.1128/jb.164.1.114-122.1985>
- Charles, I. G., Keyte, J. W., & Shaw, W. V. (1985). Nucleotide sequence analysis of the cat gene of Proteus mirabilis: Comparison with the type I (Tn9) cat gene. *Journal of Bacteriology*, 164(1), 123–129. <https://doi.org/10.1128/jb.164.1.123-129.1985>
- Chen, J., Sun, R., Pan, C., Sun, Y., Mai, B., & Li, Q. X. (2020). Antibiotics and Food Safety in Aquaculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(43), 11908–11919. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03996>
- Chen, P.-L., Ko, W.-C., & Wu, C.-J. (2012). Complexity of  $\beta$ -lactamases among clinical Aeromonas isolates and its clinical implications. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 45(6), 398–403. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.08.008>
- Chen, X., Lei, C.-W., Liu, S.-Y., Li, T.-Y., Chen, Y., Wang, Y.-T., Li, C., Wang, Q., Yang, X., Huang, Z.-R., Gao, Y.-F., & Wang, H.-N. (2022). Characterisation of novel Tn7-derivatives and Tn7-like transposon found in Proteus mirabilis of food-producing animal origin in China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 28, 233–237. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.01.012>
- Cheng, X., Lu, Y., Song, Y., Zhang, R., ShangGuan, X., Xu, H., Liu, C., & Liu, H. (2021). Analysis of Antibiotic Resistance Genes, Environmental Factors, and Microbial Community From Aquaculture Farms in Five Provinces, China. *Frontiers in Microbiology*, 12, 679805. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.679805>
- Cherak, Z., Loucif, L., Moussi, A., & Rolain, J.-M. (2021). Epidemiology of mobile colistin resistance (mcr) genes in aquatic environments. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 27, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.07.021>
- Choi, J.-M., & Woo, G.-J. (2015). Transfer of Tetracycline Resistance Genes with Aggregation Substance in Food-Borne Enterococcus faecalis. *Current Microbiology*, 70(4), 476–484. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0742-1>
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232–260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2001). *M100S, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196439901880090>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2005a). *M42-P - Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Proposed Guideline*. 25(21), 54.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2005b). *M49-P - Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Proposed Guideline*. 25(22), 56.

- Cury, J., Jové, T., Touchon, M., Néron, B., & Rocha, E. P. (2016). Identification and analysis of integrons and cassette arrays in bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, *44*(10), 4539–4550. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw319>
- D’Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., & Wright, G. D. (2006). Sampling the Antibiotic Resistome. *Science*, *311*(5759), 374–377. <https://doi.org/10.1126/science.1120800>
- Dahanayake, P. S., Hossain, S., Wickramanayake, M. V. K. S., & Heo, G. -J. (2020). Prevalence of virulence and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) genes harbouring *Vibrio* spp. Isolated from cockles ( *Tegillarca granosa* ) marketed in Korea. *Letters in Applied Microbiology*, *71*(1), 61–69. <https://doi.org/10.1111/lam.13232>
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *65*(3), 490–495. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp498>
- Dang, H., Zhang, X., Song, L., Chang, Y., & Yang, G. (2007). Molecular determination of oxytetracycline-resistant bacteria and their resistance genes from mariculture environments of China: Antibiotic resistance genes in mariculture environments. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(6), 2580–2592. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03494.x>
- del Campo, R., Galán, J. C., Tenorio, C., Ruiz-Garbajosa, P., Zarazaga, M., Torres, C., & Baquero, F. (2005). New aac(6′)-I genes in *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans*: Effect on  $\beta$ -lactam/aminoglycoside synergy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *55*(6), 1053–1055. <https://doi.org/10.1093/jac/dki138>
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., & Yu, G. (2015). Resistance integrons: Class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *14*(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>
- Di Cesare, A., Luna, G. M., Vignaroli, C., Pasquaroli, S., Tota, S., Paroncini, P., & Biavasco, F. (2013). Aquaculture Can Promote the Presence and Spread of Antibiotic-Resistant Enterococci in Marine Sediments. *PLoS ONE*, *8*(4), e62838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062838>
- Di Cesare, A., Vignaroli, C., Luna, G. M., Pasquaroli, S., & Biavasco, F. (2012). Antibiotic-Resistant Enterococci in Seawater and Sediments from a Coastal Fish Farm. *Microbial Drug Resistance*, *18*(5), 502–509. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0204>
- Done, H. Y., Venkatesan, A. K., & Halden, R. U. (2015). Does the Recent Growth of Aquaculture Create Antibiotic Resistance Threats Different from those Associated with Land Animal Production in Agriculture? *The AAPS Journal*, *17*(3), 513–524. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9722-z>
- Dowling, A., Dwyer, J. O., & Adley, C. C. (2017). Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance. *Antimicrobial Research: Novel Bioknowledge and Educational Programs*, *1*, 11.
- Elhadi, N., Yamani, L. Z., Aljeldah, M., Alomar, A. I., Ibrahim, H., & Diab, A. (2022). Serological and Antibiotic Resistance Patterns As Well As Molecular Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Coastal Waters in the Eastern Province of Saudi Arabia. *Journal of Epidemiology and Global Health*, *12*(4), 524–540. <https://doi.org/10.1007/s44197-022-00071-3>
- ESCMID - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (2022). *EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Disponível em <https://eucast.org/>. Acedido a 20 de Outubro de 2022.

Esfahani, S., Ahmadrajabi, R., Mollaei, H., & Saffari, F. (2020). Co-Incidence of Type II Topoisomerase Mutations and Efflux Expression in High Fluoroquinolone Resistant *Enterococcus faecalis* Isolated from Urinary Tract Infections. *Infection and Drug Resistance*, 553–559.

European Commission, Joint Research Centre, Isabella Sanseverino, Anna Navarro, Dimitar Marinov, Robert Loos, & Teresa Lettieri. (2018). *State of the art on the contribution of water to antimicrobial resistance*. Publications Office of the European Union. <https://data.europa.eu/doi/10.2760/771124>

European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control. (2021). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSA Journal*, 19(4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6490>

European Medicines Agency. (2020). *Categorisation of Antibiotics Used in Animals Promotes Responsible Use to Protect Public and Animal Health*. Disponível em [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf). Acedido em 11 de outubro de 2022

European Medicines Agency. (2021). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020: Trends from 2010 to 2020*. Publications Office of the European Union. <https://data.europa.eu/doi/10.2809/636389>

Fernandes, R., Amador, P., & Prudêncio, C. (2013).  $\beta$ -Lactams: Chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*, 24(1), 7–17. <https://doi.org/10.1097/MRM.0b013e3283587727>

Ferreira, M. S. R. (2022). Perfis de resistência a antibióticos em isolados de *Escherichia coli* de frangos do campo e de avicultura industrial [Dissertação de Mestrado, *Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia*]. <http://hdl.handle.net/10174/31352>

Fonseca, É. L., & Vicente, A. C. (2022). Integron Functionality and Genome Innovation: An Update on the Subtle and Smart Strategy of Integrase and Gene Cassette Expression Regulation. *Microorganisms*, 10(2), 224. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020224>

Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A., Takahashi, Y., Torii, K., Hasegawa, T., & Ohta, M. (2003). Similarity of Tetracycline Resistance Genes Isolated from Fish Farm Bacteria to Those from Clinical Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5336–5342. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5336-5342.2003>

Gagetti, P., Bonofiglio, L., García Gabarrot, G., Kaufman, S., Mollerach, M., Vigliarolo, L., von Specht, M., Toresani, I., & Lopardo, H. A. (2019). Resistance to  $\beta$ -lactams in enterococci. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(2), 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.007>

García-Solache, M., & Rice, L. B. (2019). The *Enterococcus*: A Model of Adaptability to Its Environment. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), e00058-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>

Geraldes, C., Tavares, L., Gil, S., & Oliveira, M. (2022). *Enterococcus* Virulence and Resistant Traits Associated with Its Permanence in the Hospital Environment. *Antibiotics*, 11(7), 857. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070857>

Ghenghesh, K. S., El-Mohammady, H., Levin, S. Y., Zorgani, A., & Tawil, K. (2013). Antimicrobial resistance profile of *Aeromonas* species isolated from Libya. *Libyan Journal of Medicine*, 8(1), 21320. <https://doi.org/10.3402/ljm.v8i0.21320>

- Gião Santana Oliveira e Silva, J. (2021). Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of resistance mechanisms of *Enterococcus* spp. From the intestinal microbiota of food producing animals [Dissertação de Mestrado, *Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia*]. <http://dspace.uevora.pt/rdpc/handle/10174/30688>
- Gião, J., Leão, C., Albuquerque, T., Clemente, L., & Amaro, A. (2022). Antimicrobial Susceptibility of *Enterococcus* Isolates from Cattle and Pigs in Portugal: Linezolid Resistance Genes *optrA* and *poxtA*. *Antibiotics*, *11*(5), 615. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050615>
- Gillings, M. R. (2014). Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *78*(2), 257–277. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>
- Girlich, D., Bonnin, R. A., Dortet, L., & Naas, T. (2020). Genetics of Acquired Antibiotic Resistance Genes in *Proteus* spp. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 256. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00256>
- Girlich, D., Poirel, L., & Nordmann, P. (2010). Novel Ambler Class A Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase from a *Pseudomonas fluorescens* Isolate from the Seine River, Paris, France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(1), 328–332. <https://doi.org/10.1128/AAC.00961-09>
- Gleckman, R., Blagg, N., & Joubert, D. W. (1981). Trimethoprim: Mechanisms of Action, Antimicrobial Activity, Bacterial Resistance, Pharmacokinetics, Adverse Reactions, and Therapeutic Indications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, *1*(1), 14–19. <https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.1981.tb03548.x>
- Govender, R., Amoah, I. D., Adegoke, A. A., Singh, G., Kumari, S., Swalaha, F. M., Bux, F., & Stenström, T. A. (2021). Identification, antibiotic resistance, and virulence profiling of *Aeromonas* and *Pseudomonas* species from wastewater and surface water. *Environmental Monitoring and Assessment*, *193*(5), 294. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09046-6>
- Guillard, T., Grillon, A., de Champs, C., Cartier, C., Madoux, J., Berçot, B., Lebreil, A.-L., Lozniewski, A., Riahi, J., Vernet-Garnier, V., & Cambau, E. (2014). Mobile Insertion Cassette Elements Found in Small Non-Transmissible Plasmids in Proteaeae May Explain *qnrD* Mobilization. *PLoS ONE*, *9*(2), e87801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087801>
- Hassan, J., Eddine, R. Z., Mann, D., Li, S., Deng, X., Saoud, I. P., & Kassem, I. I. (2020). The Mobile Colistin Resistance Gene, *mcr-1.1*, Is Carried on IncX4 Plasmids in Multidrug Resistant *E. coli* Isolated from Rainbow Trout Aquaculture. *Microorganisms*, *8*(11), 1636. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111636>
- He, J., Li, C., Cui, P., & Wang, H. (2020). Detection of Tn7-Like Transposons and Antibiotic Resistance in Enterobacteriales From Animals Used for Food Production With Identification of Three Novel Transposons Tn6813, Tn6814, and Tn6765. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 2049. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02049>
- He, J., Sun, L., Zhang, L., Leptihn, S., Yu, Y., & Hua, X. (2021). A Novel SXT/R391 Integrative and Conjugative Element Carries Two Copies of the *bla* NDM-1 Gene in *Proteus mirabilis*. *MSphere*, *6*(4), e00588-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00588-21>
- Helsens, N., Calvez, S., Prevost, H., Bouju-Albert, A., Maillet, A., Rossero, A., Hurtaud-Pessel, D., Zagorec, M., & Magras, C. (2020). Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Communities of Farmed Rainbow Trout Fillets (*Oncorhynchus mykiss*). *Frontiers in Microbiology*, *11*, 590902. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.590902>

- Hollenbeck, B. L., & Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, 3(5), 421–569. <https://doi.org/10.4161/viru.21282>
- Huang, Z., Bai, Y., Wang, Q., Yang, X., Zhang, T., Chen, X., & Wang, H. (2022). Persistence of transferable oxazolidinone resistance genes in enterococcal isolates from a swine farm in China. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1010513. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1010513>
- Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*, 21(12). <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
- Igbinosa, I. H., Beshiru, A., Odjadjare, E. E., Ateba, C. N., & Igbinosa, E. O. (2017). Pathogenic potentials of *Aeromonas* species isolated from aquaculture and abattoir environments. *Microbial Pathogenesis*, 107, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.037>
- Instituto Nacional de Estatística. (2021). *Estatísticas da Pesca: 2021*. <https://www.ine.pt/xurl/pub/36828280>
- Isnard, C., Malbruny, B., Leclercq, R., & Cattoir, V. (2013). Genetic Basis for In Vitro and In Vivo Resistance to Lincosamides, Streptogramins A, and Pleuromutilins (LS A P Phenotype) in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(9), 4463–4469. <https://doi.org/10.1128/AAC.01030-13>
- Jacoby, G. A. (2005). Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 41(Supl.2), S120–S126. <https://doi.org/10.1086/428052>
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161–182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
- Jacoby, G. A., Strahilevitz, J., & Hooper, D. C. (2014). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *Microbiology Spectrum*, 2(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013>
- Jeamsripong, S., Khant, W., & Chuanchuen, R. (2020). Distribution of phenotypic and genotypic antimicrobial resistance and virulence genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultivated oysters and estuarine water. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(8), fiae081. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae081>
- Jensen, L. B., Garcia-Migura, L., Valenzuela, A. J. S., Løhr, M., Hasman, H., & Aarestrup, F. M. (2010). A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 80(1), 25–43. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.10.012>
- Jones-Dias, D., Clemente, L., Moura, I. B., Sampaio, D. A., Albuquerque, T., Vieira, L., Manageiro, V., & Caniça, M. (2016). Draft Genomic Analysis of an Avian Multidrug Resistant *Morganella morganii* Isolate Carrying qnrD1. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01660>
- Jones-Dias, D., Manageiro, V., Ferreira, E., Barreiro, P., Vieira, L., Moura, I. B., & Caniça, M. (2016). Architecture of Class 1, 2, and 3 Integrons from Gram Negative Bacteria Recovered among Fruits and Vegetables. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01400>
- Kadlec, K., von Czapiewski, E., Kaspar, H., Wallmann, J., Michael, G. B., Steinacker, U., & Schwarz, S. (2011). Molecular Basis of Sulfonamide and Trimethoprim Resistance in Fish-Pathogenic *Aeromonas* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), 7147–7150. <https://doi.org/10.1128/AEM.00560-11>

- Kahlmeter, G., & Turnidge, J. (2022). How to: ECOFFs—the why, the how, and the don'ts of EUCAST epidemiological cutoff values. *Clinical Microbiology and Infection*, 28(7), 952–954. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.02.024>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300. [https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP\\_349\\_15](https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15)
- Kargar, M., Mohammadalipour, Z., Doosti, A., Lorzadeh, S., & Japoni-Nejad, A. (2014). High Prevalence of Class 1 to 3 Integrons Among Multidrug-Resistant Diarrheagenic Escherichia coli in Southwest of Iran. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 5(4), 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2014.06.003>
- Karunasagar, I. (2020). Complexities Involved in Source Attribution of Antimicrobial Resistance Genes Found in Aquaculture Products. *Asian Fisheries Science*, 33S. <https://doi.org/10.33997/j.afs.2020.33.S1.003>
- Kateete, D. P., Edolu, M., Kigozi, E., Kisukye, J., Baluku, H., Mwiine, F. N., & Najjuka, C. F. (2019). Species, antibiotic susceptibility profiles and van gene frequencies among enterococci isolated from patients at Mulago National Referral Hospital in Kampala, Uganda. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 486. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4136-7>
- Kaushik, M., Kumar, S., Kapoor, R. K., Viridi, J. S., & Gulati, P. (2018). Integrons in Enterobacteriaceae: Diversity, distribution and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(2), 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004>
- Kim, D.-W., & Cha, C.-J. (2021). Antibiotic resistome from the One-Health perspective: Understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(3), 301–309. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00569-z>
- Knijn, A., Michelacci, V., Orsini, M., & Morabito, S. (2020). *Advanced Research Infrastructure for Experimentation in genomics (ARIES): A lustrum of Galaxy experience*. Bioinformatics. <https://doi.org/10.1101/2020.05.14.095901>
- Koczura, R., Mokracka, J., Taraszewska, A., & Łopacinska, N. (2016). Abundance of Class 1 Integron-Integrase and Sulfonamide Resistance Genes in River Water and Sediment Is Affected by Anthropogenic Pressure and Environmental Factors. *Microbial Ecology*, 72(4), 909–916. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0843-4>
- Kong, K.-F., Schneper, L., & Mathee, K. (2010). Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology: BETA-LACTAM RESISTANCE. *APMIS*, 118(1), 1–36. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x>
- Kotb, D. N., Mahdy, W. K., Mahmoud, M. S., & Khairy, R. M. M. (2019). Impact of co-existence of PMQR genes and QRDR mutations on fluoroquinolones resistance in Enterobacteriaceae strains isolated from community and hospital acquired UTIs. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 979. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4606-y>
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6), a027029. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>

- Laganà, P., Caruso, G., Minutoli, E., Zaccone, R., & Santi, D. (2011). Susceptibility to antibiotics of *Vibrio* spp. And *Photobacterium damsela* ssp. *Piscicida* strains isolated from Italian aquaculture farms. *The New Microbiologica*, 34(1), 53–63.
- Lambert, P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1471–1485. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.003>
- Lambert, T. (2012). Antibiotics that affect the ribosome. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 31(1), 57–64. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2095>
- Lee, E.-W., Huda, M. N., Kuroda, T., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (2003). EfrAB, an ABC Multidrug Efflux Pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(12), 3733–3738. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3733-3738.2003>
- Lee, L.-H., Ab Mutalib, N.-S., Law, J. W.-F., Wong, S. H., & Letchumanan, V. (2018). Discovery on Antibiotic Resistance Patterns of *Vibrio parahaemolyticus* in Selangor Reveals Carbapenemase Producing *Vibrio parahaemolyticus* in Marine and Freshwater Fish. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2513. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02513>
- Leon, G., Quiroga, C., Centron, D., & Roy, P. H. (2010). Diversity and strength of internal outward-oriented promoters in group IIC-attC introns. *Nucleic Acids Research*, 38(22), 8196–8207. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq709>
- Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 34–44. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
- Li, L., Wang, Q., Zhang, H., Yang, M., Khan, M. I., & Zhou, X. (2016). Sensor histidine kinase is a  $\beta$ -lactam receptor and induces resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(6), 1648–1653. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520300113>
- Li, P., Liu, C., Li, B., & Ma, Q. (2020). Structural analysis of the CARB  $\beta$ -lactamase from *Vibrio parahaemolyticus* facilitates application of the  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor therapy. *Biochimie*, 171–172, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.03.011>
- Li, X., Du, Y., Du, P., Dai, H., Fang, Y., Li, Z., Lv, N., Zhu, B., Kan, B., & Wang, D. (2016). SXT/R391 integrative and conjugative elements in *Proteus* species reveal abundant genetic diversity and multidrug resistance. *Scientific Reports*, 6(1), 37372. <https://doi.org/10.1038/srep37372>
- Lin, M., Wu, X., Yan, Q., Ma, Y., Huang, L., Qin, Y., & Xu, X. (2016). Incidence of antimicrobial-resistance genes and integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from eels and aquaculture ponds. *Diseases of Aquatic Organisms*, 120(2), 115–123. <https://doi.org/10.3354/dao03013>
- Literak, I., Micudova, M., Tausova, D., Cizek, A., Dolejska, M., Papousek, I., Prochazka, J., Vojtech, J., Borleis, F., Guardone, L., Guenther, S., Hordowski, J., Lejas, C., Meissner, W., Marcos, B. F., & Tucakov, M. (2012). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Fecal Bacteria from Rooks Commonly Wintering Throughout Europe. *Microbial Drug Resistance*, 18(6), 567–573. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0075>
- Lu, W., Qiu, X., Chen, K., Zhao, R., Li, Q., & Wu, Q. (2022). Distribution and Molecular Characterization of Functional Class 2 Integrons in Clinical *Proteus mirabilis* Isolates. *Infection and Drug Resistance*, 465–474.

- Ma, W.-Q., Han, Y.-Y., Zhou, L., Peng, W.-Q., Mao, L.-Y., Yang, X., Wang, Q., Zhang, T.-J., Wang, H.-N., & Lei, C.-W. (2022). Contamination of *Proteus mirabilis* harbouring various clinically important antimicrobial resistance genes in retail meat and aquatic products from food markets in China. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1086800. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1086800>
- Machado, E., Cantón, R., Baquero, F., Galán, J.-C., Rollán, A., Peixe, L., & Coque, T. M. (2005). Integron Content of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains over 12 Years in a Single Hospital in Madrid, Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(5), 1823–1829. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1823-1829.2005>
- Mammeri, H., Eb, F., Berkani, A., & Nordmann, P. (2008). Molecular characterization of AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered in a French hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *61*(3), 498–503. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm538>
- Manage, P. M. (2018). Heavy use of antibiotics in aquaculture: Emerging human and animal health problems – A review. Sri Lanka. *Journal of Aquatic Sciences*, *23*(1), 13-27. <https://doi.org/10.4038/sljas.v23i1.7543>
- Marinho, C. M., Santos, T., Gonçalves, A., Poeta, P., & Igrejas, G. (2016). A Decade-Long Commitment to Antimicrobial Resistance Surveillance in Portugal. *Frontiers in Microbiology*, *07*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01650>
- Mazzariol, A., Kocsis, B., Koncan, R., Kocsis, E., Lanzafame, P., & Cornaglia, G. (2012). Description and plasmid characterization of qnrD determinants in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii*. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(3), E46–E48. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03728.x>
- Meerwein, M., Tarnutzer, A., Böni, M., Van Bambeke, F., Hombach, M., & Zinkernagel, A. S. (2020). Increased Azithromycin Susceptibility of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria on RPMI-1640 Agar Assessed by Disk Diffusion Testing. *Antibiotics*, *9*(5), 218. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050218>
- Messele, Y. E., Hasoon, M. F., Trott, D. J., Veltman, T., McMeniman, J. P., Kidd, S. P., Low, W. Y., & Petrovski, K. R. (2022). Longitudinal Analysis of Antimicrobial Resistance among Enterococcus Species Isolated from Australian Beef Cattle Faeces at Feedlot Entry and Exit. *Animals*, *12*(19), 2690. <https://doi.org/10.3390/ani12192690>
- Miller, R. A., & Harbottle, H. (2018). Antimicrobial Drug Resistance in Fish Pathogens. *Microbiology Spectrum*, *6*(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0017-2017>
- Miller, W. R., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *12*(10), 1221–1236. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.956092>
- Minarini, L. A. R., & Darini, A. L. C. (2012). Mutations in the quinolone resistance-determining regions of gyrA and parC in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *43*(4), 1309–1314. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400010>
- Miranda, C. D., Concha, C., Godoy, F. A., & Lee, M. R. (2022). Aquatic Environments as Hotspots of Transferable Low-Level Quinolone Resistance and Their Potential Contribution to High-Level Quinolone Resistance. *Antibiotics*, *11*(11), 1487. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111487>

- Mo, W. Y., Chen, Z., Leung, H. M., & Leung, A. O. W. (2017). Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(10), 8978–8989. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5607-z>
- Montealegre, M. C., Roh, J. H., Rae, M., Davlieva, M. G., Singh, K. V., Shamoo, Y., & Murray, B. E. (2017). Differential Penicillin-Binding Protein 5 (PBP5) Levels in the Enterococcus faecium Clades with Different Levels of Ampicillin Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(1), e02034-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02034-16>
- Mussa, E. A. M., Alsalahi, A., Aljaberi, M. A., Jasni, A. S., Desa, M. N. M., Al-Mahdi, A. Y. M., & Hamat, R. A. (2022). Acquired tetracycline resistance genes by transposons and virulence factors in enterococci recovered from overland and aquatic animals: A systematic review. *Reviews in Aquaculture*, 14(1), 399–413. <https://doi.org/10.1111/raq.12605>
- Muziasari, W. I., Managaki, S., Tamminen, M., Suzuki, S., & Virta, M. (2014). Sulphonamide and Trimethoprim Resistance Genes Persist in Sediments at Baltic Sea Aquaculture Farms but Are Not Detected in the Surrounding Environment. *PLOS ONE*, 9(3), 7.
- Naas, T., Sougakoff, W., Casetta, A., & Nordmann, P. (1998). Molecular Characterization of OXA-20, a Novel Class D  $\beta$ -Lactamase, and Its Integron from Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(8), 2074–2083. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.8.2074>
- Nakano, R., Nakano, A., Abe, M., Nagano, N., Asahara, M., Furukawa, T., Ono, Y., Yano, H., & Okamoto, R. (2019). Prevalence and mechanism of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of Proteus mirabilis in Japan. *Heliyon*, 5(3), e01291. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01291>
- Ndi, O. L., & Barton, M. D. (2011). Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in Aeromonas spp. from rainbow trout farms in Australia: Integron resistance determinants in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 34(8), 589–599. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01272.x>
- Nguyen, H. N. K., Van, T. T. H., Nguyen, H. T., Smooker, P. M., Shimeta, J., & Coloe, P. J. (2014). Molecular characterization of antibiotic resistance in Pseudomonas and Aeromonas isolates from catfish of the Mekong Delta, Vietnam. *Veterinary Microbiology*, 171(3–4), 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.028>
- Nishioka, T., Ogawa, W., Kuroda, T., Katsu, T., & Tsuchiya, T. (2009). Gene Cloning and Characterization of EfmA, a Multidrug Efflux Pump, from Enterococcus faecium. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(3), 483–488. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.483>
- Oddsson, G. V. (2020). A Definition of Aquaculture Intensity Based on Production Functions—The Aquaculture Production Intensity Scale (APIS). *Water*, 12(3), 765. <https://doi.org/10.3390/w12030765>
- Odeyemi, O. A., & Ahmad, A. (2017). Antibiotic resistance profiling and phenotyping of Aeromonas species isolated from aquatic sources. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(1), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.016>
- Park, Y. H., Hwang, S. Y., Hong, M. K., & Kwon, K. H. (2012). Use of antimicrobial agents in aquaculture. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 31(1), 189–197. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2105>

- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E., & Iredell, J. R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 757–784. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00175.x>
- Patil, H. J., Benet-Perelberg, A., Naor, A., Smirnov, M., Ofek, T., Nasser, A., Minz, D., & Cytryn, E. (2016). Evidence of Increased Antibiotic Resistance in Phylogenetically-Diverse *Aeromonas* Isolates from Semi-Intensive Fish Ponds Treated with Antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01875>
- Pepi, M., & Focardi, S. (2021). Antibiotic-Resistant Bacteria in Aquaculture and Climate Change: A Challenge for Health in the Mediterranean Area. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(11), 5723. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115723>
- Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B., & Balcázar, J. L. (2018). Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. *Trends in Microbiology*, 26(11), 896–903. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002>
- Petersen, A., & Dalsgaard, A. (2003). Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. *Environmental Microbiology*, 5(5), 395–402. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00430.x>
- Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2928. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>
- Pietro, W. J., Woźniak, A., Pasik, K., Cybulski, W., & Krasucka, D. (2014). Amphenicols stability in medicated feed – development and validation of liquid chromatography method. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 58(4), 621–629. <https://doi.org/10.2478/bvip-2014-0095>
- Pietta, E., Montealegre, M. C., Roh, J. H., Cocconcelli, P. S., & Murray, B. E. (2014). *Enterococcus faecium* PBP5-S/R, the Missing Link between PBP5-S and PBP5-R. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(11), 6978–6981. <https://doi.org/10.1128/AAC.03648-14>
- Poeta, P., Costa, D., Igrejas, G., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Rodrigues, J., & Torres, C. (2007). Polymorphisms of the *pbp5* gene and correlation with ampicillin resistance in *Enterococcus faecium* isolates of animal origin. *Journal of Medical Microbiology*, 56(2), 236–240. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46778-0>
- Poirel, L., Rodriguez-Martinez, J.-M., Mammeri, H., Liard, A., & Nordmann, P. (2005). Origin of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant *QnrA*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3523–3525. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3523-3525.2005>
- Poole, K. (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*, 39(3), 162–176. <https://doi.org/10.1080/07853890701195262>
- Poole, T. L., Schlosser, W. D., Crippen, T. L., Swiger, S. L., Norman, K. N., & Anderson, R. C. (2023). Whole-Genome Sequence of *Aeromonas* spp. Isolated from a Dairy Farm in Central Texas. *Microbiology Research*, 14(1), 161–176. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14010014>

- Preena, P. G., Swaminathan, T. R., Kumar, V. J. R., & Singh, I. S. B. (2020). Antimicrobial resistance in aquaculture: A crisis for concern. *Biologia*, *75*(9), 1497–1517. <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00456-4>
- Ray, S., Das, S., & Suar, M. (2017). Molecular Mechanism of Drug Resistance. Em G. Arora, A. Sajid, & V. C. Kalia (Eds.), *Drug Resistance in Bacteria, Fungi, Malaria, and Cancer* (pp. 47–110). *Springer International Publishing*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48683-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48683-3_3)
- Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S. A., De Frutos Escobar, C., Malhotra-Kumar, S., Villa, L., Carattoli, A., & Hendriksen, R. S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Eurosurveillance*, *23*(6). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>
- Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D., Avarre, J.-C., Combe, M., Pepey, E., Pouyaud, L., Vega-Heredía, S., de Verdal, H., & Gozlan, R. E. (2020). Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. *Nature Communications*, *11*(1), 1870. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15735-6>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, *4*(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Rice, L. B., Bellais, S., Carias, L. L., Hutton-Thomas, R., Bonomo, R. A., Caspers, P., Page, M. G. P., & Gutmann, L. (2004). Impact of Specific *pbp5* Mutations on Expression of  $\beta$ -Lactam Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(8), 3028–3032. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3028-3032.2004>
- Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L. B., Rood, J., & Seppala, H. (1999). Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *43*(12), 2823–2830. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.12.2823>
- Rocha, C. P., Cabral, H. N., Marques, J. C., & Gonçalves, A. M. M. (2022). A Global Overview of Aquaculture Food Production with a Focus on the Activity's Development in Transitional Systems—The Case Study of a South European Country (Portugal). *Journal of Marine Science and Engineering*, *10*(3), 417. <https://doi.org/10.3390/jmse10030417>
- Rodriguez, I., Martin, M. C., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2006). Class 1 and class 2 integrons in non-prevalent serovars of *Salmonella enterica*: Structure and association with transposons and plasmids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*(6), 1124–1132. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl400>
- Romero, J., Gloria, C., & Navarrete, P. (2012). Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. Em E. Carvalho (Ed.), *Health and Environment in Aquaculture*. InTech. <https://doi.org/10.5772/28157>
- Rosso, F., Cedano, J. A., Parra-Lara, L. G., Sanz, A. M., Toala, A., Velez, J. F., Hormaza, M. P., Moncada, P. A., & Correa, A. (2019). Emerging carbapenem-resistant *Aeromonas* spp. Infections in Cali, Colombia. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *23*(5), 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2019.08.005>

- Rossolini, G. M., Walsh, T., & Amicosante, G. (1996). The *Aeromonas* Metallo- $\beta$ -Lactamases: Genetics, Enzymology, and Contribution to Drug Resistance. *Microbial Drug Resistance*, 2(2), 245–252. <https://doi.org/10.1089/mdr.1996.2.245>
- Rosvoll, T. C. S., Lindstad, B. L., Lunde, T. M., Hegstad, K., Aasnæs, B., Hammerum, A. M., Lester, C. H., Simonsen, G. S., Sundsfjord, A., & Pedersen, T. (2012). Increased high-level gentamicin resistance in invasive *Enterococcus faecium* is associated with *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* -encoding transferable megaplasmids hosted by major hospital-adapted lineages. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 66(2), 166–176. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00997.x>
- Rousham, E. K., Unicomb, L., & Islam, M. A. (2018). Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: Integrating behavioural, epidemiological and One Health approaches. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1876), 20180332. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0332>
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>
- Sáenz, Y., Vinué, L., Ruiz, E., Somalo, S., Martínez, S., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., & Torres, C. (2010). Class 1 integrons lacking *qacE $\Delta$ 1* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Veterinary Microbiology*, 144(3–4), 493–497. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.026>
- Saha, M., & Sarkar, A. (2021). Review on Multiple Facets of Drug Resistance: A Rising Challenge in the 21st Century. *Journal of Xenobiotics*, 11(4), 197–214. <https://doi.org/10.3390/jox11040013>
- Salgueiro, V., Manageiro, V., Bandarra, N. M., Reis, L., Ferreira, E., & Caniça, M. (2020). Bacterial Diversity and Antibiotic Susceptibility of *Sparus aurata* from Aquaculture. *Microorganisms*, 8(9), 1343. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091343>
- Sánchez Valenzuela, A., Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., Pérez Pulido, R., & Abriouel, H. (2013). Phenotypic and Molecular Antibiotic Resistance Profile of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Different Traditional Fermented Foods. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(2), 143–149. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1279>
- Santiago, G. S., da Motta, C. C., Bronzato, G. F., Gonçalves, D., de Souza, M. M. S., Coelho, I. da S., Ferreira, H. N., & Coelho, S. de M. de O. (2016). A Review: AmpC  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 38(Supl.3), 17–30. Retirado de <https://bjvm.org.br/BJVM/article/view/876>
- Santos, L., & Ramos, F. (2018). Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(2), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010>
- Sawa, T., Kooguchi, K., & Moriyama, K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*, 8(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>
- Scarano, C., Spanu, C., Ziino, G., Pedonese, F., Dalmasso, A., Spanu, V., Viridis, S., & De Santis, E. P. L. (2014). Antibiotic resistance of *Vibrio* species isolated from *Sparus aurata* reared in Italian mariculture. *The New Microbiologica*, 37(3), 329–337.

- Schuetz, A. N. (2020). Role of Bacterial and Fungal Epidemiological Cutoff Values for Antimicrobial Susceptibility Testing in the Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter*, 42(2), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2019.12.006>
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., & Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(5), 519–542. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>
- Shah, S. Q. A., Cabello, F. C., L'Abée-Lund, T. M., Tomova, A., Godfrey, H. P., Buschmann, A. H., & Sørum, H. (2014). Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites: Antimicrobial resistance and salmon aquaculture. *Environmental Microbiology*, 16(5), 1310–1320. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12421>
- Sharkey, L. K. R., Edwards, T. A., & O'Neill, A. J. (2016). ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection. *MBio*, 7(2), e01975-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01975-15>
- Shaw, W. V. (1975). Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. In *Methods in Enzymology* (Vol. 43, pp. 737–755). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(75\)43141-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(75)43141-X)
- Shen, Y., Lv, Z., Yang, L., Liu, D., Ou, Y., Xu, C., Liu, W., Yuan, D., Hao, Y., He, J., Li, X., Zhou, Y., Walsh, T. R., Shen, J., Xia, J., Ke, Y., & Wang, Y. (2019). Integrated aquaculture contributes to the transfer of mcr-1 between animals and humans via the aquaculture supply chain. *Environment International*, 130, 104708. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.056>
- Shen, Y., Zhang, R., Schwarz, S., Wu, C., Shen, J., Walsh, T. R., & Wang, Y. (2020). Farm animals and aquaculture: Significant reservoirs of mobile colistin resistance genes. *Environmental Microbiology*, 22(7), 2469–2484. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14961>
- Sifaoui, F., Arthur, M., Rice, L., & Gutmann, L. (2001). Role of Penicillin-Binding Protein 5 in Expression of Ampicillin Resistance and Peptidoglycan Structure in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9), 2594–2597. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.9.2594-2597.2001>
- Silva, A. A. da, Leite, J. N., Winter, H. C. L., Furtado, T. L. de J., Morais, N. M. L., Faria, R. A. P. G. de, Nascimento, E., Ritter, D. O., & Lanzarin, M. (2023). *Aeromonas* in freshwater fish and antimicrobial resistance: Emerging pathogen. *Ciência Rural*, 53(7), e20220088. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20220088>
- Silverio, M. P., Kraychete, G. B., Rosado, A. S., & Bonelli, R. R. (2022). *Pseudomonas fluorescens* Complex and Its Intrinsic, Adaptive, and Acquired Antimicrobial Resistance Mechanisms in Pristine and Human-Impacted Sites. *Antibiotics*, 11(8), 985. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11080985>
- Singh, K. V., Weinstock, G. M., & Murray, B. E. (2002). An *Enterococcus faecalis* ABC Homologue (Lsa) Is Required for the Resistance of This Species to Clindamycin and Quinupristin-Dalfopristin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1845–1850. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1845-1850.2002>
- Sirichoat, A., Flórez, A. B., Vázquez, L., Buppasiri, P., Panya, M., Lulitanond, V., & Mayo, B. (2020). Antibiotic Resistance-Susceptibility Profiles of *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus* spp. From the Human Vagina, and Genome Analysis of the Genetic Basis of Intrinsic and Acquired Resistances. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1438. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01438>

- Sousa, M., Torres, C., Barros, J., Somalo, S., Igrejas, G., & Poeta, P. (2011). Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) as Carriers of SHV-12 and TEM-52 Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Containing *Escherichia coli* Isolates. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(10), 1139–1141. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0866>
- Stock, I. (2003). Natural Antibiotic Susceptibility of *Proteus* spp., with Special Reference to *P. mirabilis* and *P. penneri* Strains. *Journal of Chemotherapy*, 15(1), 12–26. <https://doi.org/10.1179/joc.2003.15.1.12>
- Straus, S. K., & Hancock, R. E. W. (2006). Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(9), 1215–1223. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.009>
- Tao, L., & Biswas, I. (2013). ClpL Is Required for Folding of CtsR in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 195(3), 576–584. <https://doi.org/10.1128/JB.01743-12>
- Tavares-Dias, M., & Martins, M. L. (2017). An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(4), 913–918. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>
- Tchuinte, P. L. S., Rabenandrasana, M. A. N., Ramparany, L., Ratsima, E., Enouf, V., Randrianirina, F., & Collard, J.-M. (2020). Genome-based insights into the resistomes and mobilomes of two *Providencia rettgeri* strains isolated from wound infections in Madagascar. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.013>
- Udaondo, Z., & Huertas, M. J. (2020). Fighting the enemy: One health approach against microbial resistance. *Microbial Biotechnology*, 13(4), 888–891. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13587>
- Urshev, Z., & Yungareva, T. (2021). Initial safety evaluation of *Enterococcus faecium* LBB.E81. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 11–17. <https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1840438>
- Usui, M., Tagaki, C., Fukuda, A., Okubo, T., Boonla, C., Suzuki, S., Seki, K., Takada, H., & Tamura, Y. (2016). Use of *Aeromonas* spp. As General Indicators of Antimicrobial Susceptibility among Bacteria in Aquatic Environments in Thailand. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00710>
- van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., & Aarts, H. J. M. (2011). Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>
- van Overbeek, L. (2019). *Transmission of antibiotic resistance genes via mobile genetic elements* [Wageningen University and Research]. <https://edepot.wur.nl/508428>
- Vignesh, R., Karthikeyan, B. S., Periyasamy, N., & Devanathan, K. (2011). Antibiotics in Aquaculture: An Overview. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 1(3), 114–120. [https://doi.org/10.38150/sajeb.1\(3\).p114-120](https://doi.org/10.38150/sajeb.1(3).p114-120)
- Vogwill, T., & MacLean, R. C. (2015). The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: A meta-analysis approach. *Evolutionary Applications*, 8(3), 284–295. <https://doi.org/10.1111/eva.12202>
- Walsh, T. (1997). Distribution and expression of beta-lactamase genes among *Aeromonas* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40(2), 171–178. <https://doi.org/10.1093/jac/40.2.171>

- Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., Hooper, D. C., & Wang, M. (2009). New Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, *qnrC*, Found in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(5), 1892–1897. <https://doi.org/10.1128/AAC.01400-08>
- Watts, J., Schreier, H., Lanska, L., & Hale, M. (2017). The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions. *Marine Drugs*, *15*(6), 158. <https://doi.org/10.3390/md15060158>
- Weinstein, M. P. (2001). Comparative Evaluation of Penicillin, Ampicillin, and Imipenem MICs and Susceptibility Breakpoints for Vancomycin-Susceptible and Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(7), 2729–2731. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2729-2731.2001>
- World Health Organization. (2019). *Critically important antimicrobials for human medicine (6th rev.)*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312266>
- World Organization for Animal Health. (2021). *OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance*. Disponível em <https://www.woah.org/app/uploads/2021/06/a-oie-list-antimicrobials-june2021.pdf>. Acedido a 11 de Outubro de 2022
- Xu, H., Broersma, K., Miao, V., & Davies, J. (2011). Class 1 and class 2 integrons in multidrug-resistant gram-negative bacteria isolated from the Salmon River, British Columbia. *Canadian Journal of Microbiology*, *57*(6), 460–467. <https://doi.org/10.1139/w11-029>
- Yang, J., Wang, C., Shu, C., Liu, L., Geng, J., Hu, S., & Feng, J. (2013). Marine Sediment Bacteria Harbor Antibiotic Resistance Genes Highly Similar to Those Found in Human Pathogens. *Microbial Ecology*, *65*(4), 975–981. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0187-2>
- Zahedi Bialvaei, A., Rahbar, M., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., & Samadi Kafil, H. (2017). Linezolid: A promising option in the treatment of Gram-positives. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(2), 354–364. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw450>
- Zaheer, R., Cook, S. R., Barbieri, R., Goji, N., Cameron, A., Petkau, A., Polo, R. O., Tymensen, L., Stamm, C., Song, J., Hannon, S., Jones, T., Church, D., Booker, C. W., Amoako, K., Van Domselaar, G., Read, R. R., & McAllister, T. A. (2020). Surveillance of *Enterococcus* spp. Reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. *Scientific Reports*, *10*(1), 3937. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61002-5>
- Zhang, S., Sun, J., Liao, X.-P., Hu, Q.-J., Liu, B.-T., Fang, L.-X., Deng, H., Ma, J., Xiao, X., Zhu, H.-Q., & Liu, Y.-H. (2013). Prevalence and Plasmid Characterization of the *qnrD* Determinant in Enterobacteriaceae Isolated from Animals, Retail Meat Products, and Humans. *Microbial Drug Resistance*, *19*(4), 331–335. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0146>
- Zhang, X.-X., Zhang, T., & Fang, H. H. P. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *82*(3), 397–414. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1829-z>
- Zhou, N., Cheng, Z., Zhang, X., Lv, C., Guo, C., Liu, H., Dong, K., Zhang, Y., Liu, C., Chang, Y.-F., Chen, S., Guo, X., Zhou, X.-N., Li, M., & Zhu, Y. (2022). Global antimicrobial resistance: A system-wide comprehensive investigation using the Global One Health Index. *Infectious Diseases of Poverty*, *11*(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s40249-022-01016-5>
- Ziarati, M., Zorriehzahra, M. J., Hassantabar, F., Mehrabi, Z., Dhawan, M., Sharun, K., Emran, T. B., Dhama, K., Chaicumpa, W., & Shamsi, S. (2022). Zoonotic diseases of fish and their prevention and control. *Veterinary Quarterly*, *42*(1), 95–118. <https://doi.org/10.1080/01652176.2022.2080298>

## Anexos

Tabela suplementar 1. Programa de amplificação e primers utilizados na detecção dos genes *int11*, *int12* e *int13*, que codificam integrases.

Gene alvo	Primers	Sequência nucleotídica (5'- 3')	Concentração do primer	Temperatura de hibridação	Programa de amplificação	Produto amplificado	Referência bibliográfica				
<i>int11</i>	Primer Int11_F	GGTCAAGGATCTGGATTTCG	0,4 µM	60°C	Pré desnaturação: 94°C - 10 min Desnaturação: 94°C - 1 min Hibridação: 60°C - 1 min Extensão: 72°C - 2 min Extensão final: 72°C - 10 min } 32 ciclos	436 pb	(Machado et al., 2005), (Kargar et al., 2014)				
	Primer Int11_R	ACATGCGTGTAATCATCGTC				788 pb					
<i>int12</i>	Primer Int12_F	CACGGATATGCGACAAAAGG	0,4 µM	60°C		Pré desnaturação: 94°C - 10 min Desnaturação: 94°C - 1 min Hibridação: 60°C - 1 min Extensão: 72°C - 2 min Extensão final: 72°C - 10 min } 32 ciclos		788 pb	(Machado et al., 2005), (Kargar et al., 2014)		
	Primer Int12_R	TGTAGCAAACGAGTGACGAAATG						600 pb			
<i>int13</i>	Primer Int13_F	AGTGGGTGGCGAATGAGTG	0,4 µM	60°C				Pré desnaturação: 94°C - 10 min Desnaturação: 94°C - 1 min Hibridação: 60°C - 1 min Extensão: 72°C - 2 min Extensão final: 72°C - 10 min } 32 ciclos		600 pb	(Machado et al., 2005), (Kargar et al., 2014)
	Primer Int13_R	TGTTCTTGTATCGGCAGGTG									

Tabela suplementar 2. Programa de amplificação e primers utilizados na detecção dos genes de resistência à colistina mediados por plasmídeos *mcr-1-mcr-9*.

Gene alvo	Primers	Sequência nucleotídica (5'- 3')	Concentração do primer	Temperatura de hibridação	Programa de amplificação	Produto amplificado	Referência bibliográfica
<i>mcr-1</i>	Primer MCR1_F	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	0,2 µM	58°C	Pré desnaturação: 94°C - 10 min Desnaturação: 94°C - 30 s Hibridação: 58°C - 90 s Extensão: 72°C - 1 min Extensão final: 72°C - 10 min } 25 ciclos	320 pb	(Rebelo et al., 2018)
	Primer MCR1_R	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG					
<i>mcr-2</i>	Primer MCR2_F	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	0,2 µM	58°C			
	Primer MCR2_R	TCTAGCCCCGACAAGCATACC					
<i>mcr-3</i>	Primer MCR3_F	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	0,2 µM	58°C			
	Primer MCR3_R	AATGGAGATCCCCGTTTTT					
<i>mcr-4</i>	Primer MCR4_F	TCACTTTCATCACTGCGTTG	0,2 µM	58°C			
	Primer MCR4_R	TTGGTCCATGACTACCAATG					
<i>mcr-5</i>	Primer MCR5_F	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	0,2 µM	58°C			
	Primer MCR5_R	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG					
<i>mcr-6</i>	Primer MCR6_F	AGCTATGTCAATCCCCTGAT	0,2 µM	55°C	Pré desnaturação: 94°C - 10 min Desnaturação: 94°C - 30 s Hibridação: 55°C - 90 s Extensão: 72°C - 1 min Extensão final: 72°C - 10 min } 25 ciclos	252 pb	(Borowiak et al., 2020)
	Primer MCR6_R	ATTGGCTAGGTTGTCAATC					
<i>mcr-7</i>	Primer MCR7_F	GCCCTTCTTTTCGTTGTT	0,2 µM	55°C			
	Primer MCR7_R	GGTTGGTCTCTTTCTCGT					
<i>mcr-8</i>	Primer MCR8_F	TCAACAATTCTACAAAGCGTG	0,2 µM	55°C			
	Primer MCR8_R	AATGCTGCGGAATGAAG					
<i>mcr-9</i>	Primer MCR9_F	TTCCCTTTGTTCTGGTTG	0,2 µM	55°C			
	Primer MCR9_R	GCAGGTAATAAGTCGGTC					

Tabela suplementar 3. Programa de amplificação e primers utilizados na detecção dos genes *bla*<sub>TEM-Type</sub>, *bla*<sub>SHV-Type</sub>, *bla*<sub>OXA-Type</sub>, *bla*<sub>AAC-Type</sub>, *bla*<sub>FOX-Type</sub>, *bla*<sub>MOX-Type</sub>, *bla*<sub>DHA-Type</sub>, *bla*<sub>CIT-Type</sub> e *bla*<sub>AmpC</sub>.

Gene alvo	Primers	Sequência nucleotídica (5'- 3')	Concentração do primer	Temperatura de hibridação	Programa de amplificação	Produto amplificado	Referência bibliográfica
<i>bla</i> <sub>TEM-Type</sub>	Primer TEM_F	CATTTCCGTGTGCGCCCTTATTC	0,4 µM	60°C	Pré desnaturação: 95°C - 5 min Desnaturação: 95°C - 40 s Hibridação: 60°C - 1 min Extensão: 72°C - 1 min Extensão final: 72°C - 10 min 30 ciclos	800 pb	(Dallenne et al., 2010)
	Primer TEM_R	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC					
<i>bla</i> <sub>SHV-Type</sub>	Primer SHV_F	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	0,4 µM	60°C			
	Primer SHV_R	ATCCCGCAGATAAATCACCAC					
<i>bla</i> <sub>OXA-Type</sub>	Primer OXA_F	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	0,4 µM	60°C			
	Primer OXA_R	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG					
<i>bla</i> <sub>ACC-Type</sub>	MultiCaseACC_F	CACCTCCAGCGACTTGTTAC	0,2 µM	60°C			
	MultiCaseACC_R	GTTAGCCAGCATCACGATCC					
<i>bla</i> <sub>FOX-Type</sub>	MultiCaseFOX_F	CTACAGTGCGGGTGGTTT	0,5 µM	60°C			
	MultiCaseFOX_R	CTATTTGCGGCCAGGTGA					
<i>bla</i> <sub>MOX-Type e bla</sub> <sub>CMY-1, -8, -11 e -19</sub>	MultiCaseMOX_F	GCAACAACGACAATCCATCCT	0,2 µM	60°C			
	MultiCaseMOX_R	GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA					
<i>bla</i> <sub>DHA-Type</sub>	MultiCaseDHA_F	TGATGGCACAGCAGGATATTC	0,5 µM	60°C			
	MultiCaseDHA_R	GCTTTGACTCTTTCGGTATTTCG					
<i>bla</i> <sub>LAT-1 e -3, bla</sub> <sub>BIL-1, bla</sub> <sub>CMY-2 a -7, -12 a -18, e -21 a -23</sub>	MultiCaseCIT_F	CGAAGAGGCAATGACCAGAC	0,2 µM	60°C			
	MultiCaseCIT_R	ACGGACAGGGTTAGGATAGY*					

\*y=T ou C; R=A ou G; S=G ou C; D= A ou G ou T

Tabela suplementar 3. Programa de amplificação e primers utilizados na detecção dos genes *bla<sub>TEM</sub>-Type*, *bla<sub>SHV</sub>-Type*, *bla<sub>OXA</sub>-Type*, *bla<sub>AAC</sub>-Type*, *bla<sub>FOX</sub>-Type*, *bla<sub>MOX</sub>-Type*, *bla<sub>DHA</sub>-Type*, *bla<sub>CIT</sub>-Type* e *bla<sub>AmpC</sub>*.

Gene alvo	Primers	Sequência nucleotídica (5'- 3')	Concentração do primer	Temperatura de hibridação	Programa de amplificação	Produto amplificado	Referência bibliográfica
<i>bla<sub>ACT-1</sub></i> e <i>bla<sub>MIR-1</sub></i>	MultiCaseEBC_F	CGGTAAAGCCGATGTTGCG	0,2 µM	60°C	Pré desnaturação: 94°C - 10 min Desnaturação: 94°C - 40 s Hibridação: 60°C - 40 s Extensão: 72°C - 1 min Extensão final: 72°C - 7 min	683 pb	(Dallenne et al., 2010)
	MultiCaseEBC_R	AGCCTAACCCCTGATACA					
<i>bla<sub>AmpC</sub></i>	Primer Int-B2	TTCCTGATGATCGTTCTGCC	0,5 µM	57°C	Pré desnaturação: 94°C - 4 min Desnaturação: 94°C - 45 s Hibridação: 57°C - 30 s Extensão: 72°C - 90 s Extensão final: 72°C - 10 min	1315 pb	(Mammeri et al., 2008)
	Primer Int-HN	AAAAGCGGAGAAAAGGTCCG					

Tabela suplementar 4. Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) do isolado 5AQ, para os restantes antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C.

Antibiótico	<i>P. mirabilis</i> (n=1)		
	ECOFFs	Critérios clínicos	5AQ
<b>CAZ</b>			
Halo de inibição	ND	R≤17, S≥21	<b>44</b>
CIM	R>0,125, S≤0,125	NA	≤0,5
<b>IMP</b>			
Halo de inibição	ND	R≤19, S≥23	<b>32</b>
<b>ETP</b>			
Halo de inibição	ND	R≤19, S≥23	<b>38</b>
<b>MEM</b>			
Halo de inibição	R<24, S≥24	NA	<b>43</b>
CIM	R>0,125, S≤0,125	NA	<b>0,06</b>
<b>FOX</b>			
Halo de inibição	ND	R≤14, S≥18	<b>30</b>
<b>TGC</b>			
Halo de inibição	ND	ND	22
CIM	R>8, S≤8	NA	<b>4</b>
<b>APR</b>			
Halo de inibição	ND	ND	26
<b>CTX</b>			
Halo de inibição	ND	R≤22, S≥26	<b>35</b>
CIM	ND	R≥4, S≤1	≤0,25
<b>AKN</b>			
Halo de inibição	ND	R≤14, S≥17	<b>32</b>
<b>AMC</b>			
Halo de inibição	ND	R≤13, S≥18	<b>36</b>
<b>SAM</b>			
Halo de inibição	ND	R≤11, S≥15	<b>28</b>

Tabela suplementar 4. Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) do isolado 5AQ, para os restantes antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C.

Antibiótico	<i>P. mirabilis</i> (n=1)		
	ECOFFs	Critérios clínicos	5AQ
<b>OT</b>			
Halo de inibição	ND	ND	6
<b>MAR</b>			
Halo de inibição	ND	R≤14, S≥20	24
<b>TZP</b>			
Halo de inibição	ND	ND	40
<b>CFP</b>			
Halo de inibição	ND	R≤15, S≥21	36
<b>FTN</b>			
Halo de inibição	ND	R≤14, S≥17	13
<b>PRL</b>			
Halo de inibição	ND	R≤17, S≥21	40
<b>TIC</b>			
Halo de inibição	ND	ND	44
<b>AMP</b>			
CIM	R>8, S≤8	NA	2
<b>GEN</b>			
CIM	R>4, S≤4	NA	1
<b>TET</b>			
CIM	R>128, S≤128	NA	>64
<b>COL</b>			
CIM	ND	R≥4, S≤1	>16
<b>SMX</b>			
CIM	ND	ND	16

NA – Não aplicável. ND – Não definido. AKN – Amicacina; AMC - Amoxicilina-ácido clavulânico; AMP – Ampicilina; APR - Apramicina; CAZ – Ceftazidima; CFP – Cefoperazone; CHL – Cloranfenicol; CIP – Ciprofloxacina; COL – Colistina; CTX – Cefotaxima; ETP – Ertapenem; FEP – Cefepime; CAZ/C - Ceftazidima/Ácido clavulânico; CTX/C - Cefotaxima/Ácido clavulânico; FOX – Cefoxitina, FTN – Nitrofurantoina; GEN – Gentamicina; IMP – Imipenem, MAR – Marbofloxacina; MEM – Meropenem; OT – Oxitetraciclina; PRL – Piperacilina; SAM - Ampicilina-Sulbactam; SMX – Sulfametoxazole; TET – Tetraciclina, TGC – Tigeciclina; TIC – Ticarcilina; TMP – Trimetoprim; TRM – Temocilina; TZP - Piperacilina-Trimetoprim. A vermelho estão destacados os valores de halo de inibição e CIM que indicam que existe uma suscetibilidade reduzida ao antibiótico, a laranja os que produzem um fenótipo de suscetibilidade com exposição aumentada (I) e a verde os valores que indicam suscetibilidade ao antibiótico. A preto estão representados os valores cujo fenótipo não é possível caracterizar pela falta de critérios disponíveis.

Tabela suplementar 5. Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) do isolado 6AQ, para os restantes antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C.

Antibiótico	<i>A. sobria</i> (n=1)		
	ECOFFs	Critérios clínicos	6AQ
<b>AZM</b>			
Halo de inibição	ND	ND	28
CIM	ND	ND	≤2
<b>CHL</b>			
Halo de inibição	ND	R≤12, S≥18	37
CIM	ND	R≥32, S≤8	≤8
<b>CIP</b>			
Halo de inibição	ND	R≤15, S≥21	34
CIM	ND	R≥4, S≤1	0,03
<b>CAZ</b>			
Halo de inibição	ND	R≤14, S≥18	28
CIM	ND	R≥32, S≤8	2
<b>ETP</b>			
Halo de inibição	ND	R≤15, S≥19	34
CIM	ND	R≥8, S≤2	0,06
<b>MEM</b>			
Halo de inibição	ND	R≤13, S≥16	34
CIM	ND	R≥16, S≤4	0,25
<b>TGC</b>			
Halo de inibição	ND	ND	30
CIM	ND	ND	≤0,25
<b>APR</b>			
Halo de inibição	ND	ND	17
<b>CTX</b>			
Halo de inibição	ND	R≤14, S≥23	34
CIM	ND	R≥32, S≤8	≤0,25
<b>AKN</b>			
Halo de inibição	ND	R≤14, S≥17	24

Tabela suplementar 5. Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) do isolado 6AQ, para os restantes antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C.

Antibiótico	<i>A. sobria</i> (n=1)		
	ECOFFs	Critérios clínicos	6AQ
<b>AMC</b>			
Halo de inibição	ND	R $\leq$ 13, S $\geq$ 18	19
<b>OT</b>			
Halo de inibição	ND	ND	40
<b>MAR</b>			
Halo de inibição	ND	ND	36
<b>TZP</b>			
Halo de inibição	ND	ND	32
<b>CFP</b>			
Halo de inibição	ND	ND	30
<b>FTN</b>			
Halo de inibição	ND	ND	32
<b>PRL</b>			
Halo de inibição	ND	ND	30
<b>TIC</b>			
Halo de inibição	ND	ND	24
<b>GEN</b>			
CIM	ND	R $\geq$ 16, S $\leq$ 4	1
<b>FEP</b>			
CIM	ND	R $\geq$ 32, S $\leq$ 8	1
<b>TET</b>			
CIM	ND	R $\geq$ 16, S $\leq$ 4	$\leq$ 2
<b>NAL</b>			
CIM	ND	ND	$\leq$ 4

Tabela suplementar 5. Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) do isolado 6AQ, para os restantes antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C.

Antibiótico	<i>A. sobria</i> (n=1)		
	ECOFFs	Critérios clínicos	6AQ
<b>COL</b>			
CIM	ND	ND	2
<b>TMP</b>			
CIM	ND	ND	0,5
<b>SMX</b>			
CIM	ND	ND	≤8
<b>TRM</b>			
CIM	ND	ND	16
<b>CTX/C</b>			
CIM	ND	ND	≤0,06
<b>CAZ/C</b>			
CIM	ND	ND	1

ND – Não definido. AKN – Amicacina; AMC - Amoxicilina-ácido clavulânico; APR - Apramicina; AZM - Azitromicina; CAZ – Ceftazidima; CFP – Cefoperazone; CHL – Cloranfenicol; CIP – Ciprofloxacina; COL – Colistina; CTX – Cefotaxima; ETP – Ertapenem; FEP – Cefepime; CAZ/C - Ceftazidima/Ácido clavulânico; CTX/C - Cefotaxima/Ácido clavulânico; FTN – Nitrofurantoina; GEN – Gentamicina; MAR – Marbofloxacina; MEM – Meropenem; NAL - Ácido nalidíxico; OT – Oxitetraciclina; PRL – Piperacilina; SMX – Sulfametoxazole; TGC – Tigeciclina; TIC – Ticarcilina; TMP – Trimetoprim; TRM – Temocilina; TZP - Piperacilina-Trimetoprim. A vermelho estão destacados os valores de halo de inibição e CIM que indicam que existe uma suscetibilidade reduzida ao antibiótico, a laranja os que produzem um fenótipo de suscetibilidade com exposição aumentada (I) e a verde os valores que indicam suscetibilidade ao antibiótico. A preto estão representados os valores cujo fenótipo não é possível caracterizar pela falta de critérios disponíveis.

Tabela suplementar 6. Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) dos isolados 2AQ, 10AQ, 8AQ, 9AQ, 11AQ, 12AQ, 13AQ, para os restantes antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C

Antibiótico	ECOFFs	Critérios clínicos	<i>V. parahaemolyticus</i> (n=2)		<i>V. alginolyticus</i> (n=2)		<i>V. vulnificus</i> (n=3)		
			2AQ	10AQ	8AQ	9AQ	11AQ	12AQ	13AQ
<b>AZM</b>									
Halo de inibição	ND	ND	27	27	24	26	26	26	28
CIM	ND	ND	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
<b>CHL</b>									
Halo de inibição	ND	R≤12, S≥18	37	34	38	34	40	36	38
CIM	ND	R≥32, S≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8
<b>CIP</b>									
Halo de inibição	ND	R≤15, S≥21	30	28	30	26	30	29	28
CIM	ND	R≥4, S≤1	0,12	0,12	0,25	0,5	0,5	0,5	0,25
<b>CAZ</b>									
Halo de inibição	ND	R≤14, S≥18	30	31	30	30	32	34	34
CIM	ND	R≥32, S≤8	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5
<b>CTX</b>									
Halo de inibição	ND	R≤14, S≥23	40	38	24	34	36	37	36
CIM	ND	R≥64, S≤8	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
<b>FOX</b>									
Halo de inibição	ND	R≤14, S≥18	24	25	20	20	24	22	26
CIM	ND	R≥32, S≤8	8	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>ETP</b>									
Halo de inibição	ND	ND	38	36	40	38	38	38	38
CIM	ND	ND	≤0,015	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>MEM</b>									
Halo de inibição	ND	R≤13, S≥16	40	36	40	38	38	38	42
CIM	ND	R≥16, S≤4	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03
<b>IMP</b>									
Halo de inibição	ND	R≤13, S≥16	32	34	38	38	36	37	38
CIM	ND	R≥16, S≤4	≤0,12	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Tabela suplementar 6. Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) dos isolados 2AQ, 10AQ, 8AQ, 9AQ, 11AQ, 12AQ, 13AQ, para os restantes antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C

Antibiótico	ECOFFs	Critérios clínicos	<i>V. parahaemolyticus</i> (n=2)		<i>V. alginolyticus</i> (n=2)		<i>V. vulnificus</i> (n=3)		
			2AQ	10AQ	8AQ	9AQ	11AQ	12AQ	13AQ
<b>TGC</b>									
Halo de inibição	ND	ND	27	26	26	28	30	26	28
CIM	ND	ND	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
<b>APR</b>									
Halo de inibição	ND	ND	18	17	19	20	16	18	20
<b>AKN</b>									
Halo de inibição	ND	R≤14, S≥17	21	18	22	23	22	23	22
<b>AMC</b>									
Halo de inibição	ND	R≤13, S≥18	28	27	26	28	24	26	26
<b>OT</b>									
Halo de inibição	ND	ND	32	36	36	34	30	30	34
<b>MAR</b>									
Halo de inibição	ND	ND	28	31	30	32	40	33	34
<b>TZP</b>									
Halo de inibição	ND	R≤17, S≥21	38	36	40	38	34	36	38
<b>CFP</b>									
Halo de inibição	ND	R≤14, S≥18	30	30	32	28	26	32	28
<b>FTN</b>									
Halo de inibição	ND	ND	30	26	30	28	26	28	28
<b>PRL</b>									
Halo de inibição	ND	R≤17, S≥21	31	26	28	28	26	28	26
<b>TIC</b>									
Halo de inibição	ND	ND	32	19	12	12	12	10	6
<b>COL</b>									
CIM	ND	ND	8	16	16	2	4	4	4
<b>FEP</b>									
CIM	ND	ND	0,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>GEN</b>									
CIM	ND	R≥16, S≤4	2	2	1	2	2	1	2

Tabela suplementar 6. Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) dos isolados 2AQ, 10AQ, 8AQ, 9AQ, 11AQ, 12AQ, 13AQ, para os restantes antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C

Antibiótico	ECOFFs	Critérios clínicos	<i>V. parahaemolyticus</i> (n=2)		<i>V. alginolyticus</i> (n=2)		<i>V. vulnificus</i> (n=3)		
			2AQ	10AQ	8AQ	9AQ	11AQ	12AQ	13AQ
<b>TET</b>	ND	R $\geq$ 16, S $\leq$ 4							
CIM			$\leq$ 2	$\leq$ 2	$\leq$ 2	$\leq$ 2	$\leq$ 2	$\leq$ 2	$\leq$ 2
<b>NAL</b>	ND	ND							
CIM			$\leq$ 4	$\leq$ 4	$\leq$ 4	$\leq$ 4	$\leq$ 4	$\leq$ 4	$\leq$ 4
<b>SMX</b>	ND	ND							
CIM			16	16	$\leq$ 8	$\leq$ 8	16	$\leq$ 8	16
<b>TMP</b>	ND	ND							
CIM			4	2	4	2	2	4	2
<b>TRM</b>	ND	ND							
CIM			$\leq$ 0,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>CTX/C</b>	ND	ND							
CIM			$\leq$ 0,06	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>CAZ/C</b>	ND	ND							
CIM			$\leq$ 0,12	NA	NA	NA	NA	NA	NA

ND – Não definido. AKN – Amicacina; AMC - Amoxicilina-ácido clavulânico; APR - Apramicina; CAZ – Ceftazidima; CAZ/C - Ceftazidima/Ácido clavulânico; CTX/C - Cefotaxima/Ácido clavulânico CFP – Cefoperazone; CHL – Cloranfenicol; CIP – Ciprofloxacina; COL – Colistina; CTX – Cefotaxima; ETP – Ertapenem; FEP – Cefepime;; FOX – Cefoxitina, FTN – Nitrofurantoina; GEN – Gentamicina; IMP – Imipenem, MAR – Marbofloxacina; MEM – Meropenem; OT – Oxitetraciclina; PRL – Piperacilina; SAM - Ampicilina-Sulbactam; SMX – Sulfametoxazole; TET – Tetraciclina, TGC – Tigeciclina; TIC – Ticarcilina; TMP – Trimetoprim; TRM – Temocilina; TZP - Piperacilina-Trimetoprim. A vermelho estão destacados os valores de halo de inibição e CIM que indicam que existe uma suscetibilidade reduzida ao antibiótico, a laranja os que produzem um fenótipo de suscetibilidade com exposição aumentada (I) e a verde os valores que indicam suscetibilidade ao antibiótico. A preto estão representados os valores cujo fenótipo não é possível caracterizar pela falta de critérios disponíveis.

Tabela suplementar 7. Halos de inibição (mm) dos isolados 23AQ, 25AQ, 27AQ, 29AQ e 31AQ resultantes dos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C.

Antibiótico	ECOFFs	Critérios clínicos	<i>P. fluorescens</i> (n=5)					
			23AQ	25AQ	27AQ	29AQ	31AQ	
<b>AKN</b>								
Halo de inibição	ND	ND	33	35	34	32	33	
<b>AMC</b>								
Halo de inibição	ND	ND	20	30	29	29	28	
<b>APR</b>								
Halo de inibição	ND	ND	29	30	29	29	28	
<b>AZM</b>								
Halo de inibição	ND	ND	34	31	31	32	30	
<b>CAZ</b>								
Halo de inibição	ND	R≤14, S≥18	35	34	34	36	32	
<b>CHL</b>								
Halo de inibição	ND	ND	35	33	36	36	37	
<b>CIP</b>								
Halo de inibição	ND	R≤18, S≥25	35	36	35	38	36	
<b>CTX</b>								
Halo de inibição	ND	R≤14, S≥17	34	37	35	35	34	
<b>ETP</b>								
Halo de inibição	ND	ND	42	39	40	36	36	
<b>IPM</b>								
Halo de inibição	ND	R≤15, S≥19	42	40	42	40	40	
<b>MAR</b>								
Halo de inibição	ND	ND	39	37	35	39	36	
<b>MEM</b>								
Halo de inibição	ND	R≤15, S≥19	41	42	40	42	42	
<b>OT</b>								
Halo de inibição	ND	ND	30	32	33	31	32	
<b>PRL</b>								
Halo de inibição	ND	R≤17, S≥22	33	32	34	33	32	
<b>SAM</b>								
Halo de inibição	ND	ND	32	36	38	36	36	
<b>TGC</b>								
Halo de inibição	ND	ND	28	28	28	28	27	
<b>TZP</b>								
Halo de inibição	ND	ND	34	33	33	35	32	

Tabela suplementar 7. Halos de inibição (mm) dos isolados 23AQ, 25AQ, 27AQ, 29AQ e 31AQ resultantes dos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C.

Antibiótico	ECOFFs	Critérios clínicos	<i>P. fluorescens</i> (n=5)				
			23AQ	25AQ	27AQ	29AQ	31AQ
<b>CFP</b>							
Halo de inibição	ND	ND	24	20	24	24	22
<b>FOX</b>							
Halo de inibição	ND	ND	38	37	35	36	34
<b>FTN</b>							
Halo de inibição	ND	ND	21	22	23	22	22
<b>TIC</b>							
Halo de inibição	ND	ND	38	41	38	42	39

ND – Não definido. AKN – Amicacina; AMC - Amoxicilina-ácido clavulânico; APR - Apramicina; CAZ – Ceftazidima; CFP – Cefoperazone; CHL – Cloranfenicol; CIP – Ciprofloxacina; CTX – Cefotaxima; ETP – Ertapenem; FOX – Cefoxitina, FTN – Nitrofurantoina; IMP – Imipenem, MAR – Marbofloxacina; MEM – Meropenem; OT – Oxitetraciclina; PRL – Piperacilina; SAM - Ampicilina-Sulbactam; TGC – Tigeciclina; TIC – Ticarcilina; TMP – Trimetoprim; TZP - Piperacilina-Trimetoprim. A vermelho estão destacados os valores de halo de inibição e CIM que indicam que existe uma suscetibilidade reduzida ao antibiótico, a laranja os que produzem um fenótipo de suscetibilidade com exposição aumentada (I) e a verde os valores que indicam suscetibilidade ao antibiótico. A preto estão representados os valores cujo fenótipo não é possível caracterizar pela falta de critérios disponíveis.

Tabela suplementar 8. Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) dos isolados 1AQ, 3AQ, 4AQ, 33AQ, 34AQ, para os restantes antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C e 37°C.

Antibiótico	<i>E. faecium</i> (n=3)								<i>E. faecalis</i> (n=1)				<i>E. hirae</i> (n=1)			
	ECOFFs	Critérios Clínicos	1AQ		4AQ		33AQ		ECOFFs	Critérios Clínicos	3AQ		ECOFFs	Critérios Clínicos	34AQ	
			28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C			28°C	37°C			28°C	37°C
<b>CHL</b>																
Halo de inibição	ND	R≤12, S≥18	35	29	35	28	36	29	ND	R≤12, S≥18	32	27	ND	R≤12, S≥18	35	28
CIM	R>32, S≤32	NA	≤4	8	≤4	8	≤4	8	R>32, S≤32	NA	≤4	8	ND	R≥32, S≤8	≤4	8
<b>AMC</b>																
Halo de inibição	ND	ND	29	32	29	33	31	30	ND	ND	36	31	ND	ND	31	31
<b>CTX</b>																
Halo de inibição	ND	ND	6	6	6	6	6	6	ND	ND	6	6	ND	ND	6	6
<b>CAZ</b>																
Halo de inibição	ND	ND	6	6	6	6	6	6	ND	ND	6	6	ND	ND	6	6
<b>SAM</b>																
Halo de inibição	ND	ND	20	26	22	26	24	24	ND	ND	31	25	ND	ND	25	26
<b>IMP</b>																
Halo de inibição	R<21, S≥21	NA	20	19	19	19	20	20	R<19, S≥19	NA	33	28	ND	ND	24	23
<b>ETP</b>																
Halo de inibição	ND	ND	6	6	6	6	6	6	ND	ND	18	14	ND	ND	9	7
<b>MEM</b>																
Halo de inibição	ND	ND	9	11	8	14	9	9	ND	ND	23	20	ND	ND	11	14
<b>DAP</b>																
CIM	R>8, S≤8	NA	1	4	1	4	4	8	R>4, S≤4	NA	0,5	1	ND	ND	2	2
<b>LNZ</b>																
CIM	R>4, S≤4	NA	1	2	1	2	1	2	R>4, S≤4	NA	1	2	ND	R≥8, S≤2	1	2
<b>GEN</b>																
CIM	R>32, S≤32	NA	16	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	R>64, S≤64	NA	16	≤8	R>32, S≤32	NA	16	16
<b>TEC</b>																
Halo de inibição	R<15, S≥15	NA	22	19	20	22	23	19	R<15, S≥15	NA	22	19	ND	R≤10, S≥14	24	22
CIM	R>2, S≤2	NA	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	R>2, S≤2	NA	≤0,5	≤0,5	ND	R≥32, S≤8	≤0,5	≤0,5

Tabela suplementar 8. Halos de inibição (mm) e CIMs (mg/L) dos isolados 1AQ, 3AQ, 4AQ, 33AQ, 34AQ, para os restantes antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade a antibióticos realizados a 28°C e 37°C.

Antibiótico	<i>E. faecium</i> (n=3)								<i>E. faecalis</i> (n=1)				<i>E. hirae</i> (n=1)			
	ECOFFs	Critérios Clínicos	1AQ		4AQ		33AQ		ECOFFs	Critérios Clínicos	3AQ		ECOFFs	Critérios Clínicos	34AQ	
			28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C			28°C	37°C			28°C	37°C
<b>TGC</b>																
Halo de inibição	ND	ND	27	27	30	27	30	29	R<17, S≥17	NA	30	26	ND	ND	27	27
CIM	R>0,25, S≤0,25	NA	0,12	0,12	0,06	0,12	0,12	0,12	R>0,25, S≤0,25	NA	0,12	0,25	ND	ND	0,12	≤0,03
<b>VAN</b>																
Halo de inibição	ND	R≤14, S≥17	29	25	28	25	30	25	ND	R≤14, S≥17	25	21	ND	R≤14, S≥17	28	25
CIM	R>4, S≤4	NA	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	R>4, S≤4	NA	≤1	2	ND	R≥32, S≤4	≤1	≤1
<b>MAR</b>																
Halo de inibição	ND	ND	21	20	18	24	21	16	ND	ND	25	21	ND	ND	26	24
<b>PRL</b>																
Halo de inibição	ND	ND	19	26	23	24	23	24	ND	ND	31	28	ND	ND	20	24
<b>TZP</b>																
Halo de inibição	ND	ND	19	27	20	24	23	24	ND	ND	32	28	ND	ND	21	24

NA – Não aplicável. ND – Não definido. AMC - Amoxicilina-ácido clavulânico; CAZ – Ceftazidima; CHL – Cloranfenicol; CTX – Cefotaxima; DAP – Daptomicina; ETP – Ertapenem; GEN – Gentamicina; IMP – Imipenem; LZD – Linezolida; MAR – Marbofloxacina; MEM – Meropenem; PRL – Piperacilina; SAM - Ampicilina-Sulbactam; TGC – Tigeciclina; TEC – Teicoplanina; TZP - Piperacilina-Trimetoprim; VAN – Vancomicina. A vermelho estão destacados os valores de halo de inibição e CIM que indicam que existe uma suscetibilidade reduzida ao antibiótico, a laranja os que produzem um fenótipo de suscetibilidade com exposição aumentada (I) e a verde os valores que indicam suscetibilidade ao antibiótico. A preto estão representados os valores cujo fenótipo não é possível caracterizar pela falta de critérios disponíveis.