



FACULDADE DE
MEDICINA
FUNDADA EM 1963

Mestrado em Biociências

Dissertação de Mestrado

Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana e Detecção dos Mecanismos de Resistências aos Antibióticos beta-lactâmicos em bactérias Gram-negativas isoladas em amostras de animais e humanos na Cidade de Maputo entre Abril e Junho de 2023

Nome da Estudante: Ivete Benício Samuel

Maputo, aos 16 de Dezembro de 2024



FACULDADE DE
MEDICINA
FUNDADA EM 1963

Mestrado em Biociências

Dissertação de Mestrado

Perfil de Susceptibilidade Antimicrobiana e Detecção dos Mecanismos de Resistências aos Antibióticos beta-lactâmicos em bactérias Gram-negativas isoladas em mostras de animais e humanos na Cidade de Maputo entre Abril e Junho de 2023

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências (com orientação em Microbiologia) pela Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane

Nome da Estudante:

Ivete Benício Samuel

Supervisor:

José Sumbana, BSc., MSc., PhD.

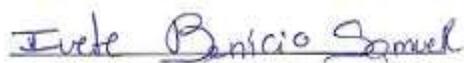
Co-Supervisor:

Aquino Nhantumbo, BSc., MSc.

Maputo, 16 de Dezembro de 2024

Declaração de originalidade do projecto

Eu, Ivete Benício Samuel, declaro por minha honra que esta dissertação nunca foi apresentada para a obtenção do grau ou num outro âmbito e que constitui o resultado do meu labor individual e guia dos meus orientadores. Esta dissertação é apresentada em cumprimento parcial dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biociências, da Universidade Eduardo Mondlane.



(Ivete Benício Samuel)

Maputo, 16 de Dezembro de 2024

Dedicatória

Ao meu filho Daniel, por ser a força motriz para que eu pudesse realizar este sonho com muita garra e dedicação.

Agradecimentos

Sou grata a Deus pelo dom da vida, por guiar-me em busca das minhas realizações e por ajudar-me a superar os obstáculos da vida.

Aos meus pais maravilhosos que tanto amo, Benício Samuel e Inês Filomena Guilima por tudo que tem feito por mim. Por nunca desistirem de mim e apoiarem-me incondicionalmente.

Aos meus irmãos, sou bastante grata, pelos conselhos, motivações e força que sempre deram para que eu continuasse a batalhar em busca dos meus anseios.

Ao meu filho Daniel, sou bastante grata por me ter tornado num ser melhor, desafiando-me a buscar estratégias diárias para conciliar a maternidade com a vida estudantil e profissional.

Ao Nelson Macamo, o meu profundo agradecimento pelo apoio e suporte durante esta jornada.

A minha imensa gratidão à Direcção Científica pela bolsa de estudos através do programa UEM-Suécia (ASDI) 2017-2024. A bolsa de estudos permitiu a realização do estudo, trabalho de campo, laboratorial e do presente relatório de dissertação.

Os meus sinceros agradecimentos ao Dr. Alfeu Passanduca, pela oportunidade de realizar o trabalho de pesquisa no Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina.

Agradeço bastante aos meus supervisores, Prof. Doutor José Sumbana e MSc. Aquino Nhantumbo por me terem orientado e ajudado a realizar este trabalho. Ao Professor José Sumbana que se disponibilizou a acompanhar-me durante todo o trabalho laboratorial e a fornecer o material fundamental para a pesquisa, obrigada pela paciência e merecidos puxões de orelha.

À dr^a Camélia do Laboratório de Microbiologia do Hospital Central de Maputo, o meu agradecimento pela permissão dada para a colheita das amostras. Ao inspector Miranda do Matadouro e a Senhora Maria (Esmeralda) do Mercado Fajardo, agradeço o apoio e suporte na colheita de amostras.

Aos dr. Samuel Simbine e dr. Ventura Relvas, o meu muito obrigado pelos ensinamentos e apoio no trabalho de bancada. Ao Senhor Tiago, Vitorino e Bernardo pelo apoio na disponibilização do material de Laboratório, obrigada. E ao Mestre Nashon Majaliwa pelo apoio na revisão da dissertação.

Agradeço as colegas do Departamento de Microbiologia, Marcília, Agar, Marília, Esménia, Tivânia e Yara que me ajudaram durante o processamento laboratorial.

Lista de Abreviaturas, acrónimos e siglas

API	Índice de Perfil Analítico
AmpC	β -lactamases mediados por plasmídeos
BGN	Bactérias Gram-negativas
CBM	Concentração bactericida mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração mínima inibitória
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DNA	Ácido desoxirribunocléico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
ESAC	β -lactamases mediados por plasmídeos de amplo espectro
ESBL	β -lactamase de amplo espectro
ICS	Infecção da corrente sanguínea
LDM-FAMED	Laboratório do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina
LM-HCM	Hospital Central de Maputo- Laboratório de Microbiologia
MBLs	Metallo- β -lactamases
MDR-BGN	Bactérias Gram-negativas Multi-droga resistentes
MGE	Elementos genéticos móveis
Pb	Pares de base
PBPs	<i>Penicilin Binding Proteins</i>
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reacção em Cadeia de Polimerase
Rpm	Rotações por minute
TSA	Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana
μ L	Microlitro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VF	Factor de Virulência
XDR	Droga Extensivamente Resistente

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismos de resistência antimicrobiana.	10
Figura 2. Métodos de teste de susceptibilidade antimicrobiana.	19
Figura 3. Uso de antibióticos e a disseminação das resistências em animais, humanos e meio ambiente.	21
Figura 4. Fluxograma da metodologia para elaboração do trabalho.	24
Figura 5. Mapa de Moçambique com destaque dos locais de colheita das amostras.	26
Figura 6. Electroforese em gel de agarose 1% em TAE para detecção do gene <i>uidA</i> (623pb). ...	35
Figura 7. Electroforese em gel de agarose 1% em TAE para a detecção do gene <i>PaLif</i> (504pb)..	35
.....	35
Figura 8. Electroforese em gel de agarose 1% em TAE para a detecção dos genes de resistência (<i>bla_{TEM}</i> e <i>bla_{SHV}</i>).	35
Figura 9. Electroforese em gel de agarose 1% em TAE para a detecção do gene de resistência (<i>bla_{CTX-M}</i>).	36
Figura 10. Frequência das idades dos pacientes com infecção invasiva de acordo com a idade, provenientes do Hospital Central de Maputo.	39
Figura 11. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>E. coli</i> isolados em amostras de carne de gado bovino provenientes do Matadouro, cidade de Maputo.	42
Figura 12. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>E. coli</i> isolados em amostras de carcaça de frango provenientes do mercado Fajardo, cidade de Maputo.	43
Figura 13. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>E. coli</i> isolados em amostras de fezes de frango provenientes do mercado Fajardo, cidade de Maputo.	44
Figura 14. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>K. pneumoniae</i> isolados em placas de hemocultura colhidas no Laboratório de Microbiologia do Hospital Central de Maputo.	45
Figura 15. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>K. pneumoniae</i> isolados em amostras de carne de gado bovino provenientes do Matadouro, cidade de Maputo.	46
Figura 16. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>K. pneumoniae</i> isolados em amostras de carcaça de frango provenientes do mercado Fajardo, cidade de Maputo.	47
Figura 17. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>K. pneumoniae</i> isolados em amostras de fezes de frango provenientes do mercado Fajardo, cidade de Maputo.	48
Figura 18. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>P. aeruginosa</i> isolados em amostras de carne de gado bovino provenientes do Matadouro, cidade de Maputo.	49
Figura 19. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>P. aeruginosa</i> isolados em amostras de carcaça de frango provenientes do mercado Fajardo, cidade de Maputo.	49
Figura 20. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>P. aeruginosa</i> isolados em amostras de fezes de frango provenientes do mercado Fajardo, cidade de Maputo.	50

Lista de Tabelas

Tabela 1. Meios de cultura usados para o isolamento das espécies bacterianas.....	25
Tabela 2. Classes e antibióticos seleccionados para o estudo.....	25
Tabela 3. Reagentes usados para a caracterização molecular.....	25
Tabela 4. Mastermix para a PCR do gene <i>uidA</i> (623 pb) de <i>E. coli</i>	30
Tabela 5. Condições de PCR do gene <i>uidA</i>	31
Tabela 6. Mastermix para PCR do gene <i>PaLif</i> (504 pb) de <i>P. aeruginosa</i>	31
Tabela 7. Condições de PCR do gene <i>PaLif</i>	32
Tabela 8. Mastermix para PCR dos genes de resistência, <i>bla_{SHV}</i> (214 pb), <i>bla_{TEM}</i> (431 pb) e <i>bla_{CTX-M}</i> (593 pb).....	33
Tabela 9. Sequência dos primers para Multiplex PCR dos genes <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> e <i>bla_{CTX-M}</i> em <i>Enterobacteriaceae</i>	33
Tabela 10. Condições de PCR para a detecção dos genes de resistência, <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> e <i>bla_{CTX-M}</i>	34
Tabela 11. Variáveis do estudo de resistência antimicrobiana em amostras de fontes humanas e animais.....	36
Tabela 12. Frequência de proveniência das amostras de hemocultura no Hospital Central de Maputo.....	40
Tabela 13. Frequência de espécies de bactérias Gram-negativas provenientes de amostras de fonte humana e animal.....	41
Tabela 14. Perfil de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e detecção dos determinantes <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{TEM}</i> e <i>bla_{SHV}</i> em <i>E. coli</i> provenientes de amostras de origem humana e animal.....	52
Tabela 15. Frequência dos determinantes de resistência antibióticos β -lactâmicos em <i>K. pneumoniae</i> provenientes de amostras de origem humana e animal.....	54
Tabela 16. Comparação do perfil de resistência antimicrobiana em isolados provenientes de amostras de origem humana e animal.....	55

Resumo

Introdução: As bactérias Gram-negativas resistentes aos agentes antimicrobianos estão comumente associadas a infecções invasivas, constituindo um problema de saúde pública com maior peso nos países de baixa e média renda como Moçambique. A resistência antimicrobiana pode ser transmitida através de várias fontes incluindo humanos, animais e ambiente, havendo necessidade de pesquisas no contexto de saúde única.

Objectivo: O presente estudo teve como objectivo caracterizar o perfil de susceptibilidade e os determinantes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas isoladas de fontes animais e humana na cidade de Maputo de Abril a Junho de 2023.

Metodologia: Trata-se de um estudo transversal descritivo e prospectivo realizado entre Abril e Junho de 2023, através da colheita de isolados em placas de hemocultura obtidos de pacientes com suspeita de sepsis provenientes do Laboratório de Microbiologia do Hospital Central de Maputo e amostras de animais (carne bovina, carcaça e fezes de frango) abatidos e vendidos no Matadouro e Mercado Fajardo na cidade de Maputo. A identificação preliminar de bactérias Gram-negativas foi feita através de meios de cultura (ágar MacConkey, Cetrimida, Citrato de Simmons, *Hicrome Klebsiella*, *Coliform Selective*, caldo Luria Bertani e ágar Mueller-Hinton) e testes bioquímicos (teste de oxidase e API 20E), seguida do teste de susceptibilidade antimicrobiana que incluiu 15 antibióticos de diferentes classes usando o método de disco-difusão de Kirby-bauer. Posteriormente, fez-se a confirmação molecular dos genes *uidA* (623pb) para *E. coli* e gene *PaLif* (504pb) para *P. aeruginosa*, através da Reacção em Cadeia de Polimerase, incluindo a detecção dos determinantes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, *bla*_{CTX-M} (593pb), *bla*_{TEM} (431pb) e *bla*_{SHV} (214pb).

Resultados: No presente estudo, incluiu-se um total de 184 amostras, sendo 22 placas de hemocultura, 54 amostras de carne bovina, 54 amostras de carcaça de frangos, 29 amostras de fezes de frango e 25 isolados foram caracterizadas como outras BGN. Os pacientes com suspeita de sepsis causadas por bactérias Gram-negativas admitidos no Hospital Central de Maputo, eram predominantemente, do sexo feminino (63%), com idade superior a 18 anos, seguidos de neonatos, provenientes dos Departamentos de Medicina e Pediatria. As espécies de *E. coli* (33,7%), *K. pneumoniae* (28,8) e *P. aeruginosa* (23,9%) foram comuns em amostras de fontes humanas e

animais. Contudo, os isolados de ambas as fontes apresentaram altas frequências de resistência aos antibióticos usados como 1ª linha para o tratamento de infecções variando de 79% a 100%, principalmente em humanos (cefalosporinas, penicilinas, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas e tetraciclina) e a sensibilidade foi observada para os antibióticos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) variando de 73,3% a 100%. A coexistência dos genes de resistência *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM} foi detectada principalmente em isolados de *E. coli* e *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} em isolados de *K. pneumoniae* neste estudo.

Conclusão: As espécies de bactérias Gram-negativas, principalmente, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* isolados de placas de hemocultura, carne de gado bovino e frangos apresentaram altas frequências de resistência aos antibióticos da primeira linha para o tratamento de infecções humanas contendo mecanismos de resistência aos β-lactâmicos de amplo espectro (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}). Há necessidade de gestão e uso adequado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária, e vigilância contínua de resistência antimicrobiana através da caracterização fenotípica e molecular dos isolados no contexto de saúde única.

Palavras-chave: Bactérias Gram-negativas, perfil de susceptibilidade, genes de resistência, antibióticos β-lactâmicos, fontes humanas e animais, cidade de Maputo.

Abstract

Introduction: Gram-negative bacteria isolates resistant to antimicrobials agents are commonly associated with invasive infections and are a major public health concern with high burden in low- and middle-income countries such as Mozambique. Antimicrobial resistance can be transmitted through various sources, including humans, animals and environment, and there is a need for research in the context of One Health.

Objectives: This study aimed to characterise the susceptibility profile and resistance determinants to β -lactam antibiotics in Gram-negative bacteria isolates from animal and human sources in Maputo City from April to June 2023.

Methodology: This is a descriptive and prospective transversal study conducted between April and June 2023, through the collection of isolates in blood culture plates from patients with suspicion of sepsis from Hospital Central of Maputo and animal samples (beef, chicken carcass and feces) slaughtered and sold in Slaughterhouse and Fajardo Market in Maputo city. The preliminary identification of Gram-negative bacteria was conducted using culture medium (MacConkey agar, Cetrimide, Simmons Citrate, Hicrome *Klebsiella*, Coliform Selective, Luria Bertani broth and Mueller-Hinton agar) and biochemical tests (oxidase test and API 20E), followed by an antimicrobial susceptibility test that included 15 antibiotics of different classes through the Kirby-Bauer disc diffusion method. Subsequently, molecular confirmation of the *uidA* genes (623pb) for *E. coli* and the *PaLif* gene (504pb) for *P. aeruginosa* was accomplished using the Polymerase Chain Reaction, including the detection of the following β -lactam antimicrobial resistance determinants, *bla*_{CTX-M} (593pb), *bla*_{TEM} (431pb) and *bla*_{SHV} (214pb).

Results: In this study, a total of 184 samples (humans and animals), of which 22 were blood culture plates, 54 were beef samples, 54 were chicken carcass samples, 29 were chicken feces samples and 25 isolates were characterized as other BGN. The patients with suspected sepsis caused by Gram-negative bacteria admitted to Hospital Central of Maputo were mostly female (63%), aged over 18, followed by neonates and from the Department of Medicine and Paediatric. The species of *E. coli* (33,7%), *K. pneumoniae* (28,8%) and *P. aeruginosa* (23,9%) were common in human and animal sources. However, the isolates from both sources showed high frequency rate of resistance to antibiotics used as first-line for the treatment of infections ranging from 79% to 100%,

mainly in humans (cephalosporins, penicillins, fluoroquinolones, aminoglycosides, sulphonamides and tetracyclines) and the sensitivity was observed to the carbapenem antibiotics (imipenem, meropenem and ertapenem) ranging from 73,3% to 100%. The coexistence of resistance genes *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM} are the main resistance mechanisms for *E. coli* isolates, and the *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} genes for *K. pneumoniae* isolates in this study.

Conclusion: Gram-negative bacterial species, mainly *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* isolated in the present study from human infections, beef and poultry were resistant to first-line antibiotics for the treatment of human infections containing resistance mechanisms to broad-spectrum β -lactams (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV}). There is the need of appropriate antimicrobials use and management in human and veterinary medicine, and continuous surveillance of antimicrobial resistance through the phenotypic and molecular characterisation of isolates in a one health context.

Keywords: Gram-negative bacteria, susceptibility profile, resistance genes, β -lactam antibiotics, human and animal sources, Maputo city.

Índice

Declaração de originalidade do projecto.....	i
Dedicatória.....	ii
Agradecimentos	iii
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas	vi
Resumo	vii
Abstract.....	ix
1. Motivação	1
2. Objectivos.....	2
3. Contribuição	3
4. Problema.....	3
5. Questão de pesquisa.....	5
6. Revisão bibliográfica.....	6
6.1. Características gerais de bactérias Gram-negativas	6
6.2. Espécies de bactérias Gram-negativas com importância clínica.....	6
6.2.1. <i>Escherichia coli</i>	7
6.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
6.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
6.3. Mecanismos de resistência antimicrobiana	9
6.3.1. Alteração da permeabilidade.....	10
6.3.2. Alteração do sítio de acção	11

6.3.3.	Bomba de efluxo	11
6.3.4.	Mecanismo enzimático	12
6.3.5.	Resistência antimicrobiana de bactérias Gram-negativas aos β -lactâmicos	13
6.3.	Determinantes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos	13
6.4.1.	β -lactamases de amplo espectro (ESBL).....	13
6.4.2.	β -lactamases mediados por plasmídeos (AmpC).....	14
6.4.3.	Carbapenamases.....	16
6.5.	Testes de susceptibilidade antimicrobiana	17
7.	Enquadramento teórico.....	20
8.	Metodologia.....	24
8.1.	Reagentes	25
8.2.	Tipo/desenho de estudo	26
8.3.	Local do estudo	26
8.4.	Período do estudo	27
8.5.	População do estudo.....	27
8.6.	Critérios de Inclusão e Exclusão	27
8.7.	Modo de selecção de amostra e amostragem	27
8.8.1.	Colheita das amostras	28
8.8.2.	Identificação bioquímica e molecular de espécies de bactérias Gram-negativas provenientes de placas de hemocultura, gado bovino, carcaça e fezes de frangos.....	28
8.8.2.1.	Identificação bioquímica	28
8.8.2.2.	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	29
8.8.2.3.	Identificação molecular de <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
8.8.2.3.1.	Extracção do DNA.....	30
8.8.2.3.2.	Identificação molecular de <i>Escherichia coli</i>	30

8.8.2.3.3. Identificação molecular de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
8.8.2.4. Caracterização molecular dos determinantes de resistência aos antibióticos β - lactâmicos em bactérias Gram-negativas.....	32
8.8.2.5. Electroforese em Gel e Visualização de amplicons.....	34
8.8. Variáveis.....	36
8.9. Plano de gestão e Análise de dados.....	37
9. Considerações Éticas	37
10. Resultados.....	39
10.1. Dados demográficos de pacientes com infecção invasiva provenientes do Hospital Central de Maputo.....	39
10.2. Frequências de bactérias Gram-negativas identificadas em amostras de origem humana e animal.....	40
10.3. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas em amostras de origem humana e animal	41
10.3.1. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de <i>Escherichia coli</i>	41
10.3.2. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	44
10.3.3. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
10.4. Detecção dos genes de resistência <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{SHV} em isolados de <i>Escherichia</i> <i>coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> obtidos de amostras de origem humana e animal	50
10.4.1. Frequência dos genes de resistência <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{SHV} em isolados de <i>Escherichia coli</i>	50
10.4.2. Frequência dos genes de resistência <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{SHV} em <i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	53
10.5. Comparação do perfil de susceptibilidade aos antibióticos em isolados provenientes de fontes humanas e animais.....	55
11. Discussão.....	57

11.1. Espécies de bactérias Gram-negativas isoladas em amostras de origem humana e animal.....	57
11.2. Perfil de susceptibilidade aos antibióticos de bactérias Gram-negativas de origem humana.....	60
11.3. Perfil de susceptibilidade aos antibióticos de bactérias Gram-negativas de origem animal.....	62
11.4. Perfil de susceptibilidade aos antibióticos β -lactâmicos e os respectivos mecanismos de resistência detectados em amostras de origem humana e animal.....	64
12. Conclusão	67
13. Limitações	68
14. Recomendações	69
15. Referências bibliográficas	70
16. Apêndice: Fichas de colheita de amostras de hemocultura, gado bovino e frangos	81
17. Anexos:.....	83

1. Motivação

Nas minhas práticas laboratoriais tenho observado um aumento de agentes microbianos, incluindo bactérias resistentes aos antimicrobianos comumente utilizados em Moçambique, sobretudo em bactérias Gram-negativas. Adicionalmente, a literatura disponível nos últimos anos tem mostrado a tendência de aumento de prevalência de resistências no mundo. Actualmente a resistência antimicrobiana está entre as 10 maiores ameaças mundiais à saúde pública, e se o problema de resistências não for bem gerido, 4,1 milhões de pessoas poderão morrer em África devido as infecções multi-droga resistentes até 2050 (OMS, 2021). O maior peso das infecções bacterianas multi-droga resistentes, regista-se em países de baixa e média renda, contudo, em Moçambique há escassês de informação sobre a resistência antimicrobiana em animais, principalmente. Desta forma, tive a motivação de desenvolver este projecto sobre resistências aos antimicrobianos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas isoladas em amostras de animais e humanos na Cidade de Maputo para compreender o perfil fenotípico e os respectivos mecanismos de resistência antimicrobiana para a orientação do tratamento e controlo de infecções.

2. Objectivos

a) Geral

Caracterizar o perfil de susceptibilidade e os determinantes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas isoladas em amostras de animais e humanos na Cidade de Maputo de Abril a Junho de 2023.

b) Específicos

- Descrever as características demográficas de pacientes com suspeita de sepses causadas por bactérias Gram-negativas;
- Identificar as espécies bacterianas Gram-negativas em pacientes com suspeita de sepses, no Hospital Central de Maputo;
- Identificar as espécies bacterianas isolados de amostras de carne de gado bovino, carcaça e fezes de frango provenientes do Matadouro e Mercado Fajardo da cidade de Maputo;
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos em isolados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- Identificar os mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}) em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*;
- Comparar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos em isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* provenientes de fontes humanas e animais (carne de gado bovino, carcaça e fezes de frangos).

3. Contribuição

A resistência aos antimicrobianos é considerada um problema de saúde pública. Com o presente estudo, pretende-se caracterizar o perfil de resistência de bactérias Gram-negativas provenientes de fontes animais e humanas (abordagem de saúde única) para contribuir na orientação da terapia antimicrobiana e controlo das infecções invasivas no Hospital Central de Maputo. Adicionalmente, o perfil fenotípico e molecular dos isolados de bactérias Gram-negativas obtidas de amostras de carne de gado bovino, frango e das fezes de frango será importante para o conhecimento dos antibióticos que apresentam elevadas taxas de sensibilidade e resistências. Estes dados são fundamentais para a orientação e monitorização do uso de antibióticos na veterinária, principalmente como promotores de crescimento, profilaxia e tratamento de doenças em Moçambique. As autoridades de saúde humana e animal em Moçambique com base neste estudo terão dados para a orientação da gestão antimicrobiana considerando a abordagem de saúde única.

4. Problema

As infecções bacterianas multi-droga resistentes constituem um problema de Saúde Pública devido a sua associação com elevadas taxas de morbilidade e mortalidade, prolongamento de doenças e elevados custos de tratamento. Por outro lado, esses patógenos podem disseminar-se entre alimentos, animais, Homem e ambiente, havendo necessidade de contínua vigilância para o controlo de infecções (Guenther *et al.*, 2011; Subramanian *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2016; Bush, 2018).

A maioria das classes de antimicrobianos usados em humanos são também prescritas para animais (peixes cultivados em sistemas de aquicultura, abelhas e animais de criação), incluindo classes de antimicrobianos vitais para a medicina humana, como β -lactâmicos de amplo espectro e fluoroquinolonas, utilizados principalmente para fins terapêuticos, profiláticos e promotores de desenvolvimento. O uso indiscriminado dos antimicrobianos na saúde humana e veterinária aumenta a pressão selectiva da resistência antimicrobiana e sua disseminação (Meza *et al.*, 2022). Estima-se que o volume de antimicrobianos utilizados em animais em todo o mundo seja maior do que em humanos (Meza *et al.*, 2022), mostrando a necessidade de estudos de resistência antimicrobiana que incluam as fontes animais.

Estudos de vigilância de resistência antimicrobiana considerando a abordagem de saúde única ainda são escassos em Moçambique. Todavia, um estudo realizado por Matsimbe *et al.* (2021), examinou a susceptibilidade de 24 isolados de uma espécie de bactéria Gram-negativa, *Campylobacter* spp. provenientes de carcaças de frangos de carne comercializadas em supermercados, mercados informais e num matadouro em Maputo, Moçambique, tendo testado 13 antibióticos e constataram a resistência dos isolados a pelo menos seis antibióticos em quatro classes.

Adicionalmente, estudos de resistência incluindo a caracterização fenotípica e molecular de frangos congelados importados e produzidos em Moçambique, de Faife *et al.* (2020), mostrou que em 198 amostras colhidas, 27 (13,6%) isolados foram positivos para β -lactamase de amplo espectro (ESBL), 15 de esfregaços de carcaça e 12 do descongelamento líquido de 22 frangos com 19, 5 e 3 isolados de frangos sul-africanos, moçambicanos e brasileiros, respectivamente. E os isolados apresentaram a seguinte resistência: ampicilina 100%, ceftriaxona 89%, trimetoprim-sulfametoxazol 78%, cefotaxima 74%, ciprofloxacina 70%, ceftazidima 67%, cefoxitina 22% e gentamicina 8%. O gene ESBL predominante foi o *bla*_{SHV} (85%), seguido do *bla*_{CTX-M} (62,9%) e *bla*_{TEM} (44,4%), enquanto *bla*_{MOX} e *bla*_{DHA} foram os genes pAmpC mais comuns, com 33,3%. O gene de resistência às fluoroquinolonas mediado por plasmídeo predominante foi o *qepA* (22,2%) (Faife *et al.*, 2020). Este estudo concluiu que a população moçambicana está exposta a um reservatório de genes de resistência a β -lactâmicos e fluoroquinolonas mediados por plasmídeos e, por conseguinte, a genes móveis, através de aves de capoeira importadas e, em menor grau, produzidas localmente, evidenciando a necessidade de contínua vigilância de resistências em fontes animais (Faife *et al.*, 2020).

Um estudo realizado por Mahaluça *et al.* (2019) no Hospital Central de Maputo, observou que no Departamento de Pediatria, as *Enterobacteriaceae* foram responsáveis por 37,8% (48/127) de todas as infecções, com maior frequência de *Klebsiella pneumoniae* (43%), e nos adultos, as *Enterobacteriaceae* representaram 51,9% (27/52) de todas as infecções, sendo as principais causas bacterianas as Gram-negativas: *Klebsiella* spp. (26%), *Escherichia coli* (22%) e *Klebsiella oxytoca* (19%).

Apesar da existência de alguns estudos, regista-se ainda uma fraca vigilância de infecções bacterianas incluindo a resistência antimicrobiana, apesar destas bactérias Gram-negativas multi-

droga resistentes (MDR) estarem a ser cada vez mais relatadas em muitas regiões do mundo, inclusive em Moçambique, como causadoras de infecções invasivas, como infecção do trato urinário, pneumonia, sepses e meningite (Sigaúque *et al.*, 2009; Sumbana, 2019). De forma alarmante, as *Klebsiella* spp. surgiram em todo o mundo como agentes patogénicos multi-droga resistentes, devido a uma escala excessiva de utilização e utilização incorrecta de antibióticos, o que potencia o desenvolvimento e a propagação de genes de resistência antimicrobiana e de estirpes MDR (Sumbana *et al.*, 2023). As infecções causadas por estas estirpes, particularmente as que produzem β -lactamases de amplo espectro que conferem resistência às cefalosporinas e aos monobactâmicos de terceira geração, e/ou carbapenemases que resultam em resistência a todos os β -lactâmicos, incluindo os carbapenémicos, apresentam desafios significativos em termos de tratamento, pois estas infecções podem conduzir a doenças graves ou mesmo à morte, especialmente em indivíduos com sistemas imunitários enfraquecidos, representando uma preocupação significativa em termos de saúde pública mundial e estão entre as principais causas de infecções hospitalares (Sumbana *et al.*, 2023).

Por outro lado, a falta de actualização de algoritmos do tratamento de infecções bacterianas favorece o uso indiscriminado de antibióticos, e por conseguinte emergência e disseminação de resistências (Nhatave *et al.*, 2019). Por este motivo, as bactérias resistentes aos antimicrobianos têm sido reportadas na cidade de Maputo em isolados clínicos, indivíduos saudáveis e alimentos, o que evidencia a necessidade duma vigilância considerando diversas fontes (animal, humana e ambiental) (Chirindze *et al.*, 2018; Nhatave *et al.*, 2019; Faife *et al.*, 2020; Salamandane *et al.*, 2021; Santona *et al.*, 2022).

5. Questão de pesquisa

Estudos de vigilância de resistência antimicrobiana considerando abordagem de saúde única são escassos em Moçambique, dificultando a tomada de decisão sobre a gestão de antimicrobianos nas medicina humana e animal. Deste modo, o presente estudo pretende responder a seguinte questão científica:

Qual é o perfil de susceptibilidade e quais são os mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos de bactérias Gram-negativas isoladas de fontes animais (carne bovina, carcaça e fezes de frango) e placas de hemocultura na cidade de Maputo entre Abril e Junho de 2023?

6. Revisão bibliográfica

6.1. Características gerais de bactérias Gram-negativas

As espécies da família *Enterobacteriaceae* são um grupo heterogêneo de gamaproteobactérias, em forma de bastonete recto e não esporulado, podem ser móveis ou não (por meio de flagelos peritríquios), aeróbias ou anaeróbias facultativas, oxidase-negativos, catalase-positivos, redutores de nitrato a nitrito e fermentadores de glicose (Pires, 2011; Oliveira *et al.*, 2015; López *et al.*, 2019; Oliveira & Reygaert, 2021).

Os microorganismos da família *Enterobacteriaceae*, estão amplamente distribuídos na natureza, e podem ser encontrados em solo, água, vegetais, e muitas de suas espécies vivem no intestino de humanos e animais, incluindo insectos, onde podem causar doenças entéricas ou permanecer como microorganismos comensais (Faria Júnior, 2014; López *et al.*, 2019). No entanto, nem todos os gêneros ou espécies desta família são patogênicas, apenas um pequeno grupo de espécies são considerados patógenos estritos (López *et al.*, 2019).

6.2. Espécies de bactérias Gram-negativas com importância clínica

Os microorganismos têm grande importância clínica, pois colocam em risco os doentes, sobretudo aqueles que se encontram na unidade de terapia intensiva (UTI) (Oliveira e Reygaert, 2022). As espécies da família *Enterobacteriaceae* incluindo *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter* spp., *Yersinia* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. têm sido isolados em casos clínicos (Oliveira & Reygaert, 2021; Tilahun *et al.*, 2021). Estes agentes são comumente associados a infecções humanas e podem ser isolados de uma grande variedade de amostras biológicas, e são considerados maiores causadores de infecções hospitalares. Eles representam cerca de 80% dos isolados Gram-negativos que causam infecções do trato urinário, pneumonia, diarreia, meningite, sepse, choque endotóxico e muitos outros em humanos (Pires, 2011; Faria Júnior, 2014; Oliveira & Reygaert, 2021).

Os bacilos Gram-negativos não fermentadores têm uma frequência de isolamento menor quando comparados com as *Enterobacteriaceae*, no entanto, são um grupo relevante, uma vez que causam infecções graves e fatais, especialmente no ambiente hospitalar e também causam doenças oportunistas em pacientes em UTIs submetidos a procedimentos invasivos (Oliveira & Reygaert,

2021). Os principais microorganismos não fermentadores que causam doenças humanas são *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Stenotrophomonas* spp., *Alcaligenes* spp. e *Moraxella* spp.

As espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Yersinia enterocolitica*) incluindo as bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes* e *Bacillus anthracis*) são importantes agentes patogénicos transmitidos através do consumo de carne aos humanos na transmissão global de doenças zoonóticas e na segurança alimentar, sendo significativa para a saúde pública (Abebe *et al.*, 2020), entretanto, este estudo, focou-se apenas em três espécies bacterianas, nomeadamente: *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*.

6.2.1. *Escherichia coli*

É um patógeno facultativo pertencente ao microbioma intestinal normal de humanos e animais homeotérmicos (Köhler & Dobrindt, 2011; Sarowska *et al.*, 2019), constituindo um potencial reservatório para esses agentes patogénicos (Oliveira *et al.*, 2015; Lavagnoli *et al.*, 2017).

É um agente disseminado no ambiente, que pode ser encontrado particularmente nas fezes, sobretudo onde os cuidados de higiene e limpeza são ineficientes (Ferjania *et al.*, 2015). Contudo, existem algumas estirpes que são extremamente virulentas e capazes de causar doenças graves ao portador, como infecções do trato urinário, diarreia, problemas respiratórios e outras doenças associadas ao consumo de alimentos ou água contaminados com fezes (Ferjania *et al.*, 2015; Bajpai *et al.*, 2019).

Há relatos de estirpes de *E. coli* que colonizam o trato intestinal de frangos, carcaça e vísceras, as quais são transmitidas aos humanos através da alimentação, do contacto ou por contaminação cruzada nas linhas de processamento (Lerma *et al.*, 2013; Ferjania *et al.*, 2015). Ela faz parte da microbiota entérica de aves e é o mais importante indicador de contaminação fecal, embora possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais (Brito & Coelho, 2021). Os genes ESBL *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* têm sido identificados em *E. coli* em vários países (WHO, 2021).

6.2.2. *Klebsiella pneumoniae*

São bacilos imóveis, não esporulados e envolvidos por cápsulas polissacarídicas, nas quais estão presentes diferentes antígenos que permitem a diferenciação do gênero em 77 sorotipos (Cabral, 2011; Sousa *et al.*, 2019).

Existem pelo menos quatro espécies no gênero *Klebsiella*, que são *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena* e *K. planticola* (Al-Hassan *et al.*, 2023). A *K. pneumoniae* e a *K. oxytoca* são os dois agentes patogênicos humanos mais significativos em termos de gravidade e frequência da doença, todavia, a *K. oxytoca* tem sido isolada com uma frequência significativamente maior, embora partilhe uma relação próxima com a *K. pneumoniae*, pode ser distinguida desta por ser indol-positiva, e tem sido a espécie mais comum associada a infecções clínicas em pessoas (Al-Hassan *et al.*, 2023).

É um patógeno oportunista e constitui o segundo patógeno Gram-negativo mais comum depois de *E. coli* associado a um amplo espectro de infecções, como infecção do trato urinário, pneumonia, infecção intra-abdominal, infecção da corrente sanguínea (ICS) e meningite (Siu *et al.*, 2012). Além disso, também foi identificado como agente causador de outras infecções menos comuns, porém graves, como abscesso hepático e síndrome invasiva (Siu *et al.*, 2012), artrite séptica ou pustulose generalizada (Huang *et al.*, 2013).

As espécies do gênero *Klebsiella* resistentes aos antimicrobianos constituem uma causa importante de infecções nosocomiais e infecções invasivas adquiridas na comunidade (Wyres *et al.*, 2019). Espécies de *Klebsiella* tem causado surtos mundiais em humanos, especialmente devido aos genes *bla_{KPC}* e *bla_{CTX-M}* ESBL que têm sido reportados no mundo (Bialek-Davenet *et al.*, 2014). Estirpes de *K. pneumoniae* principalmente o produtor de *bla_{CTX-M-15}* e portador de todos os tipos de genes de carbapenemases: *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}* também já foram reportados como um problema de saúde pública (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

6.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

É uma bactéria Gram-negativa omnipresente pertencente à família *Pseudomonadaceae* e é um grande patógeno oportunista, responsável por infecções nosocomiais, principal causa de morbidade e mortalidade em indivíduos imunoprometidos e pacientes com fibrose cística que

aumentam a importância médica e veterinária (Silby *et al.*, 2011). Adicionalmente, é responsável por mais de 5% das exacerbações infecciosas em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e tem sido associada ao aumento de mortalidade desses pacientes (Murphy, 2009).

As *Pseudomonas* spp. tem um valor significativo na carne e no leite devido à sua capacidade de produzir várias enzimas lipolíticas e proteolíticas e de desenvolver um biofilme que afecta a qualidade dos alimentos, pois é um agente patogénico oportunista associado à deterioração da carne e reduz o prazo de validade da carne e dos produtos à base de carne (Jawher e Hassan, 2023).

P. aeruginosa pode ser cultivada a partir de tecidos normais de animais saudáveis, incluindo o trato alimentar, uretra, cavidade nasal, boca, amígdalas, vias aéreas superiores e conjuntiva (Silverstein & Hopper, 2009). Exsudatos purulentos com odor de uva são característicos, e é o epítome de um patógeno oportunista e raramente está envolvido na doença primária (Silverstein & Hopper, 2009).

P. aeruginosa é geralmente resistente a antibióticos devido às seguintes características: abrigar alta resistência intrínseca aos antibióticos devido à baixa permeabilidade de sua parede celular, a extraordinária capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência, a capacidade de expressar um amplo repertório de mecanismos de resistência e mutação em genes cromossómicos que regulam genes de resistência (Silverstein & Hopper, 2009). Alguns isolados de *P. aeruginosa*, tem a presença de ESBLs típicos da família *Enterobacteriaceae*, identificados como TEM, SHV e CTX-M (Bae *et al.*, 2014; Potron *et al.*, 2015).

6.3. Mecanismos de resistência antimicrobiana

Os mecanismos de resistência têm sido identificados e descritos para todos os antimicrobianos conhecidos e disponíveis para o uso humano e veterinário (Tortora *et al.*, 2016).

O mecanismo de resistência está relacionada com a penetração dos antibióticos β -lactâmicos na célula bacteriana, pois, ela está directamente relacionada com a parede celular, sendo que nas bactérias Gram-negativas, a parede celular apresenta-se mais estratificada, sendo constituída por camadas de lipopolissacarídeos e fosfolípidos, onde se inserem poros constituídos por proteínas (as porinas) sob as quais se encontra a camada de peptidoglicano, onde entre esta camada e a

membrana citoplasmática confina-se o espaço periplásmico, e é no folheto externo da membrana citoplasmática que se localizam as PBPs (*Penicilin Binding Proteins*) (Dias, 2009).

A resistência antimicrobiana está intimamente relacionada à sobrevivência dos microorganismos e os principais mecanismos de resistência bacteriana são: redução da incorporação do antibiótico por diminuição da permeabilidade e/ou por efluxo activo da droga, a alteração do alvo de acção do antibiótico e a síntese de enzimas com capacidade de degradar o antibiótico tal como ilustrado na figura 1 (Dias, 2016).

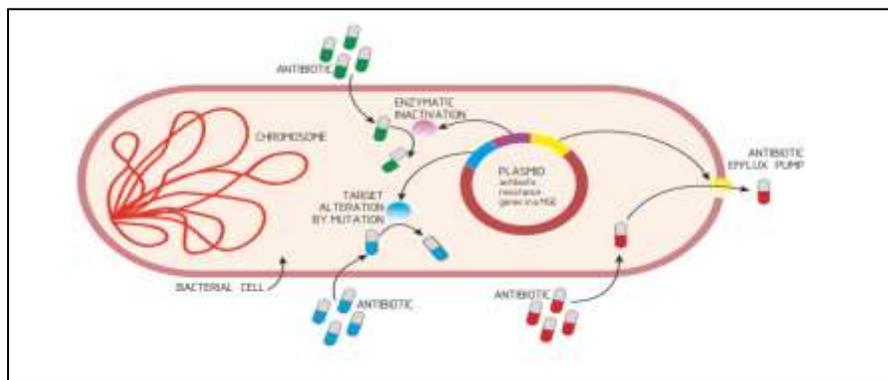


Figura 1. Mecanismos de resistência antimicrobiana.

Fonte: Levy & Marshall, (2004).

6.3.1. Alteração da permeabilidade

A permeabilidade da membrana celular externa, constituída de lipopolissacarídeo, é uma propriedade de bactérias Gram-negativas, que são intrinsecamente mais impermeáveis a muitos antibióticos por possuírem uma membrana externa, e a permeabilidade dessa membrana consiste na presença de proteínas transmembranares, como as porinas, que formam canais específicos para a entrada de aminoácidos na célula bacteriana (Blair *et al.*, 2015; Tortora *et al.*, 2016).

As alterações de porinas podem ocorrer de três formas: uma alteração no tipo de porina expressa, uma mudança na expressão de porinas e na sua função (Silva *et al.*, 2020). É por este canal das porinas que as substâncias podem passar para o espaço periplasmático e chegar ao interior da célula, assim as drogas conseguem atingir seu receptor na parede celular e exercer sua acção bactericida (Tortora *et al.*, 2016).

6.3.2. Alteração do sítio de acção

Este mecanismo impede a ocorrência de qualquer efeito bacteriostático ou bactericida devido à falta de ligação ou interação fármaco-receptor (Tortora *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2022).

A alteração do sítio de acção ocorre em inúmeras bactérias e para um grande número de antibióticos (Tortora *et al.*, 2016). A aquisição de resistência pode envolver a transferência de genes de resistência de outros microorganismos por alguma forma genética (conjugação, transdução ou transformação) (Tortora *et al.*, 2016). A alteração sítio de acção destes antibióticos podem ocorrer devido às mutações pontuais nos genes que codificam para a proteína alvo e pela substituição ou desvio do alvo original (Munita *et al.*, 2016).

As mutações pontuais podem originar uma diminuição da afinidade destas enzimas para com a molécula de antibiótico e, conseqüentemente, a diminuição da eficácia destes antibióticos (Silva, 2017). Enquanto que, a substituição do alvo consiste na capacidade da bactéria desenvolver novos alvos dos antibióticos que realizam as mesmas funções que o alvo original, mas que não são inibidas pelas moléculas de antibiótico (Blair *et al.*, 2014).

6.3.3. Bomba de efluxo

É transportador de membrana encontrado em todas as bactérias que desempenham funções como manutenção das concentrações de soluto intracelular, eliminação de subprodutos tóxicos do metabolismo ou transporte de aminoácidos e nucleotídeos, além da resistência aos antimicrobianos (Silva *et al.*, 2020).

As bombas de efluxo são proteínas transportadoras codificadas por genes localizados em cromossomas ou em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, e alguns desses genes são expressos constitutivamente, e outros podem ser induzidos ou super-expressos dependendo de factores ambientais ou da presença de substrato específico (Blair, 2014; Reygaert, 2018). A resistência ocorre geralmente, devido a mutações que modificam o canal de transporte (Blair, 2014; Reygaert, 2018).

O envelope das BGN tem três camadas principais: a membrana externa, a membrana interna e a parede celular de peptidoglicano no espaço periplasmático entre duas membranas, e todos os transportadores de drogas são localizados na membrana interna (Silva *et al.*, 2020).

Através do bombeamento activo das drogas, as bactérias diminuem a concentração de antimicrobianos no interior da célula, do meio intracelular para o extracelular e a bactéria passa a produzir proteínas de membrana que funcionam como uma bomba, por exemplo, para as tetraciclina, bombeando activamente a tetraciclina para fora da bactéria (Tortora *et al.*, 2016).

Existem dois subtipos de sistemas de bombeamento, um sistema que bombeia especificamente tetraciclina e, outro, o “*multi-drug-pump*” que bombeia de forma inespecífica várias drogas (Dias, 2018). Estes mecanismos têm amplo espectro, porque expulsam substratos como antimicrobianos, antissépticos e desinfectantes, que desempenham um papel importante na resistência intrínseca e adquirida de vários microorganismos Gram-negativos, deste modo, algumas bombas de efluxo actuam sobre drogas específicas (bombas de resistência específica a antimicrobianos), enquanto outras são activas contra várias drogas (bombas de resistência múltipla a antimicrobianos) (Dias, 2018).

6.3.4. Mecanismo enzimático

É o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos antibióticos β -lactâmicos, pois as enzimas designadas β -lactamases hidrolisam a ligação amida do anel β -lactâmico destruindo o local onde os antimicrobianos β -lactâmicos ligam-se à Proteína de Ligação da penicilina (PBS) bacterianas causando o efeito antibacteriano (Munita *et al.*, 2016; Silva, 2017).

Existem três tipos principais de enzimas inactivadoras de drogas: hidrolase (principalmente β -lactamase), enzima de passivação (enzima de inactivação de aminoglicosídeos, cloranfenicol acetil-transferase e eritromicina esterase) e enzima modificada (enzima modificadora de aminoglicosídeos) (Zhu *et al.*, 2022). As enzimas codificadas pelos genes cromossómicos e plasmidiais podem direccionar e clivar as ligações químicas vulneráveis hidroliticamente susceptíveis em drogas (Zhu *et al.*, 2022).

Os genes enzimáticos de maior preocupação clínica abrigam amidases que cortam o anel β -lactâmico das classes de drogas de penicilina e cefalosporina, incluindo *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CMY}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX}, *bla*_{DHA}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA} e outros (Zhu *et al.*, 2022).

6.3.5. Resistência antimicrobiana de bactérias Gram-negativas aos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos possuem enzimas capazes de hidrolisar antimicrobianos de diferentes classes (4 classes de A a D), e de acordo com as diferenças em seus mecanismos catalíticos, podem ser classificados em dois grupos: serina- β -lactamases (classes A, C e D) e metalo- β -lactamases (classe B) (Bush & Jacoby, 2009; Livermore, 2012; Blair *et al.*, 2015).

Este tipo de antibióticos apresenta um elemento estrutural farmacofórico em comum, o anel azetidina de quatro elementos ou anel β -lactâmico (Silva *et al.*, 2020). Actualmente os antibióticos β -lactâmicos estão divididos em quatro classes principais em função da estrutura química apresentada: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Silva *et al.*, 2020).

Os β -lactâmicos são rotineiramente utilizados para o tratamento de infecções hospitalares, uma vez que apresentam eficácia terapêutica e toxicidade selectiva, com estrutura química maleável e versátil (Fernandes *et al.*, 2013). No entanto, a sua utilização frequente no decorrer dos anos favoreceu o aumento de microorganismos portadores de genes codificadores de β -lactamases, enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico, fazendo o mesmo perder sua efectividade e, assim, contribuindo para as falhas terapêuticas e disseminação da multi-droga resistência (Fernandes *et al.*, 2013).

Com base nas especificidades do substrato, a família das β -lactamases é dividida em quatro grupos funcionais: penicilinases, ESBLs, carbapenemases e cefalosporinases do tipo AmpC (Livermore, 2012).

6.3. Determinantes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos

6.4.1. β -lactamases de amplo espectro (ESBL)

As espécies da família *Enterobacteriaceae* que contém β -lactamases de amplo espectro (ESBLs) surgiram como patógenos significativos e resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos e podem ser difíceis de tratar, pois suas opções terapêuticas são poucas (Bradford, 2001).

Com base nas especificidades do substrato, a família das β -lactamases é dividida em quatro grupos funcionais: penicilinases, ESBLs, carbapenemases e cefalosporinases do tipo AmpC (Livermore,

2012). Destes, os ESBLs, que podem hidrolisar praticamente todas as penicilinas e cefalosporinas, incluindo as cefalosporinas de espectro estendido, como cefotaxima ou ceftazidima, compreendem o maior e mais prevalente grupo de enzimas (Livermore, 2012). Muitos produtores de ESBL são multi-droga resistentes a antibióticos não- β -lactâmicos, incluindo fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, trimetoprima, tetraciclinas, sulfonamidas e cloranfenicol, bem como aminoglicosídeos, e isso é frequentemente codificado pelos mesmos plasmídeos que determinam a ESBL (Livermore *et al.*, 2007; Hijazi *et al.*, 2016).

Mais de 200 tipos de ESBLs foram descritos em várias espécies da família *Enterobacteriaceae* e outros organismos não entéricos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, esse organismo produz variantes das β -lactamases TEM, SHV e CTX-M (Hijazi *et al.*, 2016). As β -lactamases do tipo TEM e SHV, produzidas principalmente por *K. pneumoniae*, facilmente se espalham por todo o ambiente hospitalar, e as enzimas CTX-M, produzidas principalmente por *E. coli*, tornam-se predominantes na comunidade (Hijazi *et al.*, 2016).

Os genes *bla*_{CTX-M-15} são encontrados principalmente em *Enterobacteriaceae* e foram recentemente denominados “plasmídeos de resistência responsáveis pelo surto” devido à sua capacidade de adquirir genes de resistência e de transferir entre bactérias. A comunidade pode, assim, representar um reservatório para ESBLs não detectados em isolados clínicos (Hijazi *et al.*, 2016).

A indústria avícola tem sido considerada um potencial reservatório de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL que podem ser adquiridas por humanos através do manuseio ou consumo de carne contaminada (Faife *et al.*, 2020). Desta forma, o presente estudo foca-se na detecção de genes dos mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, nomeadamente: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} em amostras de origem humana e animal na cidade de Maputo.

6.4.2. β -lactamases mediados por plasmídeos (AmpC)

As β -lactamases codificadas em plasmídeos são enzimas que conferem resistência às cefalosporinas de terceira geração, como cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona, às cefamicinas, como cefoxitina e cefotetan e aos inibidores das β -lactamases (Tolentino, 2009). Estas enzimas são produzidas por genes de localização cromossómica ou as β -lactamases tipo AmpC, que possuem uma modificação estrutural nas 10 regiões adjacentes ao seu sítio activo, o que provavelmente levou à ampliação de seu espectro de acção (Tolentino, 2009).

As β -lactamases AmpC hidrolisam as penicilinas, as oximino-cefalosporinas, aztreonam (variável) e a cefoxitina e não são inibidas pelo ácido clavulânico (Jacoby, 2009). Estas enzimas pertencem à classe C de Ambler e aos subgrupos funcionais 1 e 1e de Bush e Jacoby (Bush, 2013). No entanto, as enzimas do subgrupo 1e, designadas por AmpC de amplo espectro (ESAC), apresentam maior actividade hidrolítica às cefalosporinas de terceira geração do que as do subgrupo 1 (Bush, 2013).

As β -lactamases AmpC são importantes cefalosporinases codificadas por genes cromossómicos em algumas espécies de *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter* spp., *C. freundii*, *M. morgani*, *E. coli* e *P. aeruginosa*), no entanto, têm sido também muito descritas β -lactamases AmpC mediadas por plasmídeos (PMA β , Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases) em *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. e *P. mirabilis* e as PMA β derivam de genes ampC cromossómicos de diferentes espécies (Barbosa, 2013).

Os genes AmpC são derivados dos genes cromossómicos de várias espécies da família *Enterobacteriaceae*, e estão normalmente localizados em integrons de classe I em plasmídeos onde também estão genes que determinam a resistência para outras drogas como fluoroquinolonas, sulfonamidas, aminoglicosídeos e cloranfenicol, além de genes para a produção ESBL tipo TEM, SHV e CTX-M (Tolentino, 2009; Kimera *et al.*, 2024). Devido a este ambiente genético, estes genes se disseminam facilmente através de transmissão horizontal, e estirpes produtoras de pAmpC são normalmente multi-droga resistentes e encontram-se disseminadas não somente em dentro do ambiente hospitalar, mas também na comunidade (Tolentino, 2009).

Para agravar este cenário, as mutações que causam alterações nas sequências de aminoácidos, consequentemente modificam a estrutura enzimática, o que promove o surgimento de AmpC de amplo espectro (ESAC) que é capaz de hidrolisar cefalosporinas de quarta geração e carbapenémicos, e que já foi detectada em rebanho bovino, sendo que, pequenas diferenças na sequência de aminoácidos deram origem às famílias e tipos de AmpC, sendo CMY2 prevalente em isolados oriundos de animais de companhia e de produção em todos os continentes (Tolentino, 2009; Santiago *et al.*, 2016).

A presença de AmpC está frequentemente associada à multiresistência, uma vez que genes de resistência às mais variadas classes de antimicrobianos, por exemplo aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, sulfonamidas e tetraciclinas, além de genes codificadores de outras β -

lactamases, podem estar presentes em um mesmo plasmídeo (Tolentino, 2009; Santiago *et al.*, 2016).

A importância clínica reside no facto de que isolados produtores deste tipo de β -lactamase hidrolisam a maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas, cefamicinas, penicilinas e as combinações com inibidores de β -lactamases (ESBL), limitando as opções terapêuticas para tratamento de infecções causadas por estas bactérias (Santiago *et al.*, 2016).

6.4.3. Carbapenamases

Os carbapenémicos possuem uma estrutura anular de cinco elementos acoplados ao seu anel β -lactâmico e tem quatro representantes: imipenem, meropenem, ertapenem e o doripenem, e possuem um espectro de acção mais amplo de todos os β -lactâmicos com um número maior de microorganismos, incluindo cocos e bacilos Gram-positivos e Gram-negativos e algumas estirpes multi-droga resistentes e anaeróbias (Willian & Petri, 2012; Nordimann *et al.*, 2012).

Os Carbapenémicos (Imipenem, Meropenem, Ertapenem e Doripenem) têm sido tradicionalmente reservados para a terapia de infecções suspeitas ou confirmadas com BGN multi-droga resistentes, incluindo *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, pois as carbapenemases são enzimas diversas que variam em sua capacidade de hidrolisar carbapenemas e outros β -lactâmicos (Kaur *et al.*, 2015).

A detecção de carbapenemases é uma questão crucial para o controlo de infecções, pois muitas vezes estão associadas a extensa resistência a antibióticos, falhas no tratamento e mortalidade associada à infecção, e dentre as β -lactamases, as carbapenemases, especialmente as metalo- β -lactamases transferíveis (MBLs) são as mais temidas por sua capacidade de hidrolisar praticamente todos os fármacos dessa classe, inclusive os carbapenémicos (Kaur *et al.*, 2015).

Nas Enterobacteriáceas, a resistência aos carbapenémicos surge principalmente através de dois mecanismos: aquisição de genes codificadores de enzimas responsáveis pela hidrólise de carbapenémicos ou diminuição na absorção de antibiótico devido à expressão qualitativa deficiente de porina qualitativa (OmpF and OmpC), em associação com uma super-expressão de β -lactamases com fraca afinidade para carbapenemases (Nordimann *et al.*, 2012). A detecção de bactérias produtoras de carbapenemase é provavelmente superestimado, desde que os

carbapenémicos não são incluídos na rotina de testes de susceptibilidade nos laboratórios veterinários (Abraham *et al.*, 2014).

6.5. Testes de susceptibilidade antimicrobiana

O teste de susceptibilidade antimicrobiana (TSA) é um procedimento laboratorial realizado por profissionais especializados (cientistas de laboratório clínico) para identificar qual regime antimicrobiano é especificamente eficaz para pacientes individuais (Bayot & Bragg, 2022).

A determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos a partir de isolados bacterianos tem como principal objectivo prever o desfecho do tratamento com os agentes antimicrobianos testados. Este apresenta três categorias: “sensível” quando existe uma alta probabilidade do paciente responder ao tratamento com este fármaco, na dosagem apropriada, “resistente” quando o tratamento com o agente antimicrobiano tende a falhar e “intermediária” que caracteriza que a sua prescrição pelo médico requer cautela, uma vez que pode ser necessária a utilização de doses mais elevadas deste fármaco para se atingir o sucesso terapêutico (Paiva, 2010).

O resultado do antibiograma disponibiliza aos médicos a susceptibilidade bacteriana frente a diversos antimicrobianos, proporcionando, geralmente, alternativas medicamentosas para o tratamento ao paciente, no caso de aparecimento de reacções adversas ao fármaco prescrito inicialmente (Rossi e Andreazzi, 2005; Turindge *et al.*, 2007).

Os métodos clássicos dependentes de cultura (por exemplo, teste de difusão em disco e método de difusão em gradiente) estão firmemente estabelecidos na rotina diagnóstica e sua principal limitação é que os resultados são obtidos para a maioria das bactérias clinicamente importantes em pelo menos 18-24 h ou 48 h, incluindo isolamento bacteriano prévio e identificação (Gajic *et al.*, 2022).

Nos métodos de diluição em caldo e ágar, as concentrações inibitórias mínimas (CMI) de agentes antimicrobianos podem ser determinadas, pois este valor da CMI serve como base para avaliar a categoria de susceptibilidade do patógeno a um determinado antibiótico, de organismos que dão resultados ambíguos e, especialmente, quando não há pontos de interrupção clínicos para difusão em disco, e permite avaliar o grau de susceptibilidade ou resistência ao antibiótico. Além da determinação das CMIs, a vantagem dos métodos de diluição em caldo é a possibilidade de obter

a concentração bactericida mínima (CBM), que é a menor concentração de uma substância antimicrobiana que mata 99,9% das bactérias (Gijac *et al.*, 2022).

Adicionalmente, Gajic *et al.* (2022), referem que os métodos de teste de susceptibilidade antimicrobiana incluem:

- O método de macrodiluição ou teste de diluição em tubo: utiliza a diluição seriada de duas vezes de substâncias antimicrobianas em meios correspondentes, em que uma concentração conhecida de bactérias suspensas é adicionada aos tubos preparados e após 24 h de incubação a 37°C, o crescimento bacteriano é medido pela turbidez do meio, permitindo a determinação dos valores de CMI (Figura 2).
- O método de macrodiluição utilizando a metodologia *time-kill*: permite monitorar o efeito de diferentes concentrações de substâncias antimicrobianas, examinando a taxa na qual os antimicrobianos levam à morte bacteriana (Figura 2).
- O método de microdiluição em caldo: é padronizado, preciso e barato, pois pode ser realizado em placas de microtitulação de 96 poços, permitindo testar várias substâncias antimicrobianas consecutivas e oito séries de diluições duplas de agentes antimicrobianos em uma placa.
- O método de diluição em ágar: envolve a adição de diferentes concentrações de substâncias antimicrobianas ao meio não selectivo antes da solidificação.
- O método de gradiente antimicrobiano em tira: é uma combinação de disco-difusão e método de diluição, e permite que o CMI seja determinado, mantendo-o simples e fácil de usar, e este método baseia-se na difusão de um antibiótico através de ágar com gradiente contínuo.
- O teste de disco de difusão: baseia-se na colocação de diferentes discos impregnados com antibiótico em ágar previamente inoculado com suspensão bacteriana, e o antibiótico difunde-se radialmente para fora através do meio de ágar, produzindo um gradiente de concentração de antibiótico. Após as zonas de inibição serem estabelecidas dentro de 24 h de incubação a 35±1°C, os diâmetros das zonas de cada antibiótico testado são medidos a olho nú ou usando um sistema automatizado.

- Meio de ágar cromogénico: permite uma detecção e identificação mais rápida de microorganismos resistentes, permitindo com que os patógenos alvo cresçam como colónias coloridas.
- Testes colorimétricos: são baseados no componente de teste de hidrólise de enzimas bacterianas, que é detectado pelas mudanças nos valores de pH e na cor das substâncias cromogénicas. Esses testes mostraram-se rápidos, fáceis de realizar e interpretar, além de serem altamente sensíveis e específicos.

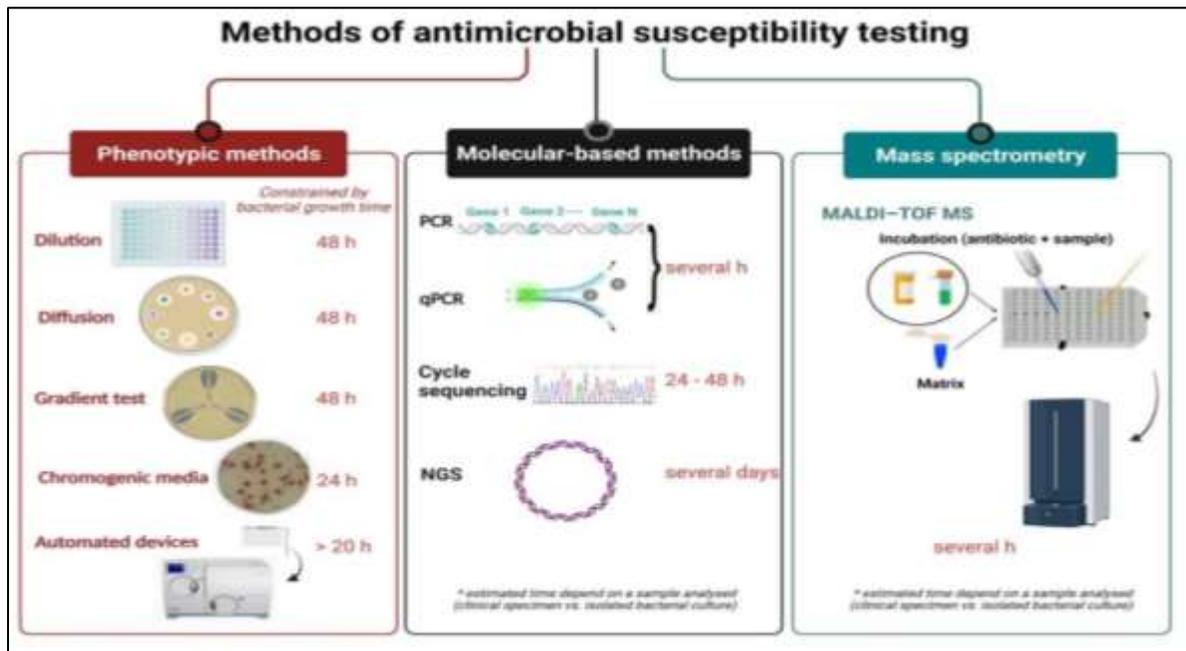


Figura 2. Métodos de teste de susceptibilidade antimicrobiana.

Fonte: Gajic *et al.*, (2022).

No presente estudo foi usado o método de disco de difusão interpretando os resultados de acordo com as orientações de *Clinical Laboratory Standards Institute* (EUA) (CLSI, 2023).

7. Enquadramento teórico

O crescente aumento e propagação da resistência antimicrobiana compromete a capacidade de tratar infecções, conseqüentemente, uma abordagem de um único sector para prevenir e controlar a resistência antimicrobiana é insuficiente (WHO, 2023).

A abordagem de saúde única reconhece a interconexão e interdependência dos seres humanos, animais, plantas e o ambiente em geral (incluindo os ecossistemas) na emergência e propagação da resistência antimicrobiana (WHO, 2023).

As bactérias Gram-negativas, principalmente *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp. e *P. aeruginosa* tem sido fonte de infecções de origem alimentar e disseminação por várias vias entre animais, humanos e o ambiente, incluindo solo e água (Melo, 2014; Poursina *et al.*, 2023).

A carne é uma das principais componentes da alimentação humana devido ao seu alto teor de proteínas (Brito & Coelho, 2021). No entanto, apesar de seus inúmeros benefícios, pode sofrer reacções químicas, físicas e contaminação microbiológica que pode ser transmitida ao Homem (Brito & Coelho, 2021).

Por conta disso, a contaminação da carne pode ocorrer em qualquer etapa, desde o abate do bovino e/ou aves até o armazenamento e distribuição do produto, através do contacto com a pele, pêlos/penas, patas, conteúdo do trato gastrointestinal, leite, roupas, mãos dos operários, equipamentos, ar dos locais onde os procedimentos de abate são realizados e locais de armazenamento das carcaças, evidenciando a necessidade de abordagem de saúde única (Ribeiro, 2012).

Por outro lado, a produção de aves de capoeira em pequena escala representa 60%-90% de toda a produção em países de baixo e médio rendimento em toda a África e tende a aumentar como um meio de fornecer simultaneamente nutrição, rendimento e segurança alimentar às famílias, apesar destes benefícios, a produção de aves de capoeira também acarreta riscos financeiros e de saúde devido à exposição a perigos microbianos (Wong *et al.*, 2017).

A carne de frango pode se tornar veículo de transmissão de inúmeros microorganismos patogénicos e resistentes, destacando-se *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp. e *E. coli*

enteropatogênica (Steffens *et al.*, 2017). E os produtos de frango a retalho são incriminados como uma fonte primária de *Pseudomonas* spp. para os seres humanos (El-Ghany, 2021).

Todavia, as infecções humanas associadas às aves de capoeira com *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. são mais prováveis nas zonas urbanas onde o frango e o seu consumo são uma importante fonte de infecção, e os riscos são provavelmente maiores em contextos onde o acesso à água e os comportamentos de higiene são deficientes e podem afectar as práticas de higiene alimentar (Lamar *et al.*, 2023).

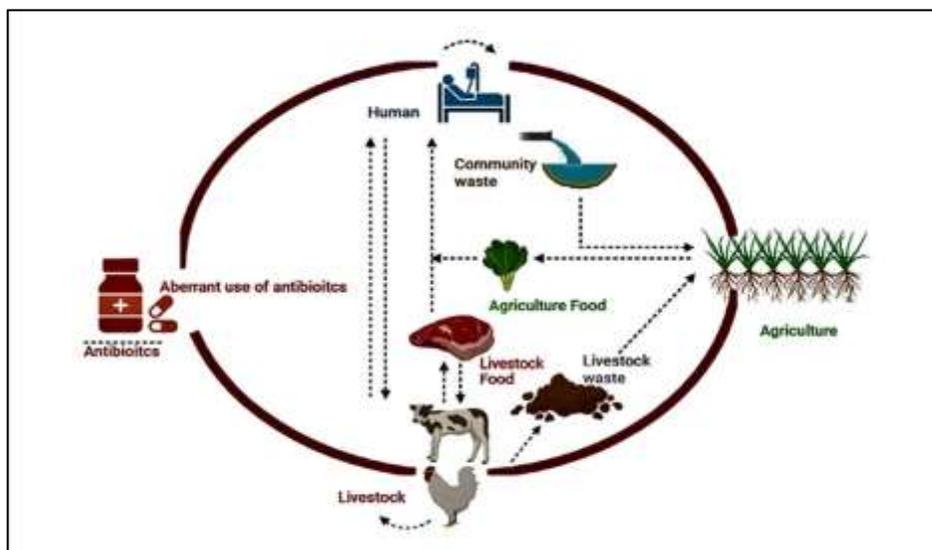


Figura 3. Uso de antibióticos e a disseminação das resistências em animais, humanos e meio ambiente.

Fonte: Aslam *et al.*, (2021).

Relativamente a produção global anual de fezes de animais (principalmente gado bovino, galinhas e ovelhas) encontra-se estimada em $29,7 \times 10^9$ kg, aproximadamente quatro vezes a quantidade de biomassa fecal humana, e esta quantidade tende a aumentar, em paralelo com o aumento do consumo de proteínas animais, apoiado pela promoção da criação de animais como estratégia de desenvolvimento para aumentar os meios de subsistência e reduzir a subnutrição, contudo os resíduos fecais não tratados de seres humanos e animais que podem entrar na cadeia alimentar podem condicionar a segurança alimentar, causando as doenças de origem alimentar (Lamar *et al.*, 2023).

Todos os animais e os seres humanos têm bactérias, mas o uso excessivo de antibióticos na produção animal levou a que alguns se tornassem colonizados por bactérias resistentes a

antibióticos, e nas fases de abate e processamento, estas bactérias podem ser transferidas para o produto alimentar (Morel, 2019).

Os produtos alimentares de origem animal podem por vezes estar contaminados com bactérias e as bactérias resistentes aos medicamentos podem permanecer na carne, e quando não são manuseados ou cozinhados correctamente, as bactérias podem propagar-se aos seres humanos (CDC, 2013). Os produtos alimentares contaminados são considerados a principal via de transmissão de microorganismos patogénicos incluindo bactérias resistentes aos animais e seres humanos (OMS, 2011).

A utilização de antibióticos na medicina humana e veterinária contribui para o aumento e emergências de resistência em varios países (Aslam *et al.*, 2021). Nos seres humanos, os antibióticos são utilizados principalmente para tratar infecções clínicas, fins profilácticos, como nos casos pós-cirúrgicos (Aslam *et al.*, 2021).

Por exemplo, os isolados de *P. aeruginosa* multi-droga resistentes representam um problema de saúde global, devido à limitação nas opções de tratamento clínico (Zowalaty *et al.*, 2015). O tratamento destas estirpes multi-droga resistentes, inclui carbapenémicos, porém, a emergência de estirpes produtoras de β -lactamases e metalo- β -lactamases (MBLs) constitui uma ameaça (Hammami *et al.*, 2011; Yoo *et al.*, 2012), pois as MBLs têm a capacidade de hidrolisar e desenvolver resistência a praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos existentes e quase não existem regimes medicamentosos clinicamente úteis para os MBL, devido a um rápido isolamento e descoberta de novas variedades, os seus genes codificadores são facilmente transferidos e estão omnipresentes nos hospitais e no ambiente natural (Li *et al.*, 2022).

Nos animais, a prescrição de antibióticos é geralmente comparável aos dos seres humanos (McEwen & Collignon, 2018). Todavia, em animais, os antibióticos são também utilizados como aditivos alimentares e promotores de crescimento (Landers *et al.*, 2012).

A resistência bacteriana aos β -lactâmicos tem sido cada vez mais observada em bactérias, incluindo as isoladas em fontes animais (Sumbana, 2019), através da produção de enzimas β -lactamases, contribuindo para a ineficácia de antibióticos como cefalosporinas, carbapenémicos, penicilinas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, utilizados comumente na primeira linha de tratamento de infecções (Sumbana, 2019).

Do ponto de vista da saúde humana e animal, uma questão de preocupação emergente é o aumento de relatos de certas β -lactamases de amplo espectro em bactérias de origem animal que produzem, por exemplo, as β -lactamases CMY do tipo AmpC codificadas por plasmídeo e as ESBLs CTX-M (Li *et al.*, 2007).

Em África, a resistência aos antibióticos em produtos alimentares foi notificada e os genes ESBL mais comuns detectados em bactérias de animais de criação de géneros alimentícios são o *bla*_{CTX-M}, seguido dos genes *bla*_{TEM-52} e *bla*_{SHV-12} e principalmente em *Escherichia coli* (Faife *et al.*, 2020).

Entre os vários fármacos antimicrobianos, os β -lactâmicos representam uma das classes mais significativas de antimicrobianos, proporcionando benefícios terapêuticos notáveis para o tratamento, controlo e gestão de infecções bacterianas (Li *et al.*, 2007).

Devido à tendência de aumento de resistência em fontes animais e humanos, estudos de vigilância de resistência considerando a saúde única são fundamentais para uma abordagem holística da gestão antimicrobiana em Moçambique.

8. Metodologia

O presente estudo iniciou com a aquisição de amostras biológicas entre Abril e Junho de 2023, que consistiu na recolha de placas de hemocultura com colónias sugestivas de bactérias Gram-negativas (BGN) no Laboratório de Microbiologia do Hospital Central de Maputo (LM-HCM) obtidas de pacientes com suspeita de sepses, bem como a recolha dos respectivos dados demográficos nos livros de registo. Entretanto, as amostras de carne bovina foram colhidas no Matadouro da cidade de Maputo, de bovinos abatidos diariamente, juntamente com a recolha de dados relativos à proveniência e idade. Adicionalmente, as amostras de carcaças e fezes de frango foram obtidas de galinhas de corte comercializadas no Mercado Fajardo. Todas as amostras foram, em seguida, transportadas para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane (LM-FAMED-UEM), onde foram submetidas a análises laboratoriais, incluindo o isolamento/identificação e a caracterização fenotípica e molecular de BGN, seguindo o fluxograma apresentado na Figura 4 e utilizando reagentes e consumíveis listados nas Tabelas 1, 2 e 3.

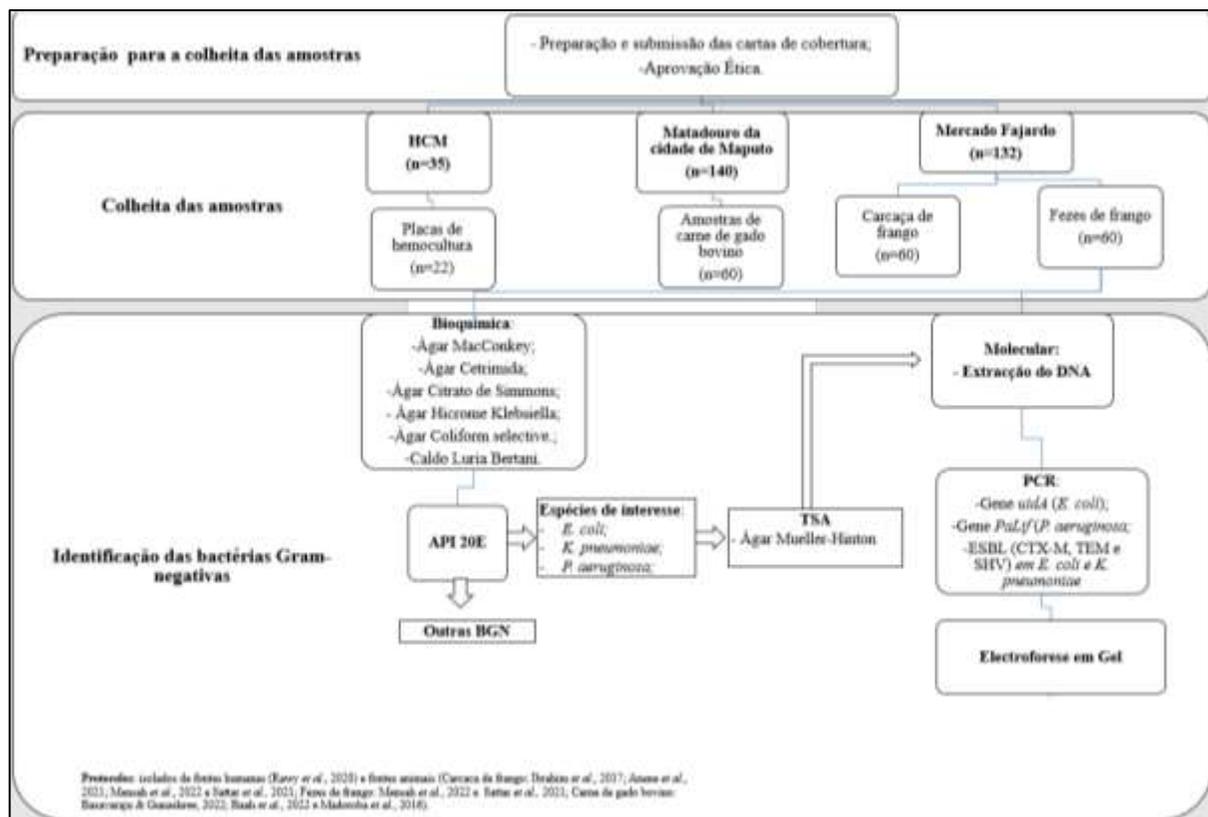


Figura 4. Fluxograma da metodologia para elaboração do trabalho.

8.1. Reagentes

Tabela 1. Meios de cultura usados para o isolamento das espécies bacterianas.

Meios de cultura	
Ágar Cetrimida	Ágar Macconkey
Ágar Citrato De Simmons	Ágar Mueller-Hinton
Ágar <i>Coliform Selective</i>	Caldo Luria Bertani (Lb)
Ágar <i>Hicrome Klebsiella</i>	

Tabela 2. Classes e antibióticos seleccionados para o estudo.

Classe	Antibióticos	Concentração (µg)
Aminoglicosídeos	Gentamicina e Amicacina	10
Carbapenémicos	Meropenem e Imipenem	10
Cefalosporinas	Ceftazidima, Cefotaxima e Cefepima	30
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	30
Macrolídeos	Azitromicina	15
Penicilinas	Ampicilina, Amoxicilina – Ácido clavulânico e Piperaciclina Tozobactam	10 e 30
Sulfonamida	Sulfametoxazol/trimetoprima	12.5/23.75
Tetraciclina	Tetraciclina	30

Fonte: Sumbana *et al.*, (2021).

Tabela 3. Reagentes usados para a caracterização molecular.

Extracção do DNA	Master-mix	Electroforese em gel
Caldo Luria Bertani	ATCC's: - <i>E. coli</i> ATCC 6125 -SS61 <i>E. coli</i> (CTX-M ⁺ , TEM ⁺)* -SS58 <i>K. pneumoniae</i> (CTX-M ⁺ , TEM ⁺ , SHV ⁺)* -SS48P <i>P. aeruginosa</i> *	Água destilada
DNA molde	Água dionizada (ddH ₂ O)	Gel red (10.000X)
PBS 1X	dNTP's	Gel loading Dye (6X)
	<i>Primers forward e reverse</i> (ESBL, <i>uidA</i> e <i>PaLif</i>)	Marcador/DNA ladder (100 pb)
	Tampão <i>Green of Colorless Buffer</i> (5X)	Tampão TAE (1X)
	Taq polimerase (5 U/µl)	

* Controlos positivos cedidos gentilmente pelo Dr. José Sumbana.

8.2. Tipo/desenho de estudo

O estudo foi do tipo descritivo transversal com recolha de dados de forma prospectiva.

8.3. Local do estudo

O estudo foi realizado em três (3) locais distintos, respectivamente: Hospital Central de Maputo (HCM), Matadouro da Cidade de Maputo e Mercado Fajardo (Figura 5).

O HCM está situado na latitudes -25.9694 e longitude 32.58819, na Cidade de Maputo, em Moçambique. É um hospital quaternário público e de ensino com cerca de 1463 leitos, fornece 4 Serviços de Terapia Intensiva: a UTI de Emergência com 16 leitos, a UTI de Medicina com 6 leitos, a UTI Pediátrica com 16 leitos e a UTI cirúrgica com 12 leitos (Mahaluça *et al.*, 2018).

O mercado Fajardo é um dos mais antigos e é um dos maiores pontos venda de alimentos, incluindo galinhas e possui também um pequeno matadouro para frangos na cidade de Maputo (Jornal Notícias, 2020).

O matadouro da cidade de Maputo realiza abates de gado bovino credenciados na região sul do país, em que em média realiza abate de 160 gados bovinos provenientes da região sul do país (Miranda em Comunicação oral, 2023).



Figura 5. Mapa de Moçambique com destaque dos locais de colheita das amostras.

Fonte: d-maps, (2023).

8.4. Período do estudo

O estudo teve início após a aprovação ética, com duração de 3 meses (Abril a Junho) de 2023, incluindo isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* colhidos de amostras de hemocultura, carne de gado bovino, carcaça e fezes de frango.

8.5. População do estudo

A população de estudo consistiu em placas de hemoculturas com colónias sugestivas de BGN obtidas de pacientes com suspeita de sepses atendidos no Hospital Central de Maputo (HCM), gado bovino e galinhas de corte e fezes (frangos) abatidos e comercializados no Matadouro e Mercado Fajardo na cidade de Maputo, respectivamente.

8.6. Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídas no estudo, todas as placas de hemocultura de pacientes com suspeita de sepses provenientes do LM-HCM, devidamente identificadas, registadas nos livros de registo e em bom estado de conservação. Também foram incluídas amostras de carne fresca de bovinos abatidos no Matadouro, e carcaça e fezes de frango provenientes do Mercado Fajardo.

Foram excluídas do estudo, todas as placas de hemocultura de pacientes com suspeita de sepses provenientes do LM-HCM contaminadas, e as amostras de gado bovino e carcaça e fezes de frango não frescas no Matadouro da cidade de Maputo e Mercado Fajardo na cidade de Maputo, respectivamente.

8.7. Modo de selecção de amostra e amostragem

Foram incluídas no presente estudo amostras de origem humana (placas de hemocultura) e animal (carne de gado bovino, carcaças e fezes de frango) que foram identificadas e confirmadas como sendo positivas para BGN, e que reuniam todos os critérios de inclusão acima descritos através de uma amostragem não probabilística por conveniência.

8.8. Procedimentos, Técnicas e Instrumentos de recolha de dados

8.8.1. Colheita das amostras

As amostras analisadas neste estudo foram obtidas a partir de três fontes, nomeadamente: placas de hemocultura, gado bovino, e frangos (carcaça e fezes). As placas de hemocultura no Laboratório de Microbiologia do HCM (LM-HCM) continham colónias sugestivas de BGN, inoculadas em triplicado em ágar sangue, chocolate e MacConkey e estas eram provenientes de garrafas de hemocultura previamente incubadas no BACTEC no mesmo Laboratório. Cada placa estava devidamente identificada com os códigos correspondentes a cada amostra de sangue do paciente e a data de subcultura, facilitando a colheita dos dados demográficos nos livros de registo. As amostras de carne bovina foram obtidas de bovinos abatidos, em que retirou-se aproximadamente 5 g do músculo de cada bovino e armazenados em sacos *ziplock* previamente identificados. Quanto às carcaças de frango, foram retirados de cada frango aproximadamente 5 g a 10 g de músculo e armazenadas em sacos *ziplock* e cerca de 1 g de fezes de frango directamente da cloaca e colocadas em frascos estéreis previamente identificados. Estas amostras foram transportadas em cólmen com gelo seco (apenas para as amostras animais) até ao LM-FAMED-UEM.

8.8.2. Identificação bioquímica e molecular de espécies de bactérias Gram-negativas provenientes de placas de hemocultura, gado bovino, carcaça e fezes de frangos

8.8.2.1. Identificação bioquímica

Os isolados provenientes das amostras de placas de hemocultura foram subcultivados no meio ágar MacConkey e incubadas na estufa a 37°C durante 18-24 horas para identificação preliminar dos isolados. As colónias foram reisoladas em ágar McConkey, Citrato de Simmons e cetrimida e incubadas na estufa a 37°C durante 24h para se obter colónias frescas e puras e realização do teste de confirmação API E20 e meios cromogénicos de *E. coli* e *K. pneumoniae* para confirmação da identificação (Rawy *et al.*, 2020).

A análise laboratorial de amostras de fonte animal baseou-se nos protocolos de: Ibrahim *et al.*, 2017; Anene *et al.*, 2021; Mensah *et al.*, 2022; Sattar *et al.*, 2021; Basavaraju & Gunashree, 2022 e Baah *et al.*, 2022, com o seguinte procedimento:

As amostras de origem animal, gado bovino, carcaças e fezes de frango tiveram o mesmo processamento microbiológico. Inicialmente, as carnes e as fezes foram subcultivadas em meio de

enriquecimento Luria Bertani e incubados a 37°C durante 24 horas, e posteriormente foi feito o subcultivo nos meios ágar MacConkey, Citrato de Simmons e ágar Cetrimida. As colónias rosadas e frescas, típicas de *E. coli* foram subcultivadas em ágar MacConkey. As colónias com características morfológicas distintas que cresceram no meio de cultura foram seleccionadas e subcultivadas no ágar Citrato de Simmons e incubadas a 37°C durante 24 horas e posteriormente foi feito o subcultivo dos isolados com suspeitas de *E. coli* e *K. pneumoniae* nos meios cromogênicos. As colónias verdes, suspeitas de *P. aeruginosa*, no meio ágar Cetrimida foram utilizadas para a realização do teste de oxidase.

A confirmação da identificação dos isolados bacterianos foi feita usando o teste API 20E, que é um método de identificação de microorganismos que utiliza tiras que contêm até 20 pequenos compartimentos contendo substratos desidratados obedecendo o protocolo descrito por Ferreira (2017).

8.8.2.2. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste de susceptibilidade antimicrobiana (TSA) consistiu no uso de antibióticos β -lactâmicos de amplo espectro e mediados por plasmídeo, carbapenémicos e fluoroquinolonas de amplo espectro e todos os outros comumente usados através do método de disco de difusão:

- a) Foram seleccionadas da placa de cultura, três a cinco colónias puras de cada bactéria de interesse e foram inoculadas em um tubo de ensaio contendo 5 ml de soro fisiológico;
- b) De seguida, agitou-se o tubo de ensaio com ajuda do vórtex por cerca de 5 a 10s e ajustou-se a turbidez 0.5 segundo a escala de McFarland;
- c) Posteriormente, com auxílio de uma zaragatoa estéril inoculou-se a suspensão do inóculo preparada, humedecendo-a, e em seguida, por meio de estrias semeou-se toda a placa de Mueller-Hinton;
- d) Por fim, os discos de antimicrobianos foram depositados e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Os resultados foram interpretados de acordo com os procedimentos de CLSI (2023).

8.8.2.3. Identificação molecular de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

8.8.2.3.1. Extracção do DNA

A extracção do DNA foi feita com base na técnica de fervura (*Boiling*), um procedimento que envolve a lise celular de acordo com o protocolo descrito por Rappeli *et al.* (2005) e Gad *et al.* (2007):

- a) Uma colónia bacteriana previamente isolada foi subcultivada em tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo Lúria Bertani e incubada a 37°C durante 24 horas;
- b) Posteriormente, adicionou-se 300 µL de LB nos tubos *Eppendorf* com auxílio da micropipeta de 1000 µL;
- c) Levou-se os tubos para centrifugação, a 6000 rpm por 5 min a 20°C para sedimentação;
- d) Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante por inversão dos tubos no papel toalha, e o *pellet* (sedimento das células) foi ressuscitado em 300 µL de PBS, agitado por 10s e posteriormente levado ao banho-maria para incubação durante 7 min a 95°C;
- e) Após a lise celular, os tubos foram retirados do banho-maria, levados a centrifugação, a 12000 rpm por 5min a 20°C;
- f) De seguida, transferiu-se 75 µL do sobrenadante contendo DNA para os tubos *Eppendorf* e o restante descartado;
- g) O sobrenadante foi guardado no congelador a -20°C para realização da PCR.

8.8.2.3.2. Identificação molecular de *Escherichia coli*

Para realização da PCR foi preparado o mastermix usando os iniciadores específicos do gene *uidA* (codifica a enzima β-glucuronidase) (Tabela 4).

Tabela 4. Mastermix para a PCR do gene *uidA* (623 pb) de *E. coli*.

Reagentes	1X (Volume)
<i>Green of colorless Buffer</i> [5X]	5 µL
<i>Primer forward uidA</i> [10 µM]	0,5 µL
<i>Primer reverse uidA</i> [10 µM]	0,5 µL
Taq DNA polimerase [5 U/µL]	0,2 µL
dd H ₂ O	16,8 µL
DNA molde	2 µL
Volume total	25 µL

Após a preparação do mastermix, misturou-se os reagentes, tendo como princípio a adição do reagente com maior volume (dd H₂O) para o de menor (Taq polimerase) em tubos de *Eppendorf*, e de seguida, distribuiu-se 23 µL nos tubos de PCR, e adicionou-se 2 µL do DNA molde em cada tubo, excepto no controlo negativo, em que se adicionou 2 µL de dd H₂O. Para o controlo positivo adicionou-se 2 µL de DNA positivo para o gene *uidA*. Posteriormente, os tubos foram colocados no termociclador Gene Amp PCR *System* 9700, o qual foi programado de acordo com as condições descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Condições de PCR do gene *uidA*.

Nº de etapas	Nº de ciclos	Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (Minutos)
1 ^a		Desnaturação inicial	94	5
2 ^a	35	Desnaturação	94	1
3 ^a		Anelamento	50	1
4 ^a		Extensão	72	1
5 ^a		Extensão final	72	5

Fonte: Rappeli *et al.* (2005).

8.8.2.3.3. Identificação molecular de *Pseudomonas aeruginosa*

Para a realização da PCR foi preparado o *mastermix* usando os iniciadores específicos do gene *PaLif* que codifica a lipoproteína associada ao peptídoglicano-PAL em *P. aeruginosa* (Tabela 6).

Tabela 6. *Mastermix* para PCR do gene *PaLif* (504 pb) de *P. aeruginosa*.

Reagentes	1X (Volume)
Supermix [2X]	12,5 µL
<i>Primer forward uidA</i> [10 µM]	1 µL
<i>Primer reverse uidA</i> [10 µM]	1 µL
dd H ₂ O	5,5 µL
DNA molde	5 µL
Volume total	25 µL

Após a extracção do DNA, no mastermix misturou-se os reagentes, tendo como princípio a adição do reagente com maior volume (supermix) para o de menor (*primers*) em tubos de *Eppendorf*, e de seguida, distribuiu-se 20 µL nos tubos de PCR, e adicionou-se 5 µL do DNA molde em cada tubo, excepto no controlo negativo, em que se adicionou 5 µL de dd H₂O. Para o controlo positivo adicionou-se 5 µL de DNA positivo para o gene *PaLif*. Posteriormente, os tubos foram colocados no termociclador Gene Amp PCR *System* 9700, o qual foi programado de acordo com as condições descritas (Tabela 7).

Tabela 7. Condições de PCR do gene *PaLif*.

Nº. de etapas	Nº. de Ciclos	Étapas	Temperatura (°C)	Tempo
1 ^a	1	Desnaturação inicial	94	2 minutos
2 ^a	30	Anelamento	94	30 segundos
3 ^a			51	30 segundos
4 ^a		Extensão inicial	72	1 minutos
5 ^a	1	Extensão final	72	7 minutos

Fonte: Gad *et al.* (2007); Abd-El-Haleem *et al.* (2003).

8.8.2.4. Caracterização molecular dos determinantes de resistência aos antibióticos β-lactâmicos em bactérias Gram-negativas

A caracterização molecular dos determinantes de resistência foi feita através da Multiplex PCR convencional usando o protocolo de Hijaz *et al.* (2016), para a detecção dos genes TEM, SHV e CTX-M. As reacções de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 µL conforme a Tabela 8. Os iniciadores e as condições da PCR podem ser observados nas Tabelas 9 e 10 respectivamente.

Tabela 8. Mastermix para PCR dos genes de resistência, *bla_{SHV}* (214 pb), *bla_{TEM}* (431 pb) e *bla_{CTX-M}* (593 pb).

Reagentes	1X (Volume)
<i>Green of colorless Buffer</i> [5X]	5 µL
<i>Primer F</i> (TEM) [10 µM]	0,5 µL
<i>Primer R</i> (TEM) [10 µM]	0,5 µL
<i>Primer F</i> (SHV) [10 µM]	1 µL
<i>Primer R</i> (SHV) [10 µM]	1 µL
<i>Primer F</i> (CTX-M) [10 µM]	1 µL
<i>Primer R</i> (CTX-M) [10 µM]	1 µL
Taq DNA polimerase [5 U/µL]	0,2 µL
dd H ₂ O	12,8 µL
DNA molde	2 µL
Volume total	25 µL

Tabela 9. Sequência dos primers para Multiplex PCR dos genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}* em *Enterobacteriaceae*.

Nome dos primers	Primers	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon	Gene alvo	Fonte
ESBL	TEM F	AGT GCT GCC ATA ACC ATG AGT G	431pb	<i>bla_{TEM}</i>	Hijazi <i>et al.</i> (2016)
	TEM R	CTG ACT CCC CGT CGT GTA GAT A			
	SHV F	GAT GAA CGC TTT CCC ATG ATG	214pb	<i>bla_{SHV}</i>	
	SHV R	GAT GAA CGC TTT CCC ATG ATG			
	CTX-M F	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT	593pb	<i>bla_{CTX-M}</i>	
	CTX-M R	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA			

Tabela 10. Condições de PCR para a detecção dos genes de resistência, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}*.

Nº de etapas	Nº de Ciclos	Etapas	Temperatura	Tempo
1 ^a	30	Desnaturação inicial	94°C	5 minutos
2 ^a		Desnaturação	94°C	20 segundos
3 ^a		Anelamento	61°C	30 segundos
4 ^a		Extensão	72°C	1 minuto
5 ^a		Extensão final	72°C	5 minutos

8.8.2.5. Electroforese em Gel e Visualização de amplicons

Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5 %), seguindo o protocolo de Gad *et al.* (2007), Rappel *et al.* (2005) e Promega, (2018), tal como se segue:

- a) Na balança analítica, pesou-se 1 g de agarose e dissolvido em 100 mL do tampão TAE 1X (Tampão Tris-Acetato) num frasco de vidro esterilizado;
- b) Posteriormente, colocou-se a solução no microondas por 3 min, evitando a fervura;
- c) De seguida, adicionou-se 5 µL do gel red [10.000X] no frasco e realizou-se movimentos circulares;
- d) Colocou-se lentamente a solução num suporte electroforético com pente de espessura usado para dar formato aos poços para o carregamento dos amplicons;
- e) Posteriormente deixou-se a solução do gel a solidificar durante 30 min;
- f) Retirou-se o pente de espessura e o gel foi imerso na cuba electroforética contendo o tampão TAE 1X.
- g) Misturou-se 10 µL de amplicons com 2 µL do Loading dye (6X) apenas para os isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, e aplicou-se 10 µL dessa mistura nos poços, e por fim, carregou-se 5 µL de marcador de peso molecular de 100pb em dois poços;
- h) Ajustou-se a voltagem e o tempo para corrida electroforética (100V/60 min);
- i) Visualizaram-se bandas através do transiluminador UV, e o registo dos resultados foi feito mediante uso de uma câmara fotográfica.

O gene *uidA* marcador de *E. coli* foi visualizado através do gel de agarose (Figura 6).

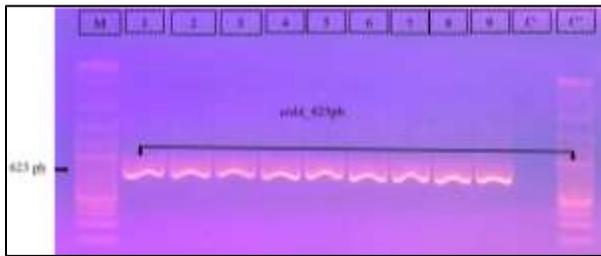


Figura 6. Electroforese em gel de agarose 1% em TAE para detecção do gene *uidA* (623pb). Amostras de carne de gado enumeradas (1 a 9) foram positivas para o gene *uidA* e C⁻ (negativa).

O gene *PaLif* marcador de *P. aeruginosa* foi visualizado no gel de agarose (Figura 7).

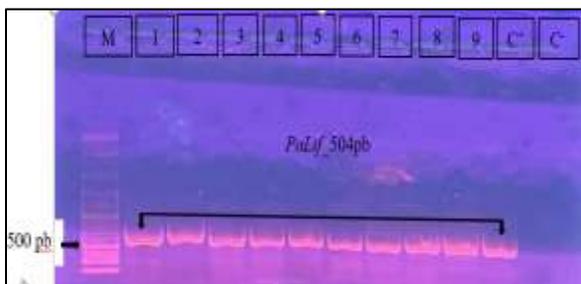


Figura 7. Electroforese em gel de agarose 1% em TAE para a detecção do gene *PaLif* (504pb). Amostras de carne de gado e carcaça de frango enumeradas (1 a 9) foram positivas para o gene *PaLif* e C⁻ (negativa).

Os genes de resistência *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} foram visualizados no gel de agarose (Figura 8).

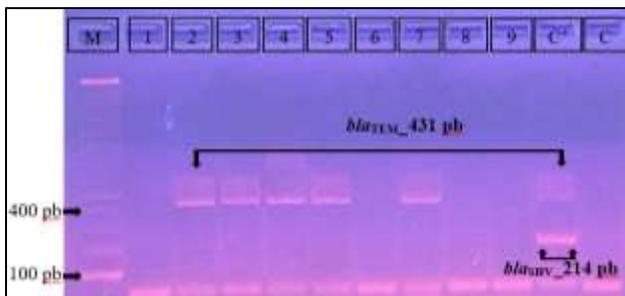


Figura 8. Electroforese em gel de agarose 1% em TAE para a detecção dos genes de resistência (*bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}).

Amostras de placas de hemocultura, carne de gado, carcaça e fezes de frango enumeradas (1 a 9) foram positivas para o gene *bla*_{TEM} (2 a 5, 7 e C⁺) e o gene *bla*_{SHV} C⁺ (positiva), e C⁻ (negativa).

O genes de resistência *bla*_{CTX-M} foi visualizado no gel de agarose (Figura 9).



Figura 9. Electroforese em gel de agarose 1% em TAE para a detecção do gene de resistência (*bla*_{CTX-M}).

As amostras de carne de gado bovino, carcaça e fezes de frango enumeradas (1 a 17) foram negativas para o gene *bla*_{CTX-M}, C⁺ (positivo) e C⁻ (negativa).

8.8. Variáveis

Os dados dos pacientes foram obtidos através dos livros de registo, dados demográficos como idade, sexo, proveniência (ambulatório ou internado) e enfermaria para isolados positivos de placas de hemocultura. E para os isolados provenientes de animais incluiu-se a idade e a proveniência (como pode-se observar no apêndice). Para os isolados provenientes de amostras de humanos e animais, foram incluídas as variáveis indicadas na Tabela 11.

Tabela 11. Variáveis do estudo de resistência antimicrobiana em amostras de fontes humanas e animais.

Objectivos específicos	Variáveis	Fonte de Informação	Tipo de teste
Descrever as características demográficas dos pacientes	Qualitativa nominal -Variável sociodemográfica: dados dos pacientes do estudo	Idade, sexo, proveniência e enfermaria	Frequência e Estimativa pontual de proporção
Identificar bactérias Gram-negativas isoladas de hemoculturas de humanos e amostras de fezes, carcaça de	Qualitativa nominal -Variável laboratorial: espécies frequentemente encontradas nas amostras	Fichas de requisição, meios de cultura e API 20E	Frequência e Estimativa pontual de proporção

galinhas e carne de gado bovino	de hemocultura, fezes e carcaças e carne para os animais.		
Determinar o perfil de susceptibilidade de bactérias Gram-negativas aos antibióticos β -lactâmicos	Qualitativa ordinal -Variável laboratorial: perfil de susceptibilidade (Sensível, Resistente e Intermediário) aos antibióticos- β -lactâmicos	Fichas de requisição, meios de cultura e TSA	Frequência e Estimativa pontual de proporção
Identificar os genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas	Qualitativa nominal -Variável laboratorial: genes de resistência (CTX-M, TEM e SHV) aos antibióticos- β -lactâmicos	PCR	Frequência e Estimativa pontual de proporção
Comparar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos em isolados provenientes de fontes humanas e animal	Qualitativa ordinal -Variável laboratorial: perfil de susceptibilidade (Sensível, Resistente e Intermediário) aos antibióticos β -lactâmicos	Fichas de requisição, meios de cultura e TSA	Frequência e Estimativa pontual de proporção

8.9. Plano de gestão e Análise de dados

Os dados foram armazenados numa base designada “*Database Bacteria isolates from Hemoculture (HCM), Bovine, Chicken and Feces_MBC_Ivete Samuel*” e analisados no programa informático e *Excell* versão 2016 para obtenção das frequências relativas dos isolados das BGN, de susceptibilidade antimicrobiana e dos determinantes de resistência aos β -lactâmicos.

9. Considerações Éticas

O estudo teve aprovação pelo Comité Institucional de Bioética em Saúde da Faculdade de Medicina/Hospital Central de Maputo com o a referência, CIBS FM&HCM/11/2023 (Anexo), e

foram seguidos todos os princípios éticos, nomeadamente: confidencialidade, honestidade, imparcialidade, e apresentação dos potenciais benefícios da realização do estudo. Embora o estudo não tenha envolvido directamente os pacientes de onde foram obtidos os isolados de hemocultura, essa questão foi devidamente considerada e acautelada no estudo sobre a Vigilância Laboratorial de Resistência aos Antibióticos no Hospital Central de Maputo, aprovado pelo Comité Nacional de Bioética em Saúde, com a referência (501/CNBS/24).

Nas amostras de origem animal, obteve-se a aprovação do Conselho Municipal para a aquisição das amostras de carcaça e fezes de frango para a realização do estudo, entretanto, para o Matadouro da cidade de Maputo, por ser uma entidade privada, a autorização foi dada pela mesma, para aquisição das amostras de carne bovina e os respectivos dados sobre a idade e proveniência.

10. Resultados

10.1. Dados demográficos de pacientes com infecção invasiva provenientes do Hospital Central de Maputo

Um total de 35 amostras de placas de hemocultura foram colhidas de Abril a Junho de 2023 no Laboratório de Microbiologia do Hospital Central de Maputo (LM-HCM), e constatou-se que 22 (63%) amostras foram obtidas de pacientes do sexo feminino e 13 (37%) do sexo masculino. A maioria dos pacientes (13/35, 37%) tinha idade superior a 18 anos, seguido de neonatos (menos de 1 mês) (9/35, 25,7%). Um paciente (1/35, 2,9%) não tinha sua idade registada. (Figura 10).

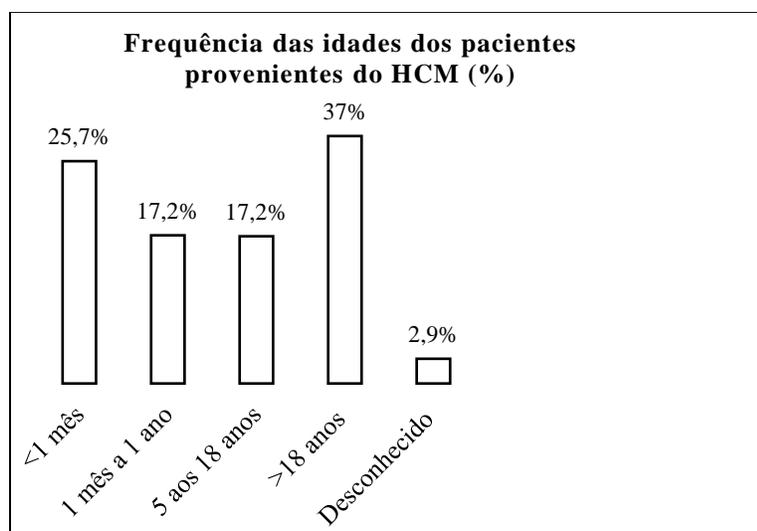


Figura 10. Frequência das idades dos pacientes com infecção invasiva de acordo com a idade, provenientes do Hospital Central de Maputo.

A maioria das placas de hemoculturas dos pacientes foram provenientes do Departamento de Pediatria e Departamento de Medicina com 19/35 (54,3%) e 10/35 (28,5%), respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12. Frequência de proveniência das amostras de hemocultura no Hospital Central de Maputo.

Departamento	N	Frequência (%)
Pediatria	19	54,3
Medicina	10	28,5
Cirurgia	4	11,4
Ginecologia e Obstetrícia	1	2,9
Sem identificação	1	2,9

10.2. Frequências de bactérias Gram-negativas identificadas em amostras de origem humana e animal

Um total de 184 amostras, das quais 35 (19%) de origem humana e 149 (81%) de origem animal (60 de carne de gado bovino, 60 de carcaças de frango e 29 de fezes de frango), foram analisadas no estudo (Tabela 13).

Do total de 184 amostras analisadas no presente estudo com foco em bactérias Gram-negativas, 62 isolados foram de *E. coli* (2 foram obtidas de placas de hemocultura humanas, e 60 isolados foram obtidos de carne de gado bovino, carcaças de frango e fezes de frango), 53 estirpes de *K. pneumoniae* (19 obtidas de placas de hemocultura humanas, 14 de carne de gado bovino, 15 de carcaças de frango e 5 fezes de frango), e 44 estirpes de *P. aeruginosa* (1 obtido de placas de hemocultura humanas, 20 de carne de gado bovino, 19 de carcaças de frango e 4 fezes de frango). Adicionalmente foram isoladas nestas amostras de origem animal e humana outras espécies de bactérias Gram-negativas, incluindo *Erwinia* spp., *Serratia odorifera*, *Serratia lifaciences*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae* e *Kluyvera* spp., *Klebsiella oxytoca*, *Raoultella ornithinolytica*, *Pseudomonas luteola* e *Cronobacter* spp. (Tabela 13).

Tabela 13. Frequência de espécies de bactérias Gram-negativas provenientes de amostras de fonte humana e animal.

Fontes das amostras	n de amostras	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Outras espécies de BGN
Placas de hemocultura humanas	35	2 (5,7%)	19 (68,6%)	1 (2,9%)	8 (22,8%) (<i>Erwinia</i> spp., <i>S. odorifera</i> , <i>S. lifaciences</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>E. cloacae</i> e <i>Kluyvera</i> spp.)
Carne de Gado bovino	60	20 (33,3%)	14 (23,3%)	20 (33,3%)	6 (10%) (<i>K. oxytoca</i> e <i>R. ornithinolytica</i>)
Carcaças de frango	60	20 (33,3%)	15 (25%)	19 (31,7%)	6 (10%) (<i>R. ornithinolytica</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. luteola</i> e <i>Cronobacter</i> spp.)
Fezes de frango	29	20 (69%)	5 (17,2%)	4 (13,8%)	Sem outras espécies identificadas
Total	184	62 (33,7%)	53 (28,8%)	44 (23,9%)	20 (42,8%)

10.3. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em amostras de origem humana e animal

10.3.1. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Escherichia coli*

Um total de 62 isolados de *E. coli*, sendo 2 (3,2%) de origem humana e 60 (96,8%) de origem animal (20 isolados foram obtidos de amostras de carne de gado bovino, e 20 de amostras de carcaças e 20 fezes de frango), foram testados para avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Os 2 isolados de *E. coli* de origem humana foram resistentes para todos os 14 antibióticos testados no presente estudo.

Do total de 20 isolados de *E. coli* obtidos em amostras de carne de gado bovino, 20 (100%) mostraram altas taxas de resistência para ampicilina, 19 (95%) amoxicilina-ácido clavulânico, e estirpes não susceptíveis, 16 (80%) amicacina e 13 (65%) ceftriaxona e ceftazidima, e 11 (55%)

para cefepima. A alta taxa de sensibilidade foi observada para ertapenem 20 (100%), 19 (95%) imipenem e meropenem, 16 (80%) tetraciclina, 13 (65%) sulfametoxazol-trimetoprima, e 11 (55%) para gentamicina e azitromicina (Figura 11).

Um total de 17/20 (85%) de isolados de *E. coli* obtidos de carne de gado bovino foi multidroga-resistente.

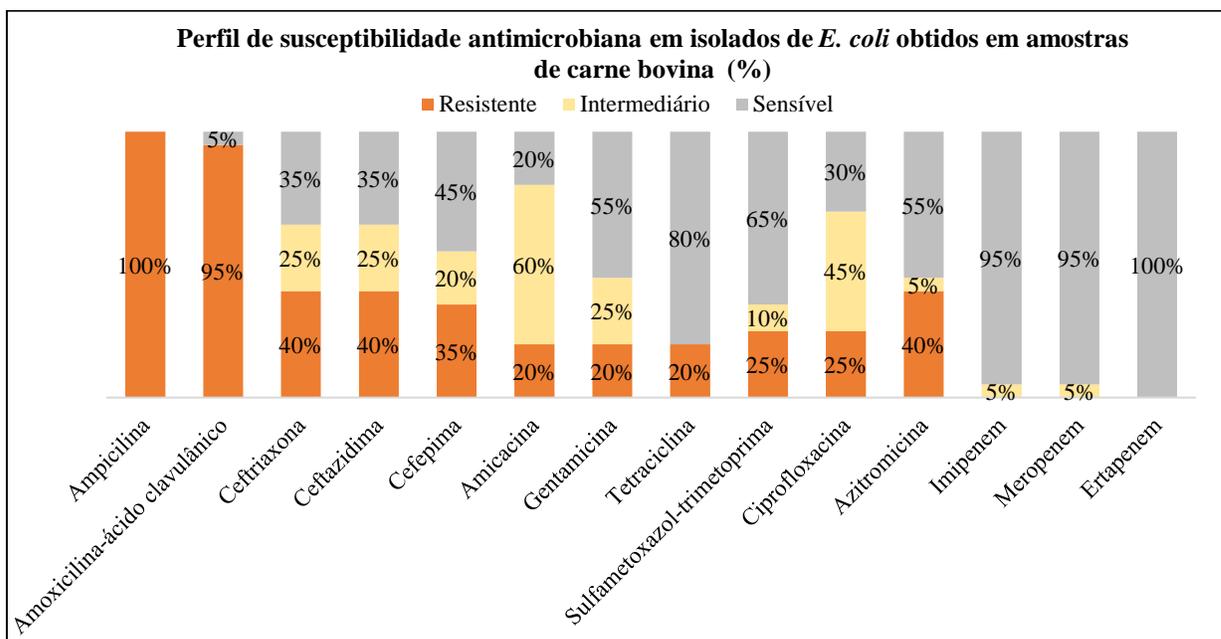


Figura 11. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *E. coli* isolados em amostras de carne de gado bovino provenientes do Matadouro, cidade de Maputo.

Do total dos 20 isolados de *E. coli* obtidos em amostras de carcaças de frango, 20 (100%) mostraram altas taxas de resistência para ciprofloxacina, 17 (85%) sulfametoxazol-trimetoprima, 16 (80%) tetraciclina, 14 (70%) ampicilina e amoxicilina-ácido clavulânico, 10 (50%) azitromicina. A maioria de estirpes não susceptíveis de *E. coli* foi observada para amicacina 19 (95%). A alta taxa de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *E. coli* foi observada para imipenem, meropenem e ertapenem 19 (95%), ceftazidima e cefepima 13 (65%), ceftriaxona e gentamicina 12 (60%) (Figura 12).

Um total de 20 (100%) de isolados de *E. coli* obtidos em amostras de carcaças de frango foi multidroga-resistente.

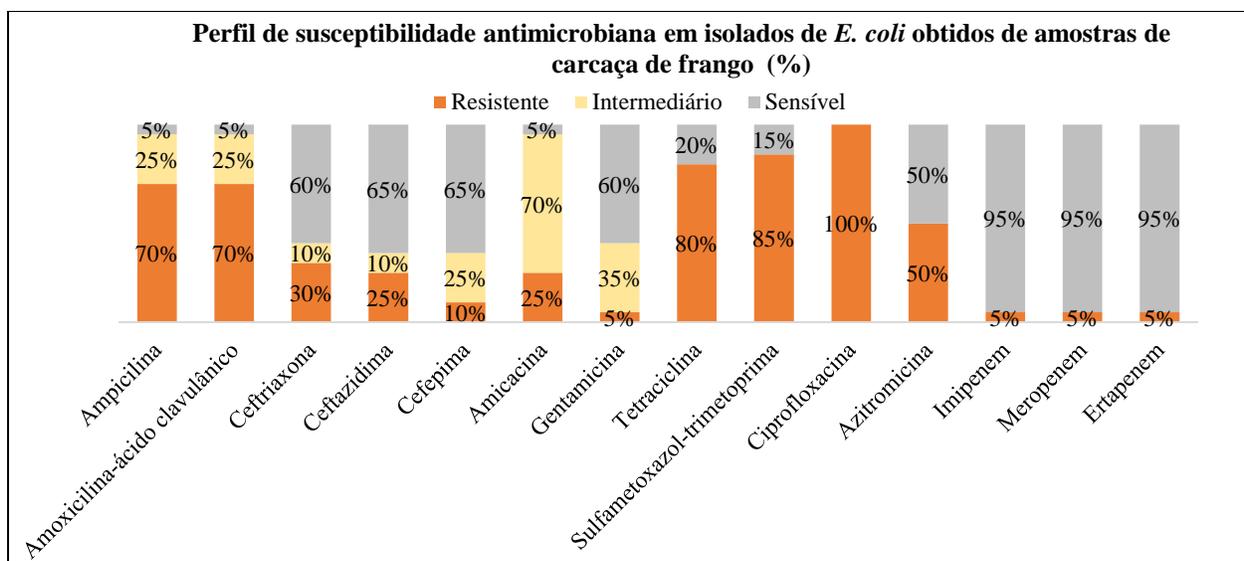


Figura 12. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *E. coli* isolados em amostras de carcaça de frango provenientes do mercado Fajardo, cidade de Maputo.

Para os 20 isolados de *E. coli* obtidos de amostras de fezes de frango, observou-se altas taxas de resistência (ou estirpes não susceptíveis) para ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprima, amicacina, gentamicina, ciprofloxacina e tetraciclina 18 (90%), ceftriaxona e ceftazidima 17 (85%), amoxicilina-ácido clavulânico 16 (80%), e cefepima e azitromicina 15 (75%). A alta taxa de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *E. coli* foi observada para imipenem, meropenem e ertapenem 16 (80%) (Figura 13).

Todos os 20 (100%) isolados de *E. coli* obtidos de amostras de fezes de frango foram multidroga-resistente.

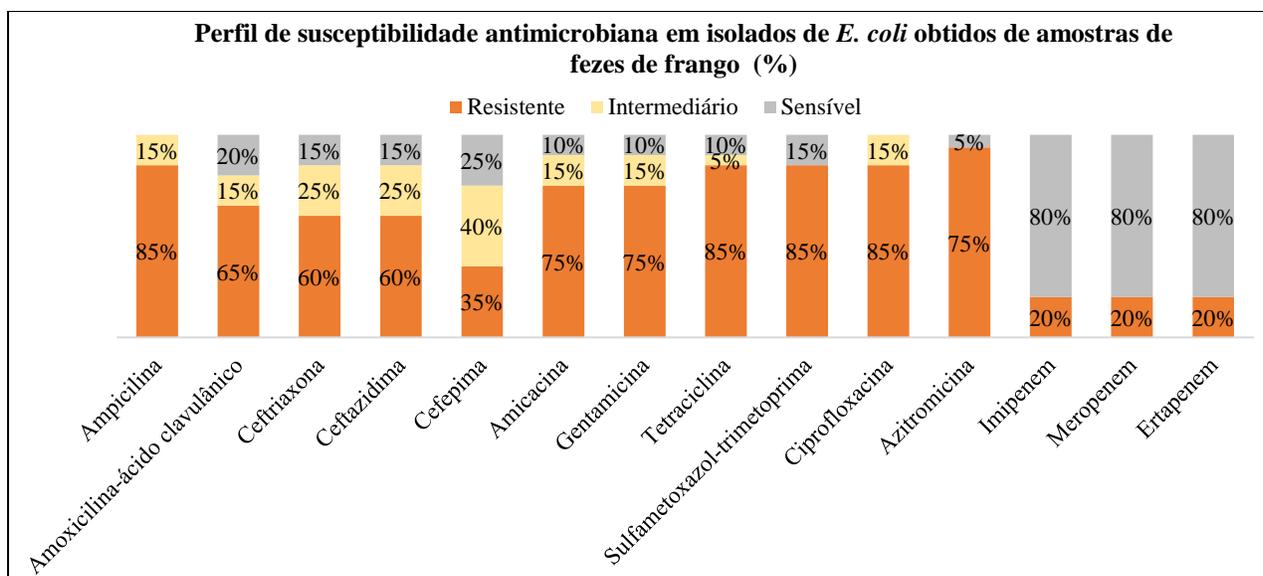


Figura 13. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *E. coli* isolados em amostras de fezes de frango provenientes do mercado Fajardo, cidade de Maputo.

10.3.2. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae*

Um total de 53 isolados de *K. pneumoniae*, dos quais 19 (35,8%) de origem humana e 34 (64,2%) de origem animal (14 isolados obtidos de amostras de carne de gado bovino e 15 de amostras de carcaça e 5 de fezes de frango), foram testados para avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Os 19 isolados de *K. pneumoniae* obtidos em amostras de placas de hemocultura mostraram altas taxas de resistência para ampicilina, ceftriaxona, sulfametoxazol-trimetoprima e azitromicina 19 (100%), amoxicilina-ácido clavulânico, ceftazidima, cefepima e ciprofloxacina 18 (94,7%), tetraciclina 16 (84%), gentamicina 15 (79%) e não susceptível para amicacina 18 (94,7%). A alta taxa de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *K. pneumoniae* foi observada para imipenem, meropenem e ertapenem 14 (73,7%) (Figura 14).

Todos os 19 (100%) isolados de *K. pneumoniae* obtidos de placas de hemocultura colhidas no LM-HCM foram multidroga-resistente.

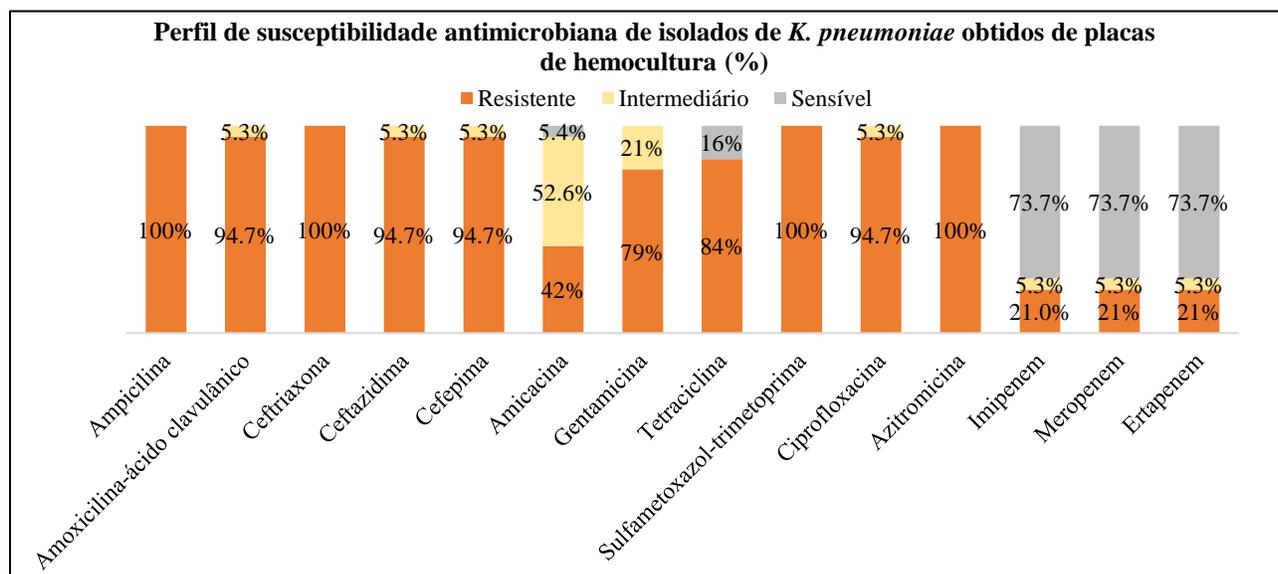


Figura 14. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *K. pneumoniae* isolados em placas de hemocultura colhidas no Laboratório de Microbiologia do Hospital Central de Maputo.

Os 14 isolados de *K. pneumoniae* obtidos em amostras de gado bovino, mostraram altas taxas de resistência para ampicilina e azitromicina 13 (95%), amoxicilina ácido-clavulânico 10 (70%), e estirpes não susceptível, 11 (80%) para amicacina e ciprofloxacina 13 (95%). A alta taxa de sensibilidade foi observada para a maior parte dos antibióticos testados, nomeadamente: tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima 11 (80%), imipenem, meropenem e ertapenem 10 (75%), cefepima e gentamicina 9 (65%) e ceftriaxona e ceftazidima 8 (60%) (Figura 15).

Um total de 13/14 (92,9%) isolados de *K. pneumoniae* obtidos em amostras de gado bovino foi multidroga-resistente.

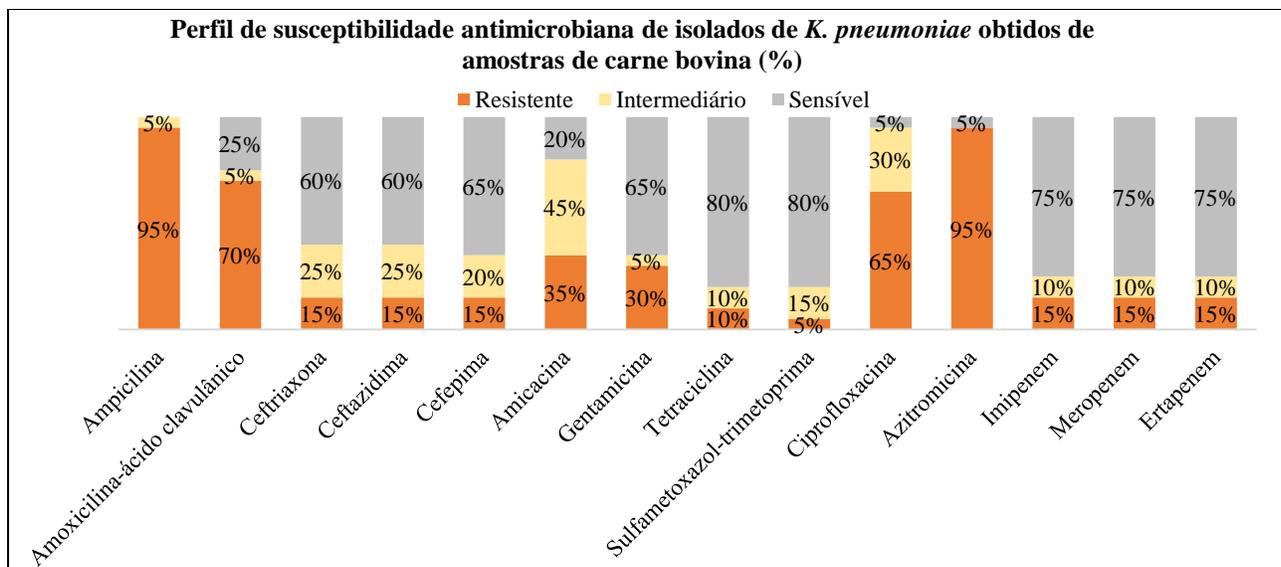


Figura 15. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *K. pneumoniae* isolados em amostras de carne de gado bovino provenientes do Matadouro, cidade de Maputo.

Os 15 isolados de *K. pneumoniae* obtidos em amostras de carcaça de frango, mostraram altas taxas de resistência para ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, tetraciclina, ciprofloxacina e azitromicina 15 (100%), amicacina 13 (86,7%), sulfametoxazol-trimetoprima 12 (80%) e gentamicina 9 (60%). As altas taxas de isolados de *K. pneumoniae* não susceptíveis foram observadas para ceftriaxona, ceftazidima e cefepima 13 (86,6%), imipenem, meropenem e ertapenem 8 (53,3%) (Figura 16).

Um total de 15 (100%) isolados de *K. pneumoniae* obtidos de amostra de carcaça de frango foi multidroga-resistente.

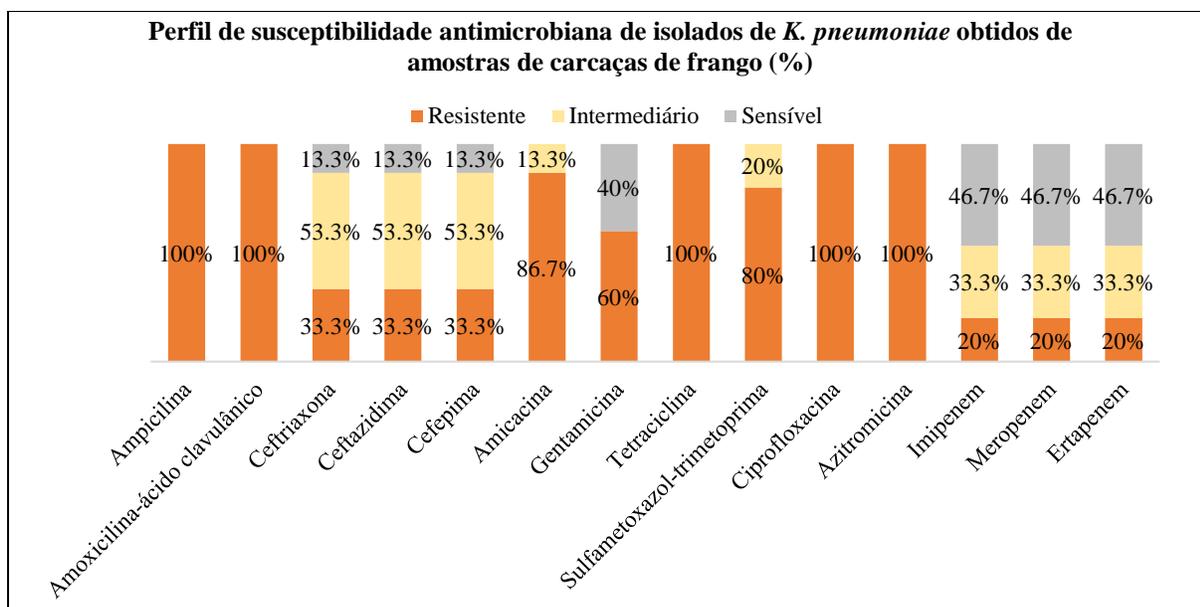


Figura 16. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *K. pneumoniae* isolados em amostras de carcaça de frango provenientes do mercado Fajardo, cidade de Maputo.

Relativamente aos 5 isolados de *K. pneumoniae* obtidos em amostras de fezes de frango, estes mostraram altas taxas de resistência para ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprima, ciprofloxacina e azitromicina 5 (100%), e estirpes não susceptíveis, amicacina e gentamicina 4 (80%). A alta taxa de isolados de *K. pneumoniae* com perfil intermediário foi observada para ceftriaxona, ceftazidima, cefepima, imipenem, meropenem e ertapenem 2 (60%) (Figura 17).

Todos os 5 (100%) isolados de *K. pneumoniae* obtidos de amostras de fezes de frango foram multidroga-resistente.

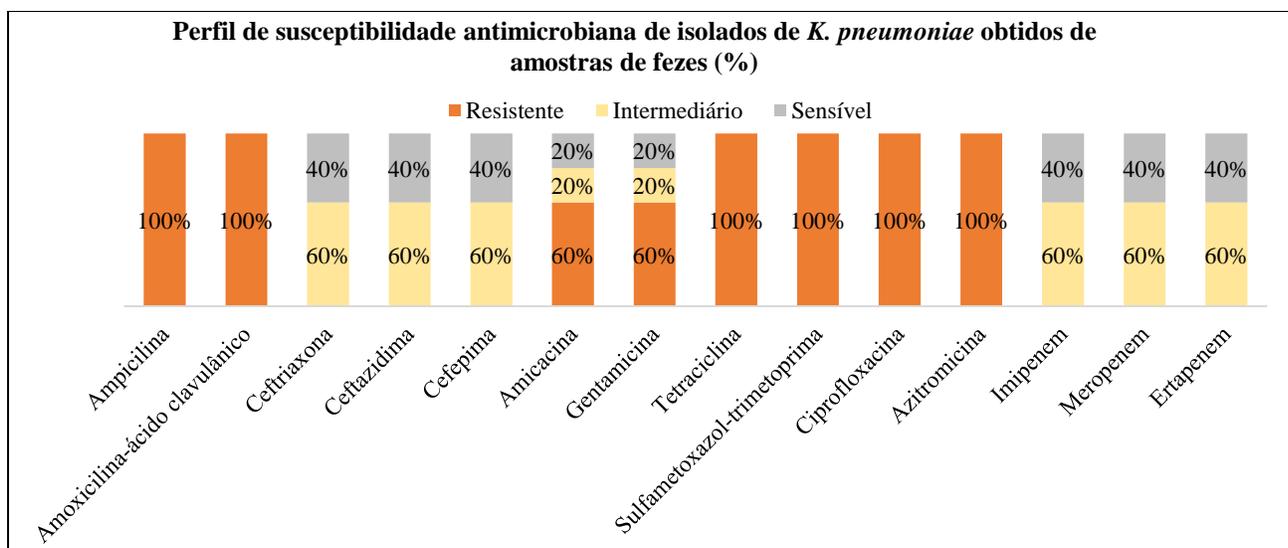


Figura 17. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *K. pneumoniae* isolados em amostras de fezes de frango provenientes do mercado Fajardo, cidade de Maputo.

10.3.3. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa*

Um total de 44 isolados de *P. aeruginosa*, dos quais 1 (2,3%) de origem humana e 43 (97,8%) de origem animal (20 foram isolados de amostras de carne de gado bovino, 19 de amostras de carcaça e 4 fezes de frango), foram também incluídos no teste do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

O único isolado de *P. aeruginosa* (100H) de origem humana foi resistente para todos os 7 antibióticos testados no presente estudo de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2023).

Do total de 20 isolados de *P. aeruginosa* obtidos em amostras de carne bovina, 20 (100%) mostraram altas taxas de resistência para sulfametoxazol-trimetoprima, 19 (95%) ceftazidima, seguida de isolados com perfil intermediário: ertapenem 19 (95%) e ciprofloxacina 18 (80%). As altas taxas de isolados de *P. aeruginosa* não susceptíveis foram observadas para amicacina e gentamicina 13 (65%). No que concerne à sensibilidade, as altas frequência apenas foram observadas para piperacilina-tazobactam 19 (95%) (Figura 18).

Um total de 19 (95%) isolados de *P. aeruginosa* obtidos de carne bovina foi multidroga-resistente.

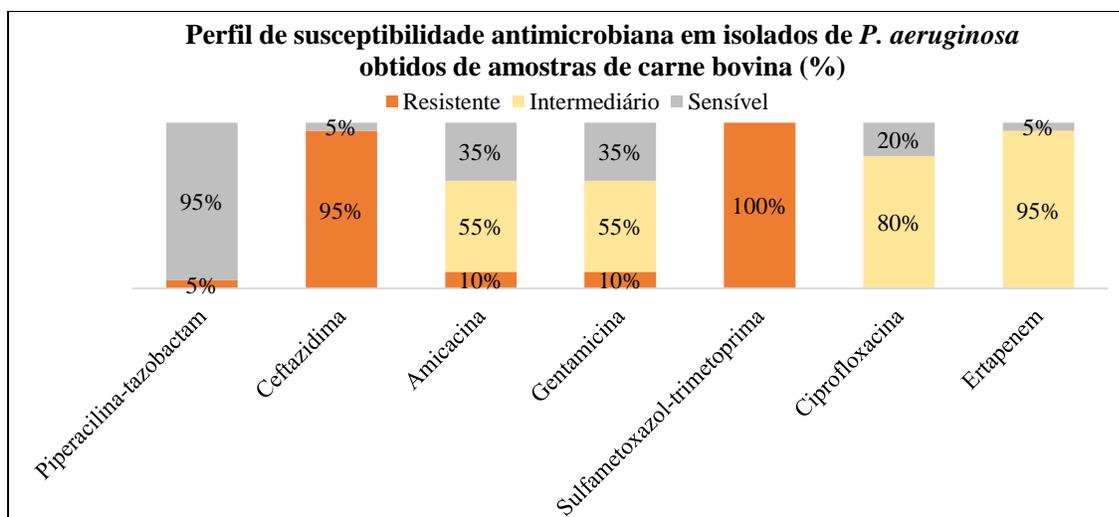


Figura 18. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *P. aeruginosa* isolados em amostras de carne de gado bovino provenientes do Matadouro, cidade de Maputo.

Os 20 isolados de *P. aeruginosa* obtidos em amostras de carcaça de frango, mostraram altas taxas de resistência para ceftazidima, sulfametoxazol-trimetoprima e ertapenem 20 (100%), 14 (70%) piperacilina-tazobactam e 11 (55%) ciprofloxacina. Adicionalmente, observamos a mesma taxa de isolados de *P. aeruginosa* sensíveis e não susceptíveis para amicacina e gentamicina 10 (50%) (Figura 19).

Todos os 20 (100%) isolados de *P. aeruginosa* obtidos de amostras de carcaça de frango foram multidroga-resistente.

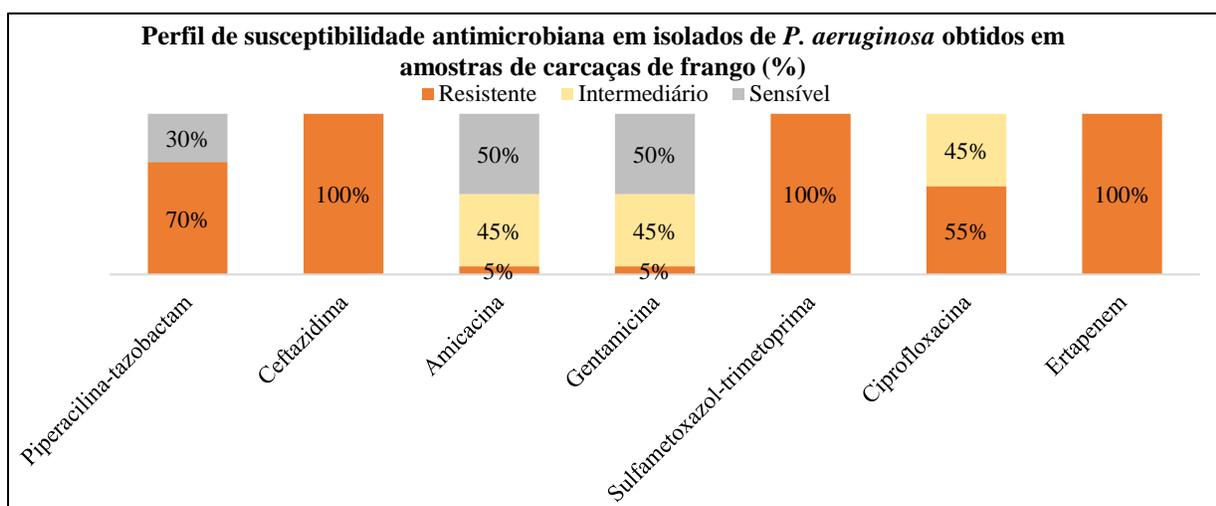


Figura 19. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *P. aeruginosa* isolados em amostras de carcaça de frango provenientes do mercado Fajardo, cidade de Maputo.

Os 4 isolados de *P. aeruginosa* obtidos em amostras de fezes de frango, mostraram alta taxa de resistência para ceftazidima e sulfametoxazol-trimetoprima 4 (100%), ertapenem 3 (75%) e piperacilina-tazobactam 2 (50%). Todos os isolados de *P. aeruginosa* 4 (100%) foram sensíveis para amicacina e gentamicina (Figura 20).

Todos os 4 (100%) isolados de *P. aeruginosa* obtidos de amostras de fezes de frango foram multidroga-resistente.

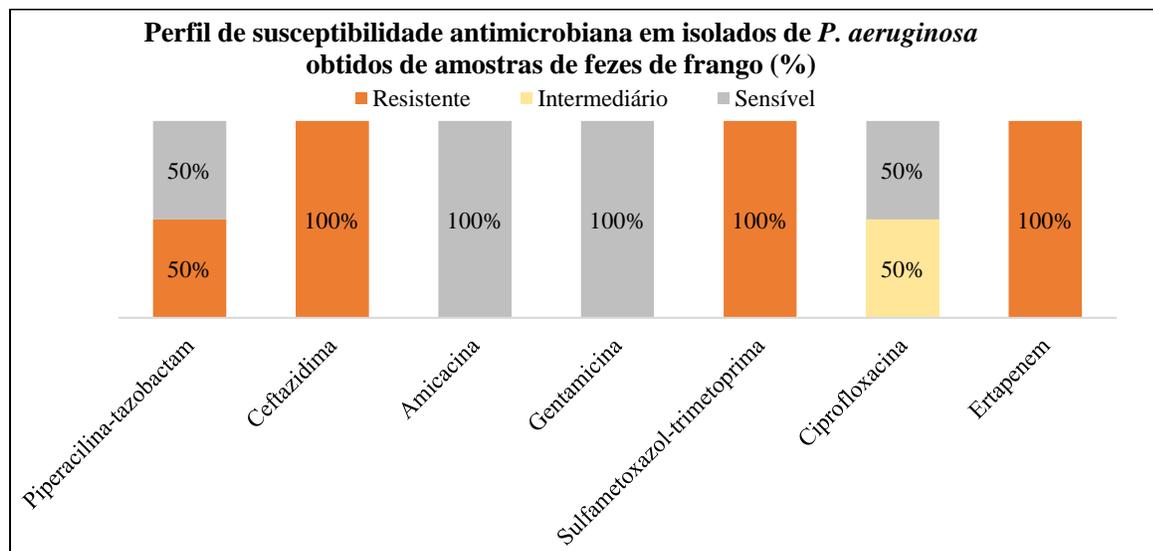


Figura 20. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *P. aeruginosa* isolados em amostras de fezes de frango provenientes do mercado Fajardo, cidade de Maputo.

10.4. Detecção dos genes de resistência *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* obtidos de amostras de origem humana e animal

A detecção dos genes de resistência para os antibióticos β -lactâmicos (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}), apenas foi feita para isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* obtidos em amostras de hemocultura, carne de gado bovino, carcaça e fezes de frango no presente estudo.

10.4.1. Frequência dos genes de resistência *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} em isolados de *Escherichia coli*

Em ambos isolados de *E. coli* obtidos de hemocultura foi detectado o gene *bla*_{TEM} e negativos para o gene *bla*_{SHV}. O gene *bla*_{CTX-M} foi detectado em apenas um isolado (105H) (Tabela 14).

Para os 20 isolados de *E. coli* obtidos de amostras de carne bovina provenientes do matadouro da cidade de Maputo, foi detectado o gene *bla*_{TEM} em 1 (5%) e todos os outros isolados foram negativos para os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} (Tabela 14).

A detecção dos genes que codificam para β -lactamases em 20 isolados de *E. coli* obtidos de carcaças de frango provenientes do mercado Fajardo, revelou a presença do gene *bla*_{TEM} 7/20 (35%) e todos foram negativos para os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} (Tabela 14).

No que concerne aos 20 isolados de *E. coli* obtidos de amostras de fezes de frango provenientes do mercado Fajardo, não detectamos nenhum gene *bla*_{SHV}. Entretanto, nos restantes isolados de *E. coli*, detectamos o gene *bla*_{CTX-M} em 2 (10%) isolados (41F e 31F) e o gene *bla*_{TEM} em 4 (20%) isolados. Todos os isolados foram negativos para o gene *bla*_{SHV} (Tabela 14).

Os isolados de *E. coli* obtidos de hemocultura, carcaças e fezes de frango, apresentaram na sua maioria o gene *bla*_{TEM} 14 (22,6%), seguido de *bla*_{CTX-M} 3 (4,8%), respectivamente.

A coexistência dos genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM} apenas foi observada em 2/62 (3,2%) isolados de *E. coli* obtidos de humanos (105H) e fezes de frangos (31F).

Os resultados do presente estudo mostram uma concordância entre a resistência aos antibióticos β -lactâmicos e a presença dos determinantes de resistência para esta classe de antibióticos em alguns isolados. Um total de 39/62 (62,9%) isolados de *E. coli* apesar de terem sido resistentes para pelo menos uma classe de antibióticos β -lactâmicos, nenhum gene dos três testados (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}) foi detectado, sugerindo a presença de outros mecanismos de resistência.

Tabela 14. Perfil de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e detecção dos determinantes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} em *E. coli* provenientes de amostras de origem humana e animal.

Código de isolado de <i>E. coli</i>	Origem (fonte) do isolado	Perfil de resistência aos β -lactâmicos	Determinantes de resistência associados aos β -lactâmicos detectados		
			<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}
101H	Humana	AMP-AMC-CRO-CAZ-FEP-IPM-MEM-ETP	-	+	-
105H	Humana		+	+	-
Sub-total <i>n</i> genes detectados			1/2 (50%)	2/2 (100%)	0%
22B, 39B, 51B, 54B, 60B, 67B, 71B, 76B e 77B	Gado bovino	AMP-AMC	-	-	-
24B, 37B e 47B	Gado bovino	AMP	-	-	-
57B, 61B, 65B, 66B, 68B e 78B	Gado bovino	AMP-AMC-CRO-CAZ-FEP	-	-	-
70B	Gado bovino	AMP-AMC-CRO-CAZ	-	-	-
79B	Gado bovino	AMP-AMC-CRO-CAZ-FEP	-	+	-
Sub-total <i>n</i> genes detectados			0%	1/20 (5%)	0%
55C, 67C, 69C, 70C	Carcaça de frango	AMP-AMC	-	-	-
56C, 58C, 61C, 63C e 81C	Carcaça de frango	AMP-AMC	-	+	-
66C	Carcaça de frango	CRO	-	-	-
71C e 79C	Carcaça de frango	AMP-AMC-CRO-CAZ	-	+	-
72C e 75C	Carcaça de frango	AMP-AMC-CRO-CAZ	-	-	-
85C	Carcaça de frango	AMP-AMC-CRO-CAZ-FEP	-	-	-
59C, 60C, 64C, 65C e 68C	Carcaça de frango	-	-	-	-
Sub-total <i>n</i> genes detectados			0%	7/20 (35%)	0%
97F	Fezes de frango	AMP-AMC-CRO-CAZ-FEP-IPM	-	-	-
117F, 123F e 20F	Fezes de frango	AMP-AMC-CRO-CAZ	-	-	-
118F e 142F	Fezes de frango	AMP-AMC	-	-	-
1F e 129F	Fezes de frango	AMP-AMC-CRO-CAZ-FEP	-	+	-
148F	Fezes de frango	AMP-AMC	-	+	-
180F	Fezes de frango	AMP-CRO-CAZ-IPM-MEM-ETP	-	-	-
192F e 200F	Fezes de frango	AMP-AMC-CRO-CAZ-IPM-MEM-ETP	-	-	-
14F	Fezes de frango	AMP-AMC-CRO-CAZ	+	-	-
31F	Fezes de frango	AMP-AMC	+	+	-
70F	Fezes de frango	AMP	-	-	-
79F e 91F	Fezes de frango	AMP-CRO-CAZ-FEP	-	-	-
194F, 223F e 85F	Fezes de frango	-	-	-	-
Sub-total <i>n</i>(%) genes detectados			2/20 (10%)	4/20 (20%)	0%
Total <i>n</i>(%) dos genes detectados			3/62 (4,8%)	14/62 (22,6%)	0

Legenda: (-) negativo e (+) positivo; Antibióticos: AMP-Ampicilina, AMC-Amoxicilina-ácido clavulânico, CRO-Ceftriaxona, CAZ-Ceftazidima, FEP-Cefepima, IPM-Imipenem, MEM-Meropenem e ETP-Ertapenem.

10.4.2. Frequência dos genes de resistência *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} em *K. pneumoniae*

Do total de 19 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de amostras humanas, incluídos no estudo, a maioria 18 (94,7%) apresentou os três genes de resistência aos antibióticos β-lactâmicos enquanto 2 isolados (83H e 87H) foram positivos apenas para (*bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}) e (*bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV}), respectivamente (Tabela 15).

Entretanto, do total de 14 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de amostras de carne de gado bovino, incluídos no estudo, detectamos o gene *bla*_{SHV} em 7 (50%) isolados e todos foram negativos para os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM} (Tabela 15).

Para os 15 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de carcaças de frango, o gene *bla*_{TEM} foi detectado em 5 (33,3%) estirpes e o gene *bla*_{SHV} em 10 (66,7%) estirpes, e todas foram negativos para o gene *bla*_{CTX-M} (Tabela 15).

Do total de 5 isolados de *K. pneumoniae* obtidos de amostras de fezes de frango foi detectado o gene *bla*_{TEM} em 4 (80%) estirpes e *bla*_{SHV} em todas as 5 (100%) estirpes. Todos os isolados foram negativos para o gene *bla*_{CTX-M} (Tabela 15).

Os isolados de *K. pneumoniae* obtidos de hemocultura, gado bovino, carcaças e fezes de frango, apresentaram na sua maioria o gene *bla*_{SHV} 41 (77,4%), seguido de *bla*_{TEM} 27 (50,9%), respectivamente.

A coexistência dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} apenas foi observada em 1/19 (5,3%) isolado de *K. pneumoniae* obtido de humanos, 4/15 (26,6%) obtidos de carcaça de frango e 4/5 (80%) obtidos de fezes de frango. A coexistência dos três genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} foi observada em 17/19 (89,5%) isolados de *K. pneumoniae* em amostras humanas.

Os resultados da caracterização molecular dos determinantes de resistência aos antibióticos β-lactâmicos em isolados de *K. pneumoniae* mostram uma concordância com o perfil fenotípico para esta classe de antibióticos com a exceção do isolado (369BK), que não foi resistente a nenhum antibiótico β-lactâmico, mas foi detectado o gene *bla*_{SHV}. Todavia, um total de 11/53 (20,7%) isolados de *K. pneumoniae* apesar de terem sido resistentes a pelo menos uma classe de antibióticos β-lactâmicos, nenhum gene dos três testados (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}) foi detectado.

Tabela 15. Frequência dos determinantes de resistência antibióticos β -lactâmicos em *K. pneumoniae* provenientes de amostras de origem humana e animal.

Código de isolado de <i>K. pneumoniae</i>	Origem do isolado	Perfil de resistência aos β -lactâmicos	Determinantes de resistência associados aos β -lactâmicos		
			<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}
76H, 78H, 80H, 82H, 84H, 85H, 86H, 88H, 89H, 92H, 95H, 97H e 99H	Humana	AMP-AMC-CRO-CAZ-FEP	+	+	+
83H	Humana	AMP-AMC-CRO-CAZ-FEP-IPM-MEM-ETP	-	+	+
87H	Humana	AMP-AMC-CRO	+	-	+
77H, 79H e 96H	Humana	AMP-AMC-CRO-CAZ-FEP-IPM-MEM-ETP	+	+	+
98H	Humana	AMP-CRO-CAZ-FEP	+	+	+
Sub-total <i>n</i> genes detectados			18/19 (94,7%)	18/19 (94,7%)	19/19 (100%)
369BK	Gado bovino	Nenhum	-	-	+
374BK, 383BK e 401BK	Gado bovino	AMP-AMC-IPM-MEM-ETP	-	-	-
375BK, 376BK, 384BK e 405BK	Gado bovino	AMP-AMC	-	-	+
378BK, 393BK e 397BK	Gado bovino	AMP-AMC	-	-	-
395BK	Gado bovino	AMP	-	-	-
380BK e 398BK	Gado bovino	AMP	-	-	+
Sub-total <i>n</i> genes detectados			0%	0%	7/14 (50%)
91CK	Carcaça de frango	AMP-AMC-CRO-CAZ-FEP-IPM-MEM-ETP	-	+	+
92CK, 108CK e 109CK	Carcaça de frango	AMP-AMC	-	-	+
93CK, 103CK e 104CK	Carcaça de frango	AMP-AMC	-	-	-
94CK	Carcaça de frango	AMP-AMC-CRO-CAZ-FEP-IPM-MEM-ETP	-	-	-
96CK, 106CK e 107CK	Carcaça de frango	AMP-AMC	-	+	+
100CK	Carcaça de frango	AMP-AMC-CRO-CAZ-FEP-IPM-MEM-ETP	-	-	+
282CK	Carcaça de frango	AMP-AMC	-	+	-
283CK e 284CK	Carcaça de frango	AMP-AMC-CRO-CAZ-FEP	-	-	+
Sub-total <i>n</i> genes detectados			0%	5/15 (33,3%)	10/15 (66,6%)
167FK	Fezes de frango	AMP-AMC	-	-	+
173FK, 283FK, 284FK e 40FK	Fezes de frango	AMP-AMC	-	+	+
Sub-total <i>n</i> genes detectados			0%	4/5 (80%)	5/5 (100%)

Total n(%) genes detectados	0%	27/53 (50,9%)	41/53 (77,4%)
------------------------------------	----	------------------	------------------

Legenda: (-) negativo e (+) positivo; Antibióticos: AMP-Ampicilina, AMC-Amoxicilina-ácido clavulânico, CRO-Ceftriaxona, CAZ-Ceftazidima, FEP-Cefepima, IPM-Imipenem, MEM-Meropenem e ETP-Ertapenem.

10.5. Comparação do perfil de susceptibilidade aos antibióticos em isolados provenientes de fontes humanas e animais

Os isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* provenientes de amostras de fontes humanas e animais apresentaram elevadas frequências de resistência para a maioria dos antibióticos testados. Na tabela abaixo (Tabela 16), apresenta-se a comparação das frequências de susceptibilidade aos antibióticos das três espécies incluídas no estudo, onde se observa elevadas frequências de resistência de isolados de origem humana relativamente aos isolados de origem animal. Relativamente aos isolados de origem animal, as baixas frequências de resistência foram observadas em *E. coli* e *P. aeruginosa*, principalmente para antibióticos carbapenémicos e aminoglicosídeos, respectivamente, destacados com a cor cinzenta na Tabela 16. Os isolados das três espécies obtidas de frangos tanto da carcaça assim como das fezes apresentaram a mesma tendência de resistência (altas frequências) para os diferentes antibióticos.

Tabela 16. Comparação do perfil de resistência antimicrobiana em isolados provenientes de amostras de origem humana e animal.

Classes de antibióticos	Perfil de resistência antimicrobiana					
	Fonte humana			Fonte animal		
	<i>E. coli</i> (%)	<i>K. pneumoniae</i> (%)	<i>P. aeruginosa</i> (%)	<i>E. coli</i> (%)	<i>K. pneumoniae</i> (%)	<i>P. aeruginosa</i> (%)
Aminoglicosídeos	100	42 a 79	100	Cb: 20 Cf: 5 a 25 Ff: 75	Cb: 35 a 80 Cf: 60 a 86,7 Ff: 60	Cb: 10 Cf: 5 Ff: 0
Carbapenémicos	100	21	100	Cb: 5 Cf: 5 Ff: 20	Cb: 15 Cf: 20 Ff: 60	Cb: 95 Cf: 100 Ff: 100
Cefalosporinas	100	94,7	100	Cb: 35 a 40 Cf: 10 a 30 Ff: 35 a 60	Cb: 15 Cf: 33,3 Ff: 60	Cb: 95 Cf: 100 Ff: 100
Fluoroquinolonas	100	94,7	100	Cb: 25 Cf: 100 Ff: 85	Cb: 95 Cf: 100 Ff: 100	Cb: 80 Cf: 55 Ff: 50

Macrolídeos	100	100	100	Cb: 40 Cf: 50 Ff: 75	Cb: 95 Cf: 100 Ff: 100	Não testado
Penicilinas	100	94,7 a 100	100	Cb: 95 a 100 Cf: 70 Ff: 65 a 85	Cb: 70 a 95 Cf: 100 Ff: 100	Cb: 5 Cf: 70 Ff: 50
Sulfonamidas	100	100	100	Cb: 25 Cf: 85 Ff: 85	Cb: 20 Cf: 80 Ff: 100	Cb: 100 Cf: 100 Ff: 100
Tetraciclina	100	84	100	Cb: 20 Cf: 80 Ff: 85	Cb: 20 Cf: 100 Ff: 100	Não testado

Legenda: Cb-carne bovina, Cf-carça de frango e Ff- fezes de frango.

11. Discussão

11.1. Espécies de bactérias Gram-negativas isoladas em amostras de origem humana e animal

No presente estudo foi identificada alta frequência de *K. pneumoniae* (68,6%) em placas de hemocultura que podem estar associadas a infecções invasivas. Outras espécies de BGN identificadas, incluem *E. coli* (5,7%), *P. aeruginosa* (2,9%), *Erwinia* spp. (5,7%), *Serratia odorífera* (2,9%), *Serratia lifaciences* (2,9%), *A. baumannii* (2,9%), *E. cloacae* (5,7%) e *Kluyvera* spp. (2,9%), sendo que estas últimas 6 espécies não foram analisadas no presente estudo. A maioria de isolados de BGN foi obtida de pacientes do sexo feminino (63%), com idade superior a 18 anos (37%) internados nos Departamentos de Medicina e Pediatria com 28,5% e 54,3%, respectivamente.

Estudos anteriores sobre infecções hospitalares realizados no Hospital Central de Maputo (HCM), são consistentes com os resultados obtidos no presente estudo, tendo reportado *Klebsiella* spp. (34,7%), *E. coli* (31,5%) e *Proteus* spp. (10%), em pacientes internados provenientes dos Departamentos de Pediatria e Medicina, o que mostra a importância de *K. pneumoniae* e outras BGN em infecções invasivas (Monteiro *et al.*, 2015).

Estudo realizado por Mahaluça *et al.* (2019) em pacientes pediátricos e adultos do HCM, reportou maior prevalência de *K. pneumoniae* (43%) e apenas 15% para *E. coli* no Departamento de Pediatria. Adicionalmente, na mesma unidade hospitalar realizou-se um outro estudo que incluiu amostras de infecções nosocomiais, tendo observado *K. pneumoniae* em 7%, *E. coli* em 20% e *Pseudomonas* spp. em 15% das amostras analisadas. *K. pneumoniae* foi observada apenas em 16% de isolados do Departamento de Pediatria (Sumbana *et al.*, 2022). E, neste último estudo, foi reportada uma emergência de *K. pneumoniae* hipervirulenta em 36 isolados, principalmente nos Departamentos de Pediatria e Medicina do HCM (Sumbana *et al.*, 2023).

Um estudo realizado no Hospital Distrital da Manhica a ~90 Km da cidade de Maputo, que analisou infecções bacterianas, observou uma frequência de *Klebsiella* spp. (2,1%, 88/4270) e destes, 72,7% foram positivos para *K. pneumoniae* (Massinga *et al.*, 2021), evidenciando que *K. pneumoniae* é um agente importante de infecções invasivas no país.

Na África Subsaariana, um estudo sobre infecções invasivas realizado em oito hospitais, reportou 44,8% de infecções em neonatos e crianças causadas por *K. pneumoniae* e 25,5% por *E. coli* (Aiken *et al.*, 2023). Um outro estudo recente de revisão sistemática e meta-análise das infecções bacterianas invasivas na África Subsaariana revelou *Klebsiella* spp. e *E. coli* como agentes patogênicos mais frequentes (Mduma *et al.*, 2022).

Nas amostras de fontes animais (carnes bovinas, carcaças e fezes de frango), espécies de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* foram identificadas com frequências que variaram de 13,8% a 69%, demonstrando a probabilidade de contaminação por estes isolados. Todavia, outras espécies de BGN identificadas incluem, *K. oxytoca*, *R. ornithinolytica*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *P. luteola* e *Cronobacter* spp. com baixas frequências que variaram de 1,6 a 8,3%. Tendo sido *E. coli* a espécie predominante em todas as amostras analisadas, espécie esta que faz parte da microbiota destes animais.

A presença de espécies de bactérias, principalmente a *E. coli* em fontes animais incluindo alimentos de origem animal, tem sido reportada em vários países, e destaca-se pela sua contribuição na ocorrência de infecções zoonóticas, tais como enterite, infecção enterohemorrágica e Salmonellose (Abdel-Rahman, 2020). O que é consubstanciado pelo estudo realizado por Mupfunya *et al.* (2021) na vizinha África do Sul.

Os resultados que tendem a ser semelhantes aos nossos foram obtidos num estudo conduzido por Mensah *et al.* (2022), em Gana, onde 75 amostras de fontes animais (25 de carne de frango e 50 de fezes de frango) foram analisadas. Neste estudo reportou-se a presença de 32% (8) isolados de *E. coli* na carne de frango e 56,2% (28) nas fezes de frango.

Estudo similar em ambientes de aves e carnes a retalho desenvolvido na Nigéria, colheu 138 amostras, das quais, 86 amostras eram de carnes (bovina e frango) e 52 de fezes de frango, e constatou a presença de 43,5% (47) isolados de *E. coli* em amostras de carnes (bovina e frango), 15,7% (17) isolados de *E. coli* em amostras de fezes de frango e 32,3% (20) isolados de *K. pneumoniae* em amostras de carnes (bovina e frango) e 37,5% (24) de *K. pneumoniae* em amostras de fezes (Nsofor *et al.*, 2022), mostrando que estes agentes são comuns em fontes animais.

Ainda na Nigéria, o estudo sobre contaminação bacteriana em carnes para consumo, incluiu 46 amostras de gado bovino e reportou 8% de *E. coli*, 5,3% de *K. pneumoniae* e 2% de *P. aeruginosa* (Iroha *et al.*, 2010). Adicionalmente, outro estudo sobre contaminação bacteriana em carnes para consumo realizado em Gana, incluiu 32 amostras de carne de bovino, tendo reportado *E. coli* (30,5%), *K. pneumoniae* (22,2%) e *P. luteola* (50%) (Baah *et al.*, 2022), demonstrando que estas espécies são comumente encontradas em fontes de carnes bovinas.

Na África do Sul, um estudo analisou amostras de fezes de frango de corte, e constatou a presença de *E. coli* (60,7%, 91/140), *P. aeruginosa* (22,5%, 26/140) e *K. pneumoniae* (16,7%, 23/140) (Ramatla *et al.*, 2024). *E. coli* e *K. pneumoniae* constituem a microbiota normal do trato gastrointestinal dos animais, podendo gerar um risco potencial para a saúde humana através do consumo de alimentos contaminados (Ribeiro *et al.*, 2024).

O estudo realizado na Costa de Marfim em 2019, em amostras de carne de gado bovino (93), e amostras de peixe fresco e defumado (60), identificou um total de 60,8% (93/153) isolados de *P. aeruginosa* (Benie *et al.*, 2019).

Entretanto, em outro país de baixa e média renda concretamente no Irão, realizou um estudo que colheu 550 amostras de carne de gado bovino no matadouro, onde reportou 7,42% de isolados de *P. aeruginosa* (Poursina *et al.*, 2023).

Embora estudos sobre infecções bacterianas e resistência aos antimicrobianos em fontes animais sejam escassos em Moçambique, um estudo recente sobre análise genómica de resistência antibiótica em quatro pequenas fazendas, reportou 25 isolados de *E. coli* provenientes de amostras de fezes de gado bovino (Taviani *et al.*, 2021), mostrando a necessidade de vigilância contínua para o controlo da disseminação das estirpes resistentes.

Os agentes patogénicos bacterianos zoonóticos de origem alimentar são as principais causas de doença humana, com um grande peso nos países de baixa e média renda incluindo Moçambique. As espécies de *S. aureus*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *L. monocytogenes* e *E. coli* são os agentes patogénicos bacterianos comuns associados aos alimentos de origem animal, pois podem entrar na cadeia alimentar desde a produção de alimentos para animais até ao consumo final de produtos (Abebe *et al.*, 2020).

Apesar de existirem relatos sobre a prevalência de bactérias zoonóticas de origem alimentar associados a surtos, o peso destes agentes patogénicos ainda não é bem conhecido em Moçambique, havendo necessidade de realização de mais estudos (Abebe *et al.*, 2020).

11.2. Perfil de susceptibilidade aos antibióticos de bactérias Gram-negativas de origem humana

Os isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* obtidos de amostras de hemocultura mostraram altas frequências de resistências para todos os antibióticos testados, principalmente para aqueles da 1ª linha (cefalosporinas, penicilinas, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas e tetraciclina) usados para o tratamento de infeções variando de 79% e 100%. Todavia, as altas frequências de sensibilidade foram observadas para imipenem, meropenem e ertapenem (73,7%).

Os resultados reportados no presente estudo são consistentes com estudos anteriores realizados no HCM no qual foram analisadas 813 isolados de enterobacteriáceas e reportou-se altas taxa de resistência para amoxicilina, ceftazidima, gentamicina e nitrofurantoína em pacientes internados (Monteiro *et al.*, 2015).

Adicionalmente, o outro estudo realizado no HCM em pacientes pediátricos e adultos, observou que 15% (7/48) de isolados de *E. coli* foram 100% resistentes para ampicilina, amicacina e cotrimoxazole em pacientes pediátricos e 22% (6/27) foram resistentes a ceftazidima, ceftriaxona, gentamicina e ciprofloxacina em pacientes adultos. Ainda no mesmo estudo, constatou-se que 43% (20/48) de isolados de *K. pneumoniae* foram resistentes para amicacina (22,3%) e imipenem (7,1%) em pacientes pediátricos, e 15% (4/27) foram 100% resistentes para ampicilina, ceftriaxona, e cotrimoxazole em pacientes adultos (Mahaluça *et al.*, 2019), constituindo uma maior preocupação para a saúde porque alguns antibióticos (cefepima, amicacina e imipenem) são considerados de reserva para o tratamento de infeções multidroga-resistentes.

O estudo sobre etiologia de infeções invasivas em Moçambique desenvolvido no HCM, observou altas frequências de resistência de *K. pneumoniae*, sendo 82,8% (29/35) resistentes para amoxicilina-ácido clavulânico, 77% (27/35) para cefotaxima, ceftazidima e sulfametoxazol-trimetoprima, 74,3% (26/35) para gentamicina, 71,4% (25/35) para piperaciclina-tazobactam e ciprofloxacina, e apresentou sensibilidade para os carbapenémicos e amicacina, entretanto, um total de 80% (28/35) foi multidroga-resistente (Sumbana *et al.*, 2023).

Ainda no HCM, um estudo que incluiu 8 isolados de *P. aeruginosa*, constatou 38% dos isolados resistentes para amicacina, imipenem e ciprofloxacina e 63% foram resistentes a gentamicina e cefepima, com um total de 37,5% multidroga-resistentes (Manjate, 2023).

No Hospital Distrital da Manhica a ~90 Km de Maputo, um estudo realizado incluindo infecções bacterianas em crianças, observou também altas frequências de resistência de *Klebsiella* spp. para amoxicilina-ácido clavulânico (51,4%), ceftriaxona (53,1%), gentamicina (54,1%) e ampicilina (92,7%), e um total de 66,7% foi multidroga-resistente (Massinga *et al.*, 2021).

As altas frequências de resistência de BGN principalmente para penicilinas, cefalosporinas fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas e tetraciclinas observadas no presente estudo podem contribuir para o aumento de morbidade e mortalidade no HCM (Sumbana *et al.*, 2023).

As causas de aumento de resistência antimicrobiana, incluem o uso excessivo e descontrolado de antibióticos que potenciam o desenvolvimento e a propagação de genes de resistência, havendo necessidade da implementação de medidas adequadas de controlo de infecções em contextos de cuidados de saúde para reduzir a emergência de resistência antimicrobiana (Sumbana *et al.*, 2023).

A falta do conhecimento sobre o uso correcto de antibióticos pode contribuir para o aumento da resistência antimicrobiana, tanto que, o estudo realizado em Maputo sobre o conhecimento, atitudes e práticas das comunidades na utilização de antibióticos na África Subsariana, demonstrou que mais da metade dos participantes tinham conhecimentos insuficientes e que 20,9% afirmaram ter comprado antibióticos não prescritos (Mate *et al.*, 2019).

Em Moçambique não existe uma regulamentação específica sobre antibióticos, no entanto, os profissionais de saúde não estão autorizados a dispensar antibióticos sem receita médica (Cambaco *et al.*, 2020). Entretanto, um estudo recente realizado no distrito da Manhica, província de Maputo, referiu que os antibióticos constituíam 20% dos medicamentos frequentemente adquiridos pelos consumidores mesmo possuindo conhecimento limitado sobre o seu uso de antibióticos (Cambaco *et al.*, 2020).

O estudo sobre a auto-medicação realizado em Maputo, constatou que 1/5 dos inquiridos tinha utilizado antibióticos no mês anterior ao inquérito, sendo que na maioria dos casos, os antibióticos foram receitados por um profissional de saúde e cerca de 26% dos casos os inquiridos seguiram o conselho de familiares ou vizinhos (Rodrigues, 2020).

11.3. Perfil de susceptibilidade aos antibióticos de bactérias Gram-negativas de origem animal

No presente estudo, os isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* obtidos de amostras de origem animal mostraram também altas frequências de resistências para todos os antibióticos testados principalmente para penicilinas, aminoglicosídeos, tetraciclinas, sulfonamidas, fluoroquinolonas e macrolídeos variando de 20% a 100%. Contudo, os antibióticos da classe dos carbapenêmicos e cefalosporinas apresentaram maior eficácia, variando de 40% a 100%.

Os resultados reportados no presente estudo são consistentes com um estudo realizado nos mercados em Gana, que incluiu amostras de carnes, 97,8% (88/90) de carne de gado bovino e 94,4% (85/90) de carne de frango, tendo reportado elevadas frequências de resistência em isolados de *E. coli* para ampicilina (81,3%), sulfametoxazol-trimetoprima (26,3%) e amoxicilina-ácido clavulânico (25,2%). Adicionalmente, 94,4% de *K. pneumoniae* foram resistentes para ampicilina e 27,8% para sulfametoxazol-trimetoprima (Baah *et al.*, 2022).

Em Uganda, o estudo realizado em comunidade de pastores com amostras de fezes de gado observou-se altas frequências de resistência de *E. coli* para ampicilina (85%), amoxicilina-ácido clavulânico (60%), e 82% de *K. pneumoniae* resistente para amoxicilina-ácido clavulânico (Iramiot *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de estudo que incluiu isolados de *E. coli* obtidos em amostras de carne e fezes de frango em Gana, observou em amostras de carne de frango alta frequência de resistência para tetraciclina e ampicilina (62,5%), cotrimoxazol (37,5%), ceftazidima (25%) e ciprofloxacina (12,5%), e em amostras de fezes de frango a alta frequência de resistência foi observada para tetraciclina (82,1%), ampicilina (78,6%), cotrimoxazol (67,9%), ciprofloxacina (53,6%) e ceftazidima (7,1%), sendo que um total de 62,5% e 57,1% foi multidroga-resistente (Mensah *et al.*, 2022).

A análise feita em amostras de frango de corte no Egito, reportou a presença de 35% de *K. pneumoniae*, e destes 15% foram resistentes a carbapenêmicos contrariamente aos resultados obtidos no presente estudo (Hamza *et al.*, 2016), sugerindo a contínua vigilância da resistência da antimicrobiana.

O perfil de susceptibilidade aos antibióticos de *P. aeruginosa* obtidos de fontes animais reportado no presente estudo, é similar ao observado em estudos anteriormente realizados na Costa do Marfim em amostras de carne de gado bovino, onde observou-se altas frequências de resistência para ciprofloxacina (42,6%), piperaciclina (39,2%) e ceftazidima (22,8%) (Benie *et al.*, 2019).

O estudo realizado em Matadouro no Irão em amostras de carne de gado bovino também observou elevadas frequências de resistência para gentamicina (65,9%) em isolados de *P. aeruginosa* (Poursina *et al.*, 2022).

Contrariamente aos resultados reportados no presente trabalho, o estudo realizado em lojas de retalho na Arábia Saudita, identificou isolados de *Pseudomonas* spp. (69) em diversos tipos de carne de frango e observou elevadas frequências de sensibilidade de 98,6% para ceftazidima, 86,9% para gentamicina e 82,2% para amicacina (Elbehiry *et al.*, 2022).

Na África do Sul, a pesquisa desenvolvida em matadouro, contrariamente aos resultados reportados no presente estudo, observou em amostras de carne gado bovino baixa frequência de resistência *E. coli*, para amoxicilina (8%) e a gentamicina (100%) (Mupfunya *et al.*, 2021). Este resultado, pode estar relacionado com facto do governo sul-africano através da Lei 36 de 1947, regular a importação e prever o registo de fertilizantes, rações agrícolas, plantas esterilizantes e remédios, evitando a venda livre de antimicrobianos para o uso na produção animal (Mupfunya *et al.*, 2021).

Entretanto, estudos sobre resistência bacteriana em fontes animais têm sido pouco descritos em Moçambique. Porém, um estudo sobre frangos importados e locais, observou resistência de isolados de *E. coli* e outras BGN para ampicilina (100%), ceftriaxona (89%), gentamicina e sulfametoxazole-trimetoprima (78%), ciprofloxacina (70%), ceftazidima (67%) e amoxicilina-ácido clavulânico (22%), e um total de 70,4% isolados foi multidroga resistente (Faife *et al.*, 2020), constituindo um problema para a saúde pública. O uso de antibióticos como promotores de crescimento, profilaxia e metafilaxia, além do tratamento de infecções em animais de alimentação, acelera o aumento de frequências de resistência e disseminação de bactérias resistentes a antibióticos. Estes antibióticos tem sido reportados em África, podendo haver transmissão que pode chegar aos humanos através de zoonoses e alimentos (Faife *et al.*, 2020).

Em Moçambique, o estudo sobre a resistência antimicrobiana na cadeia de abastecimento de carne de frango de corte, apesar de não ter identificado nenhuma espécie de BGN incluída no presente estudo, reportou 24 isolados de *Campylobacter* spp., dos quais 19 apresentaram elevadas frequências de resistência a pelo menos 6 antibióticos de 4 classes diferentes, tetraciclinas (100% resistentes à tetraciclina e 95,8% resistentes à doxiciclina), os β -lactâmicos (91,7% resistentes à penicilina) e os macrólidos (87,5% resistentes à eritromicina) (Matsimbe *et al.*, 2021), sugerindo a emergência de espécies de BGN resistentes.

Os isolados de *E. coli* e *P. aeruginosa* de amostras de fonte animal neste estudo, apresentaram baixas frequências de resistência a duas classes de antibióticos (carbapenémicos e aminoglicosídeos). Este facto pode ser justificado pelo acesso limitado dos criadores e agricultores a estes antibióticos considerados de reserva na medicina humana e produção animal (MISAU, 2017; Figuié *et al.*, 2021). E também pelo facto de alguns antimicrobianos como as penicilinas (amoxicilina, penicilina procaína e benzatínica) e tetraciclinas (doxiciclina) serem usados em animais em Moçambique (GARP, 2015).

O consumo persistente de produtos de origem animal com resíduos de antibióticos pode conferir resistência à microflora normal intestinal, desenvolvendo resistência. Além disso, alguns microorganismos comensais podem, em alguns casos, tornar-se agentes patogénicos oportunistas causando doenças graves e potencialmente fatais em indivíduos imunocomprometidos, havendo necessidade de gestão e uso adequado de antimicrobiano (Odey *et al.*, 2024).

O uso inadequado de antibióticos, resultante da falta de medidas de controlo rigorosas para a compra e administração de antibióticos por parte dos agricultores e/ou criadores sem qualquer prescrição ou supervisão veterinária pode justificar as elevadas frequências de resistência observadas no estudo (Mugwaneza *et al.*, 2024).

11.4. Perfil de susceptibilidade aos antibióticos β -lactâmicos e os respectivos mecanismos de resistência detectados em amostras de origem humana e animal

A detecção dos genes de resistência aos antibióticos no presente estudo apenas foi feita para *E. coli* e *K. pneumoniae*, tendo sido observado altas frequências de resistências aos antibióticos β -lactâmicos e observou-se consistência com os genes testados (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}),

sobretudo nas fontes humanas. Os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM} (50% e 100%), foram os principais mecanismos de resistência detectados em estirpes de *E. coli*, enquanto, em *K. pneumoniae*, o gene *bla*_{SHV} constituiu o principal mecanismo (100%).

Os resultados reportados no presente estudo são consistentes com um estudo realizado no HCM sobre bactérias multi-droga resistentes a ESBL, em que constatou que no total de 75 isolados de *E. coli*, 77% (58) foi positivo para *bla*_{CTX-M}, 52% (39/75) para *bla*_{SHV} e 1% (1/75) para o gene *bla*_{TEM} (Estaleva *et al.*, 2019). Adicionalmente, outro estudo realizado no HCM sobre infecções extraintestinais, constatou que todos os isolados de *E. coli* resistentes a cefotaxima e ceftazidima, 67% (16/24) foi positivo para *bla*_{CTX-M} (Santona *et al.*, 2022).

O estudo sobre as infecções bacterianas no Hospital Distrital da Manhiça, desenvolvido por Massinga *et al.*, (2021) também reportaram isolados de *K. pneumoniae*, *bla*_{CTX-M} (55,6%, 5/9), *bla*_{TEM} (9,1%, 2/22) e *bla*_{SHV} (50%, 3/6), mostrando a possível presença de diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana em estes isolados, e evidenciando a necessidade de uma contínua vigilância no país. Embora com uma ligeira diferença, o mesmo foi encontrado por Tetteh *et al.* (2024), no no Hospital Universitário de Tamale em Gana, que reportou que, tal como nos isolados de *K. pneumoniae* os mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, *bla*_{TEM} (63%) e *bla*_{SHV} (16%) também foram encontrados em isolados de *E. coli*.

Os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* provenientes de origem animal também mostraram altas frequências dos mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos testados, variando de 10% a 100%. Os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM} (10% e 35%), foram os principais mecanismos de resistência detectados em estirpes de *E. coli*, enquanto que, em estirpes de *K. pneumoniae* os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} constituíram os principais mecanismos (33,3% a 100%), sugerindo a coexistência destes determinantes de resistência em elemento genéticos móveis, incluindo plasmídeos (Pan *et al.*, 2020). Uma análise de plasmídeos em isolados de *E. coli* produtora de ESBL, mostrou que as espinhas dorsais de plasmídeos em várias linhagens apresentam uma semelhança significativa e podem ser quase idênticas entre animais como galinhas, bovinos e suínos, com semelhanças com plasmídeos isolados de seres humanos (Ribeiro *et al.*, 2024).

Na Tanzânia, realizou-se um estudo em capoeiras de aves em amostras de carne de frango, e detectou-se 39,5% de *bla*_{CTX-M} e 15,8% de *bla*_{TEM} em *E. coli* e *K. pneumoniae* (Kimera *et al.*, 2024).

Em matadouros na África do Sul, desenvolveu-se um estudo em amostras de fezes de frango de corte, em que detectou-se altas frequências de *bla*_{CTX-M} (60%) e *bla*_{TEM} (20%) em *E. coli*, e em *K. pneumoniae* foi detectado 50% *bla*_{CTX-M} (Ramatla *et al.*, 2024).

Em África, os genes ESBL mais comuns detectados em bactérias entre animais produtores de alimentos são *bla*_{CTX-M}, seguidos do *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} e principalmente em *E. coli* (Faife *et al.*, 2020).

As BGN, incluindo *E. coli* e *K. pneumoniae* provenientes de fontes humanas e animais podem actuar como reservatório de genes de resistência a ESBL incluindo outros determinantes de resistência, mostrando o papel da caracterização molecular (Bastidas-Caldes *et al.*, 2023).

A presença de estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* com mecanismos semelhantes de resistência aos antibióticos β-lactâmicos, pode evidenciar a circulação dessas estirpes em várias fontes, necessitando de controlo das fontes de contaminação e de contínua vigilância molecular (Nsofor *et al.*, 2022).

12. Conclusão

Após a realização do estudo conclui-se o seguinte:

- Os pacientes com suspeita de sepses causadas por bactérias Gram-negativas admitidas no Hospital Central de Maputo foram na sua maioria do sexo feminino, com idade superior a 18 anos, seguida de neonatos e provenientes do Departamento de Medicina e Pediatria.
- As espécies de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* são bactérias Gram-negativas comuns em placas de hemoculturas no Hospital Central de Maputo, Matadouro e do Mercado Fajardo na cidade de Maputo.
- Os isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* obtidos de humanos e animais apresentam altas frequências de resistência aos antibióticos usados como 1ª linha para o tratamento de infecções humanas (cefalosporinas, penicilinas, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas e tetraciclina) e sensibilidade para carbapenémicos, considerados antibióticos de reserva.
- A coexistência dos genes de resistência *bla_{CTX-M}* e *bla_{TEM}* constituem os principais mecanismos de resistências aos β -lactâmicos de amplo espectro em isolados de *E. coli* e *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* para isolados de *K. pneumoniae*.
- Os isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* obtidos de fonte humana apresentaram altas frequências de resistência relativamente e aos isolados obtidos de fonte animal.

13. Limitações

O estudo teve as seguintes limitações:

- Dados dos pacientes incompletos (como idade e departamento) ou não devidamente preenchidos no livro de registo do Laboratório de Microbiologia do Hospital Central de Maputo; e
- Número reduzido de isolados viáveis de *E. coli* e *P. aeruginosa* (hemocultura) e *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* nas amostras de origem animal (carcaça e fezes de frango).

14. Recomendações

Com o presente estudo recomenda-se:

Às entidades responsáveis pela medicina humana e animal e outros órgãos competentes:

- a) Gestão e uso adequado dos antimicrobianos na medicina humana e animal;
- b) Controlo de infecções hospitalares e a contínua vigilância da resistência antimicrobiana no contexto de saúde única.

Aos investigadores:

- a) Realização de estudos semelhantes em outras partes do país, visto que estudos com abordagem saúde única são escassos no país;
- b) Detecção de outros mecanismos de resistência através do sequenciamento do genoma completo (WGS) de estirpes resistentes;

Aos criadores e trabalhadores dos matadouros e mercados formais:

- a) Melhoria das condições de higiene durante a criação dos animais e também durante o processamento de abate dos animais.

15. Referências bibliográficas

- 1) Abebe E., Gugsu G. & Ahmed M. (2020) 'Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens' *Journal of Tropical Medicine*. Available At: <https://doi.org/10.1155/2020/4674235>.
- 2) Abdel-Rhman S. H. (2020) 'Characterization of β -lactam resistance in *K. pneumoniae* associated with ready-to-eat processed meat in Egypt' *Journal Plos One*. Available At: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238747>.
- 3) Ajayi A. O. & Egbebi A. O. (2011) 'Antibiotic susceptibility of *Salmonella typhi* and *Klebsiella pneumoniae* from poultry and local birds in Ado-Ekiti, Ekiti-State, Nigeria' *Annals of Biological Research*, 2(3): 431-437.
- 4) Aldabbagh S. Y. (2022) 'Molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from cow in Mosul city, Iraq' *Iraq Journal of Veterinary Sciences*. Available At: <https://doi.org/10.33899/ijvs.2021.130341.1803>.
- 5) Al-Hassan R. E. A., Hafidh R. R. & Zaman M. Z. (2023) 'Identification of *Klebsiella oxytoca* by VITEK-2 System in Baghdad Hospitals' *J. Fac. Med. Baghdad*, Vol.65, No.4. Available At: <https://doi.org/10.32007/jfacmedbagdad.2154>.
- 6) Almeida-Couto J. M. F. & Cestari L. A. (2017) 'Estabilidade oxidativa e microbiológica de empanados de frango em embalagens activas' *Revista Uningá Review*, Marialva, v. 30, n. 1, p.26-30.
- 7) Anene C. C., Oli A. N., Edeh P. A., Okezie M. U. & Kretchy J. P. (2021) 'Antimicrobial Resistance among *Enterobacteriaceae* found in Chicken and Cow Droppings and their public health importance' *Advances in microbiology*, V. 11, No. 11.
- 8) Aslam B., Khurshid M., Arshad M. I., Muzammil S., Rasool Y. N., Shah T., Chaudhry T. H., Rasool M. H., Shahid A., Xueshan X. & Baloch Z. (2021) 'Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook' *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11:771510. Available At: [10.3389/fcimb.2021.771510](https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510).
- 9) Baah D. A., Kotey F. C. N., Dayie N. T. K. D., Codjoe F. S., Tetteh-Quarcoop P. B. & Donkor E. S. (2022) 'Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria Contaminating Raw Meat Sold in Accra, Ghana' *Phatogens*.

- 10) Bajpai V. K., Park I., Lee J., Shukla S., Nile S., Chun H. S., Khan I., Oh, S. Y., Lee H., Huh Y. S., Na M. & Han Y. K. (2019) 'Antioxidant and antimicrobial efficacy of a biflavonoid, amentoflavone from *Nandina domestica* in vitro and in minced chicken meat and apple juice food models' *Food chemistry*, v. 271, p. 239247.
- 11) Basavaraju M. & Gunashree B. S. (2022) '*Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics' *Intechopen*. Available At: [10.5772/intechopen.105508](https://doi.org/10.5772/intechopen.105508).
- 12) Bastidas-Caldes C., Cisneros-Vásquez E., Zambrano A., Mosquera-Maza A., Calero-Cáceres W., Rey J., Yamamoto Y., Yamamoto M., Calvopina M. & Waard J. H. (2023) 'Co-Harboring of Beta-Lactamases and *mcr-1* Genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Healthy Carriers and Backyard Animals in Rural Communities in Ecuador' *Antibiotics*. Available At: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050856>.
- 13) Benie C. K. D., Kouame N. D., Kouadio N. A. N., Koua-me S. S. M., Koua T. A., Aka S., Tra Bi Y. C., Guessennd N., Dadié A. T., Dje K. M. & Dosso M. (2019) 'High prevalence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains recovered from bovine meat, fresh and smoked fish in Côte d'Ivoire' *Microbiology and Nature*, V. 1, pages 44-54. Available At: <https://doi.org/10.26167/RX2V-5406>.
- 14) Blair J. M. A., Richmond G. E. & Piddock L. J. V. (2014) 'Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance' *Future Microbiol.*, 9 (10): 1165-77. Available At: <https://doi.org/10.2217/fmb.14.66>.
- 15) Blair J. M., Webber M. A., Baylay A. J., Ogbolu D. O. & Piddock L. J. V. (2015) 'Molecular mechanisms of antibiotic resistance' *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, p. 42-51.
- 16) Bush K. & Jacoby G. A. (2009) 'Updated Functional Classification of β -Lactamases' *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 54, n. 3, p. 969-976.
- 17) Bush K. (2013) 'Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases' *New York Academy of Sciences*, 84-90.
- 18) Bush K. (2018) 'Past and Present Perspectives on β -Lactamases' *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 62, n. 10, p. 1-20.
- 19) Brito J. M. S. & Coelho R. M. D. (2021) 'Características microbiológicas da carne de frango: uma revisão narrativa' *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 7, n. 6, p. 62781-62795.

- 20) Cambaco O., Menendez Y. A., Kinsman J., Sigaúque B., Wertheim H., Do N., Gyapong M., John-Langba J., Sevene E. & Munguambe K. (2020) 'Community knowledge and practices regarding antibiotic use in rural Mozambique: where is the starting point for prevention of antibiotic resistance?' *BMC Public Health*. Available At: <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09243-x>.
- 21) Centers for Disease and Control and Prevention (2013) 'Examples of How Antibiotic Resistance Spreads' Available At: <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/2-2013-508.pdf>.
- 22) Chirindze L. M., Zimba T. F., Sekyere J. O., Govinden U., Chenia H. Y., Sundsfjord A., Essack S. Y. & Simonsen G. S. (2018) 'Faecal colonization of *E. coli* and *Klebsiella* spp. producing extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC in Mozambican university students' *BMC Infect Dis* 18: 244.
- 23) Clinical Laboratory Standards Institute (2022) 'Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 32nd informational supplement. CLSI document M100' *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA.
- 24) Clinical Laboratory Standards Institute (2023) 'Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 33rd informational supplement. CLSI document M100' *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA.
- 25) Dias D. J., Manageiro V., Graça R., Sampaio D.A., Albuquerque T., Themudo P., Vieira L., Ferreira E., Clemente L. & Caniça M. (2016) 'QnrS1- and Aac(6)-Ib-cr-Producing *Escherichia coli* among isolates from animals of different sources: Susceptibility and genomic characterization' *Front Microbiol*, 7:671.
- 26) Dirar M. H., Bilal N. E., Ibrahim M. E. & Hamid M. E. (2020) 'Prevalence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and molecular detection of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genotypes among *Enterobacteriaceae* isolates from patients in Khartoum, Sudan' *Pan African Medical Journal*.
- 20) Elbehiry A., Marzouk E., Aldubaib M., Moussa I., Albalhail A., Ibrahim M., Hamada M., Sindi W., Alzaben F., Almuzaini A. M., Algammal A. M. & Rawway M. (2022) 'Pseudomonas species prevalence, protein analysis and antibiotic resistance: an evolving public health challenge' *AMB Express*. Available At: <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01390-1>.

- 21) El-Ghany W. A. A. (2021) 'Pseudomonas aeruginosa infection of avian origin: Zoonosis and one health implications' *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916.
- 22) Estaleva C. E. L., Zimba T. F., Sekyere J. O., Govinden U., Chenia H. Y., Simonsen G. S., Haldorsen B., Essack S. Y. & Sundsfjord A. (2019) 'High prevalence of multidrug resistant ESBL- and plasmid mediated AmpC-producing clinical isolates of *Escherichia coli* at Maputo Central Hospital, Mozambique' *Research Square*. Available At: <https://doi.org/10.21203/rs.2.11665/v4>.
- 23) Faife S. L., Zimba T., Sekyere J. O., Govinden U., Chenia H. Y., Simonsen G. S., Sundsfjord A. & Essack S. Y. (2020) 'β-lactam and Fluoroquinole resistance in *Enterobacterales* from imported and locally-produced chicken in Mozambique' *J Infect Dev Countries*, 14(5):471-478.
- 24) Faria Júnior C. (2014) 'Caracterização de cepas de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenems isoladas no Distrito Federal' Dissertação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília.
- 25) Fernandes R., Amador P. & Prudêncio C. (2013) 'β-Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance' *Reviews in Medical Microbiology*. v. 24, n. 1, p. 7-17.
- 26) Ferjanja S., Saidani M., Amine F. S. & Boubaker I. B. B. (2015) 'A comparative study of antimicrobial resistance rates and phylogenetic groups of community-acquired versus hospital-acquired invasive *Escherichia coli*' *Médecine et Maladies Infectieuses*, v. 45, n.4, p.133-138.
- 27) Figuié M., Cuinhane C. & Macuamule C. (2021). 'Designing good practice guidelines for a prudent use of antibiotics in the poultry sector in Mozambique' *Research Gate*, Practice Abstract.
- 28) Food and Agriculture Organization of the United Nations (2023) 'World Food and Agriculture- Statistical yearbook' p. 384.
- 29) Gad C. F., El-Domany R. A., Zaki S. & Ashour H. M. (2007) 'Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Clinical and Environmental samples in Mninia, Egypt: Prevalence, Antibigram and Resistance Mechanisms' *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60:1010-1017.

- 30) Gajic I., Kabic J., Kekic D., Jovicevic M., Milenkovic M., Culafic D. M., Trudic A., Ranin L. & Opavski N. (2022) 'Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods' *Antibiotics*, 11, 427. Available At: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040427>.
- 31) GARP (2015) 'Análise situacional e Recomendações: Uso e Resistência aos Antibióticos em Moçambique' *CDDEP*.
- 32) Guenther S., Ewers C. & Wieler L. H. (2011) 'Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wild life, yet another form of environmental pollution?' *Front Microbiol*, 2:246.
- 33) Hamza E., Dorgham S. M. & Hamza D. A. (2016) 'Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in broiler poultry farming in Egypt' *Resistance*, V. 7, pages 8-10. Available At: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.06.004>.
- 34) Hijazi S. M., Fawzi M. A., Ali F. M. & Galil K. H. A. E. (2016) 'Prevalence and Characterization of extended-spectrum beta-lactamases producing *Enterobacteriaceae* in healthy children and associated risk factors' *Clin Microbiolo Antimicrob.*; 13:3.
- 35) Ibrahim H. M., Amin R. A., El-Shater M. A. & Hafez S. M. (2017) 'Bacteriological evaluation of freshly slaughtered chicken carcasses' *Engormix Poultry Industry*.
- 36) Iramiot J. S., Kajumbula H., Bazira J., Kansiime C. & Asimwe B. (2020) 'Antimicrobial resistance at the human-animal interface in the Pastoralist Communities of Kasese District, South Western Uganda' *Sci Rep*, 10, 14737. Available At: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70517-w>.
- 37) Iroha I. R., Ugbo E. C., Ilang E. C., Oji A. E. & Ayogu T. E. (2010) 'Bacteria contamination of raw meat sold in Abakaliki Ebony State Nigeria' *Journal of Public Health and Epidemiology*, Vol. 3(2), pp. 49-53.
- 38) Jacoby G. A. (2009) 'AmpC β -Lactamases' *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 161182.
- 39) Jawher I. M. & Hassan M. G. (2023) 'Antibiotics resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from meat at Mosul city retailers' *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, Vol. 37, No. 2.

- 40) Jornal Notícias (2020) ‘Novo coronavírus: “Fajardo” reforça medidas de prevenção’ Disponível em: <https://jornalnoticias.co.mz/capital/grande-maputo/novocoronavirus-fajardo-reforca-medidas-de-prevencao/?amp=1>.
- 41) Kaur M., Gupte S. & Kaur T. (2015) ‘Importância clínica da produção de Carbapenemase em bactérias Gram-negativas’ *J Trop Dis*, 3:3.
- 42) Kimera Z. I., Mgaya F. X., Mshana S. E., Karimuribo E. D. & Matee M. I. N. (2024) ‘Occurrence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase and Quinolone resistance genes among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from poultry, domestic pigs and environ in Msimbazi River Basin in Tanzania’ *J. Appl. Sci. Environ. Manage*, Vol. 28, (1) 37-47.
- 43) Lamar F., Mucache H. N., Mondlane-Milisse A., Jesser K. J., Courtney V., Fafetine J. M., Saíde J. A. O., Fèvre E. M., Caruso B. A., Freeman M. C. & Levy K. (2023) ‘Quantifying Enteropathogen Contamination along Chicken Value Chains in Maputo, Mozambique: A Multidisciplinary and Mixed-Methods Approach to Identifying High Exposure Settings’ *Environmental Health Perspectives*, Vol.131.
- 44) Lerma L. L., Benomar N., Gálves A. & Abriouel H. (2013) ‘Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production’ *International Journal of Food Microbiology*, v. 161, n. 2, p.97-106.
- 45) López S. M., Yepes J. A., Herrera J. C. P. & Jiménez A. T. (2019) ‘Enterobacteria in the 21st century: a review focused on taxonomic changes’ *The Journal of Infection in Developing Countries*, 13(4):265-273.
- 46) Livermore D. M. (2012) ‘Current epidemiology and growing resistance of gramnegative pathogens’ *The Korean journal of internal medicine*, v. 27, n. 2, p. 128–42.
- 47) Li X., Mehrotra M., Ghimire S. & Adewoye L. (2007) ‘Beta-lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin’ *Vet. Microbiol.* Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.015>.
- 48) Li X., Zhao J., Zhang B., Duan X., Jiao J., Wu W., Zhou Y. & Wang H. (2022) ‘Drug development concerning metallo-β-lactamases in gran-negative bacteria’ *Front. Microbiol*, V. 13. Available At: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.959107>.

- 49) Mahaluça F. A., Essack S.; Zimba T. & Sacarlal J. (2019) 'Profile of Antibacterial Resistance of the *Enterobacteriaceae* Family in Pediatric and Adult Patients' *Annals of Clinical Immunology and Microbiology*, vol. 1.
- 50) Manjate Y. L. (2023) 'Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* isolada em amostras de sangue e pús no Hospital Central de Maputo' Trabalho de investigação, Universidade Eduardo Mondlane.
- 51) Massinga A. J., Garrine M., Messa Júnior A., Nobela N. A., Boisen N., Massora S., Cossa A., Varo R., Siteo A., Hurtado J. C., Ordi J., Mucavele H., Nhampossa T., Breiman R. F., Whitney C. G., Blau D. M., Bassat Q. & Mandomando I. (2021) '*Klebsiella* spp. cause severe and fatal disease in Mozambique children: antimicrobial resistance profile and molecular characterization' *BMC Infectious Diseases*. Available At: <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06245-x>.
- 52) Mate I., Come C. E., Gonçalves M. P., Cliff J. & Gudo E. S. (2019) 'Knowledge, attitudes and practices regarding antibiotic use in Maputo city' *PLOS ONE*. Available At: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221452>.
- 53) Matsimbe J. J., Manhiça A. J & Macuamule C. J. (2021) 'Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* spp. Isolates from Broiler Chicken Meat Supply Chain in Maputo, Mozambique' *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 18, n.9. Available At: <https://doi.org/10.1089/fpd.2021.0001>.
- 54) Mduma E., Halidou T., Kaboré B., Walongo T., Lompo P., Museveni J., Gidabayda J., Gratz J., Guga G., Kimathi C., Liu J., Mdoe P., Moshiro R., Petzold M., Singlovic J., Guillerm M., Gomes M. F., Houpt E. R. & Halleux C. M. (2022) 'Etiology of severe invasive infections in young infants in rural settings in sub-Saharan Africa' *PLOS ONE*. Available At: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264322>.
- 55) Ministério da Saúde (2017) 'Lista Nacional de Medicamentos Essenciais' 1ª Edição.
- 56) Mensah G. I., Adjei V. Y., Vicar E. K., Atsu P. S., Blavo D. L., Johnson S. A. M. & Addo K. K. (2022) 'Safety of Retailed Poultry: Analysis of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* From Raw Chicken and Poultry Fecal Matter From Selected Farms and Retail Outlets in Accra, Ghana' *Microbiology Insights*, Vol. 15: 1-5.

- 57) Monteiro L. G. S., Zimba T. & Sidat M. M. (2015) 'Padrão de Sensibilidade dos antimicrobianos de *Enterobacteriaceae* isoladas no Hospital Central de Maputo, Moçambique 2009-2010' *Revista Científica da UEM: Série Ciências Biomédicas e Saúde Pública*.
- 58) Morel C. (2019) 'Transmission of antimicrobial resistance from livestock agriculture to humans and from humans to animals' *OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers*, No. 133. Available At: <http://dx.doi.org/10.1787/fcf77850-en>.
- 59) Mugwaneza D., Rwagasore E., El-Khatib Z., Dukuziyaturemye P., Omolo J., Nsekuye O., Rwunganira S. & Manzi M. (2024) 'Factors Associated with Inappropriate Use of Antibiotics Among Animal Health Professionals in Selected Districts of Rwanda' *Journal of Epidemiology and Global Health*, V. 14, 265-273pg.
- 60) Munita J. M., Arias C. A., Unit A. R. & Santiago A. D. (2016) 'Mechanisms of Antibiotic Resistance' 4(2), 1-37.
- 61) Mupfunya C. R., Qekwana D. N. & Naidoo V. (2021) 'Antimicrobial use practices and resistance in indicator bacteria in communal cattle in the Mnisi community, Mpumalanga, South Africa' *Vet. Med. Sci.* Available At: <https://doi.org/10.1002/vms3.334>
- 62) NCCLS (2003) 'Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada' 8ª Edição, Vol. 23, No.1.
- 63) Ngom R. V., Jajere S. M., Ayissi G. J. A., Tanyienow A., Moffo F., Watsop H. M., Mimboe L. M., Mouiche M. M. M., Schupbach-Regula G. & Carmo L. P. (2024) 'Unveiling the landscape of resistance against high priority critically important antimicrobials in food-producing animals across Africa: A scoping review' *Preventive Veterinary Medicine*. Available At: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2024.106173>.
- 64) Nordimann P., Dortet L. & Poirel L. (2012) 'Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm' *Trends in molecular medicine*. v. 18, n. 5, p. 263-72.
- 65) Nsofor C. A., Nsofor C. M., Umeokafor P. C., Okwudili K. & Uduafor E. S. (2022) 'Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among Chickens, Poultry Environment and Retail Meats in Owerri, Nigeria' *EC Microbiology*, 41-51 pages.

- 66) Odey T. O. J., Tanimowo W. O., Afolabi K. O., Jahid I. K. & Reuben R. C. (2024) 'Antimicrobial use and resistance in food animal production: food safety and associated concerns in Sub-Saharan Africa' *International Microbiology*, 27:1-23. Available At: <https://doi.org/10.1007/s10123-023-00462-x>.
- 67) Oliveira J. & Reygaert W. C. (2021) 'Gram Negative Bacteria' *StatPearls Publishing LLC*.
- 68) Organização Mundial da Saúde (2021) 'A Resistência aos Antimicrobianos' Disponível em: <https://www.afro.who.int/pt/ResistaaRAM>, acesso feito aos 15 de Agosto de 2022, pelas 22:20'.
- 69) Pan Y., Zeng J., Li L., Yang J., Tang Z., Xiong W., Li Y., Chen S. & Zeng Z. (2020) 'Coexistence of Antibiotic Resistance Genes and Virulence Factors Deciphered by Large-Scale Complete Genome Analysis' *American Society for Microbiology*, V. 5. Available At: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00821-19>.
- 70) Poursina S., Ahmadi M., Fazeli F. & Ariaii P. (2023) 'Assessment of virulence factors and antimicrobial resistance among the *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from animal meat and carcass samples' *Vet Med Sci.*, 9:315-325.
- 71) Ramatla T., Mokgokong P., Lekota K. & Thekiso O. (2024) 'Antimicrobial resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from broiler chickens' *Food Microbiology*, 105576. Available At: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104476>.
- 72) Rappeli P., Folgosa E., Solinas M. L., Da Costa J. L., Pisanu C., Sidat M., Melo J., Cappuccinelli P. & Colombo M. M. (2005) 'Pathogenic Enteric *Escherichia coli* in Children with and without Diarrhea in Maputo, Mozambique' *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43: 67-72.
- 73) Rawy D. K., El-Mokhtar M. A., Hemida S. K., Askora A. & Yousef N. (2020) 'Isolation, Characterization and Identification of *Klebsiella pneumoniae* from Assiut University Hospital and sewage water in Assiut governorate, Egypt' *Assiut Univ. J. of Botany and Microbiology*, pp.60-76.
- 74) Ribeiro A. M. S. (2012) 'Pesquisa de Contaminações Microbiológicas na Carne bovina na cidade da Praia' Universidade Jean Piaget de Cabo Verde.

- 75) Ribeiro L. F., Nespolo N. M., Rossi G. A. M. & Fairbrother J. M. (2024) 'Exploring Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* in Food-Producing Animals and Animals-Delivered Foods' *Pathogens*. Available At: <https://doi.org/10.3390/pathogens13040346>.
- 76) Rodrigues C. F. (2020) 'Self-medication with antibiotics in Maputo, Mozambique: practices, rationales and relationships' *Palgrave Communications*. Available At: <https://doi.org/10.1057/s41599-019-0385-8>.
- 77) Rossi F. & Andreazzi D. B. (2005) 'Resistência Bacteriana- Interpretando o Antibiograma' São Paulo: Editora Atheneu.
- 78) Salamandane A., Vila-Boa F., Malfeito-Ferreira M. & Brito L. (2021) 'High Fecal Contamination and High Levels of Antibiotic-Resistant *Enterobacteriaceae* in Water Consumed in the City of Maputo, Mozambique' *Biology* 10: 558.
- 79) Santona A., Sumbana J. J., Fiamma M., Deligios M., Taviani E., Simbine S. E., Zimba T., Sacarlal J., Rubino S. & Paglietti B. (2022) 'Highrisk lineages among extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from extraintestinal infections in Maputo Central Hospital, Mozambique' *International Journal of Antimicrobial Agents*, 106649.
- 80) Sattar A., Zakaria Z., Abu J., Aziz S. A. & Rojas-Ponce G. (2021) 'Isolation of Mycobacterium avium and other nontuberculous mycobacteria in chickens and captive birds in peninsular Malaysia' *BMC Veterinary Research*.
- 81) Sekyere J. O. & Reta M. A. (2020) 'Genomic and Resistance Epidemiology of Gram-Negative Bacteria in Africa: a Systematic Review and Phylogenomic Analyses from a One Health Perspective' *Msystems*, vol. 5. Available At: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00897-20>.
- 82) Silverstein D. C. & Hopper K. (2009) 'Small animal critical care medicine' *Elsevier*.
- 83) Sumbana J. J. (2019) 'Phenotypic and Molecular Characterization of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* and other Gram-negative invasive bacteria in Mozambique' Tese de Doutoramento na Universidade de Sassari, Itália.
- 84) Sumbana J. J., Santona A., Abdelmalek N., Fiamma M., Deligios M., Manjate A., Sacarlal J., Rubino S. & Paglietti B. (2023) 'Polyclonal Multidrug ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* and Emergence of Susceptible Hypervirulent *Klebsiella*

pneumoniae ST23 Isolates in Mozambique’ *Antibiotics*, 12(9). Available At: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091439>.

85) Taviani E., Muchongo A., Kim S. W., Kessel J. A. S. V. & Haley B. J. (2021) ‘Genomic Analysis of Antibiotic-Resistant and Susceptible *Escherichia coli* Isolated from Bovine Sources in Maputo, Mozambique’ *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 18, number 6. Available At: [10.1089/fpd.2020.2901](https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2901).

86) Tetteh F. K. M., Ablordey A., Obeng-Nkrumah N. & Opintan J. A. (2024) ‘Extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* recovered from patients at the Tamale Teaching Hospital, Ghana’ *PLOS ONE*. Available At: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0300596>.

87) Turindge J. D., Ferraro M. J. & Jorgensen J. H. (2007) ‘Susceptibility Test Methods: General Considerations’ In: *Manual of Clinical Microbiology*, 9ed, Washington, DC: ASM Press, cap. 72, p.1146-1151.

88) Tilahun M., Kassa Y., Gedefie A. & Ashagire M. (2021) ‘Emerging Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae* Infection, Its Epidemiology and Novel Treatment Options: A Review’ *Infection and Drug Resistance*, 14 4363-4374.

89) Tortora J. G., Funke R. B. & Case, L. C. (2016) ‘Microbiologia’ 12^a Ed. Porto Alegre: ArtMed.

90) Vaidya V. K. (2011) ‘Horizontal transfer of antimicrobial resistance by extended spectrum lactamase-producing *Enterobacteriaceae*’ *J. Lab. Physicians*, 3: 37-42.

91) William A. & Petri J. (2012) ‘Penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos β -lactâmicos’ In: Brunton, L. L. *et al.* (org.). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman*. 12^a Ed. Porto Alegre: AMcGraw Hill, p. 1477-1504.

92) World Health Organization (2023) ‘A one health priority research agenda for antimicrobial resistance’ p. 60.

93) Zhu Y., Huang W. E. & Yang Q. (2022) ‘Clinical Perspective of Antimicrobial Resistance in Bacteria’ *Infection and Drug Resistance*, 15, p.735-746.

16. Apêndice: Fichas de colheita de amostras de hemocultura, gado bovino e frangos

A) Ficha de colheita de amostras de hemocultura.

Proveniência:		
Informações do paciente		
Nome:		Código:
Idade:	Gênero: F / M	Departamento:
Residência:	Uso de antibióticos nos últimos 15 dias: Sim___ Não___ Sem informação___	Suspeita clínica: Meningite___ Septicemia___ Pneumonia___ Outras:
Amostra de hemocultura (Placa de cultura)		
Data de colheita:		
Isolado bacteriano: Sim___ Não___		Espécie bacteriana identificada:
Aspecto: Límpido___ Mucóide___ Circular___ Outros:		
Cor: Rosa ___ Violeta___ Incolor___ Transparente___ Enegrecido___ Castanha___ Verde___ Outras:		

B) Ficha de colheita de amostras de carcaças de gado bovino e frango.

Tipo de carcaça: Gado bovino___ Frango___	
Proveniência:	
Peso da carcaça:	Código:
Idade de abate:	
Data de colheita:	Uso de antibióticos: Sim___ Não___ Caso sim, quais? a) ESBL b) AmpC c) Carbapenêmicos d) Sem informação de antibiótico(s) que usa___
Aspecto: Macio___ Seco___ Áspero___ Mucóide___ Duro___ Outros:	
Cor: Branca___ Vermelha___ Rosa___ Castanha___ Outras:	
Partes do corpo colhidas: Perna___ Coxa___ Peito___ Pescoço___ Abdómen___ Outros:	
Cheiro: Forte___ Fraco___ Desagradável___ Normal___ Outros:	

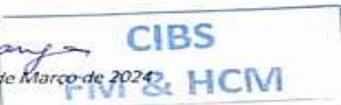
C) Ficha de colheita de amostras de fezes de frangos

Proveniência:	
Informações da amostra	
Nr de bolo fecal colhido:	Código:
Idade:	
Amostra de fezes	
Data de colheita:	Uso de antibióticos: Sim___ Não___ Caso sim, quais? a) ESBL b) AmpC c) Carbapenémicos d) Sem informação de antibiótico(s) que usa_____
Aspecto: Macio___ Seco___ Áspero___ Mucóide___ Duro___ Outros:	
Cor: Verde___ Vermelho___ Rosa___ Castanho___ Outras:	

17. Anexos:

Anexo 1: Aprovação Ética

Comprovativo da **aprovação ética** do projecto intitulado “Perfil de Susceptibilidade e Detecção dos Mecanismos de Resistências aos Antibióticos beta-lactâmicos em bactérias Gram-negativas isoladas em amostras de animais e humanos na Cidade de Maputo entre Abril e Junho de 2023”.

	Comité Institucional de Bioética em Saúde da Faculdade de Medicina/Hospital Central de Maputo	
(CIBS FM&HCM)		
<i>Dr. Vasco António Muchanga, Presidente do Comité Institucional de Bioética em Saúde da Faculdade de Medicina/Hospital Central de Maputo (CIBS FM&HCM)</i>		
CERTIFICA		
<i>Que este Comité avaliou a proposta do (s) Investigador (es) Principal (is):</i>		
<i>Nome (s): Ivete Benício Samuel</i>		
<i>Protocolo de investigação: Sem Versão, de outubro de 2023</i>		
<i>Consentimentos informados: Não aplicável</i>		
<i>Ficha de recolha de dados: sem versão, sem data</i>		
 <i>Do estudo:</i>		
TÍTULO; Perfil de susceptibilidade e Detecção dos mecanismos de resistências aos antibióticos beta-lactâmicos em Bactérias Gram-negativas isoladas em amostras de animais e humanos na cidade de Maputo entre Abril e Junho de 2023		
 <i>E faz constar que:</i>		
<i>1º Após revisão do protocolo pelos membros do comité durante a reunião do dia 07 de Março de 2024 e que será incluída na acta 07/2024, o CIBS FM&HCM, emite este informe notando que não há nenhuma inconveniência de ordem ética que impeça o início do estudo.</i>		
<i>2º Que a revisão realizou-se de acordo com o Regulamento do Comité Institucional da FM&HCM – emenda 2 de 28 de Julho de 2014.</i>		
<i>3º Que o protocolo está registado com o número CIBS FM&HCM/11/2023.</i>		
<i>4º Que a composição actual do CIBS FM&HCM está disponível na secretária do Comité.</i>		
<i>5º Não foi declarado nenhum conflito de interesse pelos membros do CIBS FM&HCM.</i>		
<i>6º O CIBS FM&HCM faz notar que a aprovação ética não substitui a aprovação científica nem a autorização administrativa.</i>		
<i>7º A aprovação terá validade de 1 ano, até 03 de Abril de 2025. Um mês antes dessa data, o Investigador deve enviar um pedido de renovação se necessitar.</i>		
<i>8º Recomenda-se aos investigadores que mantenham o CIBS informado do decurso do estudo no mínimo uma vez ao ano.</i>		
<i>9º Solicitamos aos investigadores que enviem no final de estudo um relatório dos resultados obtidos.</i>		
 <i>E emite</i>		
RESULTADO: APROVADO		
		
<i>Assinado em Maputo aos 04 de Março de 2024.</i>		
		
<small>Faculdade de Medicina, Av. Salvador Allende nº702, telefone: 21428076 www.cibs.ucm.mz Página 1 de 1</small>		

Anexo 2: Aprovação Ética do Estudo Principal da Vigilância Laboratorial de Resistência aos Antibióticos no Hospital Central de Maputo



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE
MINISTÉRIO DA SAÚDE
COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE
IRB00002657

Exmo Senhor
Dr. Darlenne Binti Kenga
Faculdade de Medicina

Ref:501/CNBS/24

Data 13 de Setembro de 2024

Assunto: Renovação da aprovação do protocolo de estudo intitulado: “*Relatório de vigilância laboratorial de resistência aos antibióticos no Hospital Central de Maputo*”.

O Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS), analisou o relatório de progresso do estudo intitulado: “*Relatório de vigilância laboratorial de resistência aos antibióticos no Hospital Central de Maputo*”, e, sobre o mesmo, chegou à seguinte conclusão:

Não havendo nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a continuação do estudo, o CNBS dá a sua devida aprovação ao estudo, salientando que:

- A presente aprovação terá a validade de um ano, terminando esta a 13 de Setembro de 2025. Os investigadores deverão submeter o pedido de renovação da aprovação um mês antes de terminar o prazo.
- Qualquer alteração a ser introduzida no Protocolo, incluindo os seus anexos deve ser submetida ao CNBS para aprovação.

Sem mais de momento queiram aceitar as nossas cordiais saudações.

A Secretária Executiva do CNBS

Maria da Fátima Cuembeto



Endereço:

Faculdade de Saúde, 28 andar de

C.Postal: 264

Teléfono: 258 23 100 2350