



FACULDADE DE MEDICINA
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS
ORIENTAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Título da Dissertação

Caracterização Fenotípica de Estirpes de *Escherichia coli* Isoladas de Amostras de Fezes de Indivíduos Saudáveis em Maputo no Período de 2023-2024

Nome do Estudante: Ventura Relvas Elisa Jaime Azarias Chongo



FACULDADE DE MEDICINA
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS
ORIENTAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Título da Dissertação

Caracterização Fenotípica de Estirpes de *Escherichia coli* Isoladas de Amostras de Fezes de Indivíduos Saudáveis em Maputo no Período de 2023-2024

Nome do Estudante: Ventura Relvas Elisa Jaime Azarias Chongo.

Nome e título do Supervisor: Doutor Jerónimo Langa (BSc, MSc, PhD).

Nome e título da Co-supervisora: Doutora Alice Manjate (BSc, MSc, PhD).

Maputo, Dezembro de 2025

Declaração de Originalidade do Projecto

Eu, **Ventura Relvas Elisa Jaime Azarias Chongo**, “declaro que esta dissertação nunca foi apresentada para a obtenção de qualquer grau ou num outro âmbito e que ela constitui o resultado do meu labor individual. Esta dissertação é apresentada em cumprimento parcial dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biociências da Universidade Eduardo Mondlane”, área de concentração em Microbiologia

Maputo, 3 de Dezembro de 2025

(Ventura Relvas Elisa Jaime Azarias Chongo)

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela dádiva da vida e saúde, sendo ele meu guia e protector.

Dirijo a minha profunda gratidão aos meus pais, Jaime Mucavata Chongo (em memória) e Elisa Lourenço Chauque, pela educação exemplar, valores transmitidos e orientação nos caminhos que escolhi trilhar, sobretudo de academia.

Aos meus irmãos, Ângela Maria, Virtude Gentil e Renata do Rosário, expresso o meu reconhecimento e agradecimento inestimável pelo apoio incondicional, incentivo constante e contribuição moral e económica, especialmente durante esta etapa académica muito desafiadora.

Às minhas filhas, Nehms da Ângela, Muthuze e Gavissane (carinhosamente "avosinha"), dedico menção especial pela compreensão, resiliência e paciência durante os períodos de dedicação exclusiva a esta pesquisa, que exigiram sacrifícios compartilhados.

Aos meus supervisores, Doutora Alice e Doutor Jerónimo Langa, manifesto sincero apreço pela orientação rigorosa, disponibilidade para discussões enriquecedoras, acesso a recursos e materiais indispensáveis para a concretização deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Sumbana, agradeço pela mentoria técnica, paciência na transmissão de conhecimentos e suporte na aquisição de conteúdos relevantes. Extensivamente, à dra. Esménia reconheço o incansável apoio ao longo do processo.

À Direcção da Faculdade de Medicina, em especial ao Professor Doutor Jahit Sacarlal, pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou esta pesquisa, e à ilustre Prof. Doutora Tufária, cuja influência ditou a escolha deste ramo de investigação.

Por fim, aos funcionários do Departamento de Microbiologia, meu reconhecimento pelo suporte técnico, expertise e colaboração essenciais para a execução prática deste projeto.

A todos que directa ou indirectamente contribuíram para esta conquista, meu eterno e respeitoso obrigado!

1. Índice

Declaração de Originalidade do Projecto.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Figuras.....	x
2. Motivação.....	1
3. Objectivos.....	2
4. Contribuição.....	3
5. Problema.....	4
6. Objectivos Específicos.....	5
7. Revisão Bibliográfica.....	6
7.1. Características Biológicas e Importância de <i>Escherichia coli</i>	6
7.2. Caracterização e Relevância de <i>Escherichia coli</i>	7
7.3. <i>Escherichia coli</i> em Alimentos e Meio Ambiente.....	7
7.4. Estirpes de <i>Escherichia coli</i>	9
7.4.1. <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC).....	9
7.4.2. <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC).....	10
7.4.3. <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC).....	11
7.4.4. <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC).....	12
7.4.5. <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC).....	13
7.5. Resistência Antimicrobiana.....	13
7.5.1. Resistência Intrínseca.....	14
7.5.2. Resistência Adquirida.....	14
7.5.3. Resistência Adaptativa.....	15
7.6. Mecanismos de Resistência de <i>E. coli</i>	15
7.7. Mecanismos de Acção dos Antibióticos.....	16
7.7.1. Antibióticos β -Lactâmicos.....	16
7.7.2. Aminoglicosídeos.....	16
7.7.3. Quinolonas e Fluoroquinolonas.....	17
7.7.4. Tetraciclinas.....	17
7.7.5. Antagonistas da Via Folato.....	17
7.7.6. Macrolídeos.....	18

7.7.7. Fenicóis	18
8. Enquadramento Conceptual ou Teórico	19
8.1. <i>Escherichia coli</i>	19
8.2. Microrganismos Comensais	20
8.3. Patogenicidade	21
8.4. Antimicrobianos	21
9. Metodologia	22
9.1. Tipo de Estudo	22
9.2. Local de Estudo	22
9.3. Período de Estudo.....	22
9.4. População do Estudo	23
9.5. Amostragem	23
9.5.1. Critérios de Inclusão e Exclusão	23
9.6. Recolha de Dados.....	24
9.7. Procedimentos Laboratoriais.....	24
9.7.1. Colheita de Amostras	24
9.7.2. Cultura e Identificação de <i>Escherichia coli</i>	24
9.7.2. Confirmação de <i>Escherichia coli</i>	25
9.7.3. Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana.....	27
9.8. Variáveis, Gestão e Análise de Dados	28
9.8.1. Variáveis do Estudo	28
9.8.2. Plano de Gestão e Análise de dados.....	29
9.9 Aspectos Éticos	29
10. Resultados e Discussão	31
10.1. Resultados	31
10.1.1. Distribuição de <i>Escherichia coli</i>	31
10.1.2. Perfil de Susceptibilidade Antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i>	33
10.1.3. Factores Associados a Multidroga-Resistência em <i>E. coli</i>	34
10.2. Discussão.....	36
10.2.1. Distribuição de <i>Escherichia coli</i>	36
10.2.2. Perfil de Susceptibilidade Antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i>	37
10.2.3. Factores Associados a Multidroga-Resistência em <i>Escherichia coli</i>	41
11. Limitações do Estudo	43
12. Conclusões e Recomendações.....	44
12.1. Conclusões:	44

12.2. Recomendações	45
13. Referências Bibliográficas	46
Apêndices	A
ANEXO I: Formulário de Consentimento Informado para os Participantes do Estudo	A
ANEXO II: Formulário de Recolha de Dados	D
ANEXO III: Formulário de Dados de Laboratório	E
ANEXO IV: Materiais e Equipamentos Utilizados no Estudo	F
ANEXO V: Protocolo de Extracção de DNA	H
ANEXO VI: Etapas de Preparação do Gel de Agarose para Electroforese	H
ANEXO VII: Aprovação Ética do Estudo	H

Resumo

Este estudo, visou caracterizar o perfil de resistência antimicrobiana (RAM) de isolados de *Escherichia coli* obtidos de indivíduos saudáveis em Maputo, Moçambique (2023-2024), considerando a plasticidade genética desta espécie e o aumento do uso indiscriminado de antibióticos no país. Realizamos um estudo descritivo e analítico no qual incluímos um total de 158 participantes assintomáticos, recrutados no Centro de Exames Médicos de Maputo. As amostras de fezes foram cultivadas em ágar MacConkey, identificadas pelo teste de citrato e crescimento em meio cromogénico CPSE, confirmadas por PCR (gene uidA) e testadas para susceptibilidade antimicrobiana para ampicilina, amoxicilina/clavulanato, piperacilina/tazobactam, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima, imipeném, meropeném, ampicilina, gentamicina, ciprofloxacina, sulfametoxazole/trimetoprima e tetraciclina, usando o método disco-difusão de Kirby-Bauer. Os dados sociodemográficos, comportamentos e histórico de uso de antibióticos foram analisados estatisticamente pelo teste Qui-quadrado, com $P \geq 0,05$ de significância estatística. Todos os participantes incluídos no estudo (158/158; 100%), apresentaram colonização por *E. coli*. As altas taxas de resistência de isolados de *E. coli* foram observadas para ampicilina (67/158; 42,4%) e sulfametoxazol/trimetoprima (64/158; 40,5%), e um total de (45/158; 28,5%) foram classificadas como estirpes multidroga-resistentes. Os antibióticos carbapenémicos: imipeném (157/158; 99,4%) e meropeném (155/158; 98,1%) e cefalosporinas: cefepima (156/158; 98,7%), ceftriaxona (149/158; 94,3%) e ceftazidima (127/158; 80,4%) apresentaram maior eficácia apesar de terem mantido uma resistência antimicrobiana a ser considerada. Os factores associados a colonização dos participantes por estirpes de *E. coli* multidroga-resistentes incluíram a faixa etária de 41-50 anos (44,7%; $p < 0,009$) e contacto com animais de estimação (46,8%; $p < 0,001$). *E. coli* comensal em indivíduos saudáveis actua como reservatório de resistência antimicrobiana, destacando-se a urgência de fortalecimento de políticas públicas de aquisição e uso de antibióticos, melhorar o saneamento e implementação de vigilância epidemiológica integrada na abordagem *One Health* através da pesquisa.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, resistência antimicrobiana, indivíduos saudáveis, multidroga-resistência, Maputo.

Abstract

This study aimed to characterize the antimicrobial resistance (AMR) profile of *Escherichia coli* isolates obtained from healthy individuals in Maputo, Mozambique (2023-2024), considering the genetic plasticity of this species and the increased indiscriminate use of antibiotics in the country. We conducted a descriptive and analytical study, including a total of 158 asymptomatic participants recruited at the Maputo Medical Examination Center. Stool samples were cultured on MacConkey agar, identified by the citrate test and growth on CPSE chromogenic medium, confirmed by PCR (*uidA* gene), and tested for antimicrobial susceptibility to ampicillin, amoxicillin/clavulanate, piperacillin/tazobactam, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, sulfamethoxazole/trimethoprim, and tetracycline, using the Kirby-Bauer disk diffusion method. Sociodemographic data, behaviors, and history of antibiotic use were statistically analyzed using the Chi-square test, with $P \geq 0.05$ for statistical significance. All participants included in the study (158/158; 100%) were colonized by *E. coli*. High resistance rates of *E. coli* isolates were observed for ampicillin (67/158; 42.4%) and sulfamethoxazole/trimethoprim (64/158; 40.5%), and a total of (45/158; 28.5%) were classified as multidrug-resistant strains. The carbapenem antibiotics: imipenem (157/158; 99.4%) and meropenem (155/158; 98.1%) as well as the cephalosporins: cefepime (156/158; 98.7%), ceftriaxone (149/158; 94.3%), and ceftazidime (127/158; 80.4%) showed higher efficacy despite some antimicrobial resistance still being present. Factors associated with the colonization of participants by multidrug-resistant *E. coli* strains included the age range of 41-50 years (44.7%; $p < 0.009$) and contact with pets (46.8%; $p < 0.001$). *E. coli* in healthy individuals acts as a reservoir of antimicrobial resistance, highlighting the urgency of strengthening public policies on the acquisition and use of antibiotics, improving sanitation, and implementing integrated epidemiological surveillance in the One Health approach through research.

Keywords: *Escherichia coli*, antimicrobial resistance, healthy individuals, multidrug resistance, Maputo.

Lista de Abreviaturas

- ASS- África Subsaariana
- CEM- Centro de Exames Médicos
- CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*, em Português- Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais.
- ddH₂O- Água bidestilada
- DNA- Ácido desoxirribonucléico
- dNTPs Desoxirribonucleotídeos trifosfato
- *E. coli* *Escherichia coli*
- ESBLs Enzimas Produtoras de Beta-lactamase de Espectro Estendido
- FAMED Faculdade de Medicina
- LB Lúria-Bertani
- MCA Ágar MacConkey
- MDR Multidroga-resistência
- MHA Mueller-Hinton Agar
- mL Mililitro
- OMS Organização Mundial de Saúde
- pb Pares de bases
- PBMRs Países de baixa e média renda
- PCR *Polimerase Chain Reaction*, em Português- Reacção em Cadeia da Polimerase,
- POPs Procedimentos Operacionais Padrão
- RAM Resistência Antimicrobiana
- SSA África Subsaariana
- TAE Tampão Tris-Acetato-EDTA
- Taq *Thermus aquaticus*
- TSA Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana
- U/μL Unidades por microlitro
- UEM Universidade Eduardo Mondlane
- *uidA* Gene codificador da enzima β-D-glucuronidase
- UV Raios ultravioletas
- μg Micro-gramas
- μL Micro-litro

▪ μM

Micro-molar

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição da mistura de PCR para amplificação do gene <i>uidA</i> (623bp).....	25
Tabela 2: Condições da PCR para amplificação do gene <i>uidA</i> (623bp).....	26
Tabela 3: Variáveis de Estudo	28
Tabela 4: Distribuição de <i>Escherichia coli</i> em função das características sociodemográficas, hábitos e comportamentos, histórico de uso prévio de antibióticos e condições sanitárias dos participantes do estudo.....	31
Tabela 5: Associação entre o perfil multidroga-resistência de <i>E. coli</i> com as características de interesse dos participantes do estudo.	35

Lista de Figuras

Figura 1: Representação de uma célula bacteriana, ilustrando os mecanismos comuns de resistência antibacteriana.	16
Figura 2: Múltiplas vias envolvidas na transferência de <i>E. coli</i> com resistência antimicrobiana e de genes de resistência antimicrobiana para animais, humanos e ambiente.	20
Figura 3: Visualização de bandas do gene <i>uidA</i> (623pb), confirmativas para <i>E. coli</i> , em gel de agarose após eletroforese.	26
Figura 5: Fluxograma dos procedimentos aplicados no estudo.....	30
Figura 6: Frequência de susceptibilidade antimicrobiana de <i>E. coli</i> isolados de amostras de fezes de indivíduos saudáveis em Maputo.....	33

2. Motivação

A resistência antimicrobiana (RAM) configura-se como uma das maiores ameaças à saúde pública global com impacto particularmente devastador em países de baixa renda, onde a escassez de regulamentação sanitária e o acesso indiscriminado a antimicrobianos acelera a selecção de patógenos multirresistentes (Klein *et al.*, 2019; van Duin & Paterson, 2016).

Em Moçambique, esse cenário é agravado pela carência de dados epidemiológicos robustos sobre a prevalência da RAM em bactérias como *Escherichia coli*, que habitam o trato intestinal humano. Embora classificada como comensal, a *E. coli* é reconhecida por sua capacidade de adquirir e disseminar mecanismos de resistência, tais como β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e AmpC plasmídica (pAmpC), funcionando como reservatório silencioso de genes críticos para a RAM em ambientes comunitários (Chirindze *et al.*, 2018).

A motivação central desta pesquisa reside na origem específica das estirpes analisadas: amostras fecais de indivíduos saudáveis de Maputo que buscam certificados médicos para actividades cotidianas, como condução de veículos ou manuseio de alimentos, exigidos por autoridades locais. Apesar da aparente saúde desses indivíduos, a hipótese de que suas microbiotas intestinais abrigam *E. coli* com perfis de resistência eventualmente alarmantes ganha relevância diante da falta de um sistema de vigilância da RAM e do uso inapropriado e desregulado de antibióticos no País, práticas associadas ao surgimento de patógenos multidroga-resistentes (MDR) e ao aumento da morbimortalidade (Mate *et al.*, 2019; Rodrigues, 2020; Torres *et al.*, 2020).

3. Objectivos

A presente dissertação teve como objectivo geral caracterizar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de amostras de fezes de indivíduos saudáveis (sem infecção gastrointestinal activa) residentes em Maputo, visando determinar padrões de resistência e sua relevância para a saúde pública, bem como caracterizar possíveis factores de risco associados à aquisição e colonização por estirpes de *E. coli* comensal multidroga-resistentes.

4. Contribuição

Este estudo, aborda lacunas epidemiológicas em Moçambique, um País de baixa renda com dados limitados sobre a prevalência de resistência antimicrobiana (RAM) em *E. coli* de portadores assintomáticos. A pesquisa fornece evidências pioneiras sobre a dinâmica de RAM em contextos comunitários em Maputo, onde práticas inadequadas de uso de antibióticos e acesso não regulamentado a esses medicamentos podem amplificar a emergência de MDR (Mate *et al.*, 2019; Rodrigues, 2020; Torres *et al.*, 2020). Estes dados são essenciais para entender a evolução de patógenos prioritários e validam a teoria de que indivíduos saudáveis actuam como reservatórios de mecanismos de resistência, um fenómeno subestimado em regiões com vigilância insuficiente e já referenciado por Chirindze e colaboradores (2018).

Para a sociedade, os resultados podem orientar políticas públicas baseadas em evidências, como a regulamentação da venda de antibióticos e a promoção de práticas de higiene comunitária. Em Moçambique, onde a prática de automedicação é frequente, a identificação de factores de risco locais permitirá intervenções direccionadas para reduzir a propagação de estirpes de *E. coli* MDR. Adicionalmente, a integração de dados epidemiológicos em plataformas de vigilância regional, como a Rede Africana de Resistência Antimicrobiana, fortalecerá respostas coordenadas entre saúde humana, animal e ambiental, essenciais para conter surtos de infecções intratáveis e proteger populações vulneráveis (WHO, 2022).

No âmbito ambiental, a identificação de reservatórios humanos de MDR alertará para o risco de dispersão de genes de resistência através de águas residuais, solo e cadeias alimentares, especialmente em áreas com saneamento precário. Estudos demonstram que a contaminação ambiental por bactérias resistentes incluindo *E. coli* exacerba a pressão selectiva em ecossistemas, comprometendo a biodiversidade e a segurança alimentar (Berendonk *et al.*, 2015).

Esta dissertação, contribui ainda para a agenda global de sustentabilidade, apoiando o objectivo de Desenvolvimento Sustentável 3 (Saúde e Bem-Estar) e a Meta 3.d da OMS para o controle da RAM até 2030 (WHO, 2017).

5. Problema

A RAM em *Escherichia coli* de ambientes comunitários e clínicos, particularmente a portadora de genes de resistência antibióticos β -lactâmicos de amplo espectro representa uma ameaça crítica à saúde pública global e local (Chirindze *et al.*, 2018; Estaleva *et al.*, 2021; Santona *et al.*, 2022). Em Moçambique, a escassez de vigilância epidemiológica em tempo real e o uso não regulamentado de antibióticos aumentam a disseminação de bactérias multirresistentes (MDR), comprometendo o tratamento de infecções comunitárias e hospitalares (Mandomando *et al.*, 2010; Mshana *et al.*, 2013).

A magnitude do problema da RAM é alarmante na Africa Subsahariana (ASS), sendo que a prevalência de estirpes de *E. coli* multidroga resistentes isoladas da comunidade chega a atingir 80%, tal como reportado num estudo conduzido por Chirindze e colaboradores (2018) em Moçambique. Esse fenótipo está associado a maior morbimortalidade, prolongamento de hospitalizações, custos económicos elevados e falha terapêutica, especialmente em populações vulneráveis com acesso limitado a alternativas antimicrobianas (Klein *et al.*, 2019; van Duin & Paterson, 2016).

Sabe-se que a plasticidade genética de *E. coli*, impulsionada por elementos móveis como plasmídeos e transposons, facilita a aquisição e disseminação de genes de RAM, mesmo em indivíduos assintomáticos (Mathers *et al.*, 2015; Partridge *et al.*, 2018; Ur Rahman *et al.*, 2018). No entanto, em Moçambique a maioria das pesquisas concentra-se em isolados clínicos, negligenciando a caracterização de *E. coli* em portadores saudáveis, que podem actuar como reservatórios de genes de resistência.

As lacunas críticas identificadas para a implementação desta pesquisa, incluem: a) A ausência de vigilância contínua sobre a prevalência de fenótipos de resistência emergentes em *E. coli* comensal de indivíduos assintomáticos em Moçambique; b) A carência de evidências sobre factores de risco locais que favorecem a colonização por *E. coli* comensal MDR. Por conseguinte, esta pesquisa visa auxiliar o preenchimento dessas lacunas ao caracterizar fenotipicamente isolados fecais de *E. coli*, em Maputo, fornecendo bases científicas para orientar intervenções intersectoriais alinhadas ao conceito *One Health*, essenciais para conter a crise da RAM em contextos de recursos limitados.

6. Objectivos Específicos

Os objectivos específicos deste estudo incluem:

- ❖ Descrever as características sociodemográficas da população em estudo;
- ❖ Descrever a distribuição de *E. coli* isolada de amostras de fezes de indivíduos saudáveis em Maputo;
- ❖ Determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *E. coli* a antibióticos de uso clínico;
- ❖ Identificar factores associados à ocorrência de perfil multidroga-resistência (MDR) em estirpes de *E. coli*, correlacionando o perfil MDR com as seguintes variáveis:
 - Variáveis sociodemográficas dos participantes do estudo (sexo, faixa etária, proveniência e nível de escolaridade);
 - Histórico de uso prévio de antibióticos (consumo de antibióticos nos últimos 14 dias);
 - Exposição a factores comportamentais (consumo de alimentos de rua e contacto com animais de estimação);
 - Condições sanitárias dos participantes do estudo.

7. Revisão bibliográfica

7.1. Características Biológicas e Importância de *Escherichia coli*

E. coli, descrita por Theodor Escherich em 1885, é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, não formadora de esporos, oxidase-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Como anaeróbio facultativo, cresce preferencialmente a 37°C, apresenta mobilidade via flagelos peritríquios (em estirpes móveis) e fermenta lactose com produção de ácido e gás em 24 horas a 44,5°C. Seu metabolismo é versátil, alternando entre respiração aeróbica e fermentação, dependendo das condições ambientais (Kaper *et al.*, 2004).

E. coli coloniza o trato intestinal de humanos e animais de sangue quente como um comensal benéfico, contribuindo para a síntese de vitamina K e competição contra patógenos (Clements *et al.*, 2012). No entanto, sua plasticidade genética permite que adquira factores de virulência (FVs) via elementos móveis (plasmídeos, *transposons*), transformando-a em um patógeno oportunista. Estirpes patogénicas podem causar doenças intestinais ou extraintestinais, como infecções do trato urinário (ITU), sepses e meningite (Kaper *et al.*, 2004).

E. coli é um dos principais agentes de infecções comunitárias e nosocomiais. Em países de baixa e média renda, é responsável por até 30% das diarreias em crianças <5 anos (Ochoa & Contreras, 2011). Como patógeno extraintestinal, destaca-se nas ITU: 50% das mulheres adultas são acometidas por pelo menos um episódio de ITU na vida, frequentemente associado a cepas uropatogénicas (*UPEC*) (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Em ambientes hospitalares, *E. coli* é responsável por 40% das ITU nosocomiais, muitas vezes vinculadas por catéteres urinários (Foxman, 2014).

A patogenicidade de *E. coli* está ligada a FVs como adesinas (ex.: fímbrias tipo P), toxinas (ex.: Shiga toxina), e sistemas de captação de ferro (ex.: sideróforos). A presença desses FVs define os patótipos (ex.: *ETEC*, *EHEC*, *UPEC*), que estão associados a quadros clínicos específicos (Croxen *et al.*, 2013).

Filogeneticamente, *E. coli* é categorizada em quatro grupos principais (A, B1, B2, D), com distribuição distinta: a) grupos A e B1: dominantes em isolados comensais de fezes humanas, associados a genomas menores e menor diversidade de FVs; b) Grupos B2 e D: prevalentes em cepas patogénicas extraintestinais (ex.: *UPEC*, *MNEC*), devido à maior frequência de FVs como *pap* (fímbrias P) e *kps* (cápsula polisacarídica) (Clermont *et al.*, 2000; Tenailon *et al.*, 2010).

7.2. Caracterização e Relevância de *Escherichia coli*

E. coli comensal é um componente fundamental da microbiota intestinal humana, colonizando o trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis sem causar danos. Um exemplo clássico é a estirpe *E. coli* K-12, amplamente estudada como modelo de bactéria comensal não patogênica, presente em humanos e animais (Blount, 2015). A sua coexistência pacífica com o hospedeiro é mediada por interações metabólicas e exclusão competitiva de patógenos entéricos. As linhagens comensais de *E. coli* desempenham papéis essenciais na homeostase intestinal, incluindo a protecção contra patógenos que competem por nutrientes e sítios de adesão, inibindo a colonização por microrganismos exógenos (Kamada *et al.*, 2013). Ademais, contribuem nutricionalmente sintetizando vitamina K2 e ácidos graxos de cadeia curta, essenciais para a integridade epitelial e modulação imunológica (Clermont *et al.*, 2000). A aquisição de FVs pode converter *E. coli* comensal em patógenos oportunistas, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos (Kamada *et al.*, 2013).

7.3. *Escherichia coli* em Alimentos e Meio Ambiente

A utilização de *E. coli* como indicador de contaminação fecal remonta ao final do século XIX, quando seu isolamento em água passou a sinalizar riscos sanitários associados à presença de patógenos entéricos, como *Salmonella spp.* (Edberg *et al.*, 2000). Esta aplicação estendeu-se aos alimentos, onde a detecção de *E. coli* indica falhas no processamento térmico, higiene inadequada durante a produção ou contaminação pós-processamento, como durante o armazenamento ou transporte (Edberg *et al.*, 2000).

Como membro do grupo coliformes termotolerantes (crescimento a 45°C), *E. coli* é o marcador mais confiável de contaminação fecal em alimentos e água. Sua presença está fortemente associada a: a) Contaminação directa: falhas na higiene de manipuladores ou processamento de matérias-primas de origem animal (ex.: carnes não cozidas) b) Contaminação indirecta: uso de água não tratada, contacto com solo contaminado por fezes ou esgoto (Machado-Moreira *et al.*, 2019).

Embora *E. coli* possa, em casos raros, originar-se de fontes ambientais não fecais (ex.: solo), sua detecção em alimentos crus, como vegetais folhosos ou laticínios, é um alerta prioritário para riscos microbiológicos (Machado-Moreira *et al.*, 2019).

A correlação entre *E. coli* e patógenos entéricos (ex.: *Salmonella*, *Campylobacter*) é bem estabelecida. Além disso, estirpes patogénicas de *E. coli* (ex.: *EHEC*, *ETEC*) são responsáveis por surtos globais associados a alimentos contaminados, como o surto de *EHEC* O157:H7 em espinafre nos EUA (2006), que causou 205 hospitalizações (Heiman *et al.*, 2015).

E. coli em alimentos é regulamentada por padrões internacionais, como os do *Codex Alimentarius* (OMS/FAO), que estabelecem limites máximos (ex.: 100 UFC/g) para alimentos prontos para consumo. Já na água potável, a OMS exige ausência de *E. coli* em 100 (WHO, 2017). Em Moçambique, o saneamento precário, a falta de infraestrutura de drenagem e a falta de infraestrutura para monitoramento microbiológico em zonas urbanas e rurais agrava os riscos de contaminação. Recentemente foi reportada a contaminação por *E. coli* em 23 % de amostras de água potável em alguns bairros da cidade de Maputo (Nhantumbo *et al.*, 2023).

A utilização de *E. coli* como indicador de contaminação fecal remonta ao final do século XIX, quando seu isolamento em água passou a sinalizar riscos sanitários associados à presença de patógenos entéricos, como *Salmonella* spp. (Edberg *et al.*, 2000). Essa aplicação estendeu-se aos alimentos, onde a detecção de *E. coli* indica falhas no processamento térmico, higiene inadequada durante a produção ou contaminação pós-processamento, como durante o armazenamento ou transporte (Edberg *et al.*, 2000).

Como membro do grupo coliformes termotolerantes (crescimento a 45°C), *E. coli* é o marcador mais confiável de contaminação fecal em alimentos e água. Sua presença está fortemente associada a: a) Contaminação direta: falhas na higiene de manipuladores ou processamento de matérias-primas de origem animal (ex.: carnes não cozidas) b) Contaminação indirecta: uso de água não tratada, contacto com solo contaminado por fezes ou esgoto (Machado-Moreira *et al.*, 2019).

Embora *E. coli* possa, em casos raros, originar-se de fontes ambientais não fecais (ex.: solo), sua detecção em alimentos crus, como vegetais folhosos ou laticínios, é um alerta prioritário para riscos microbiológicos (Machado-Moreira *et al.*, 2019).

A correlação entre *E. coli* e patógenos entéricos (ex.: *Salmonella*, *Campylobacter*) é bem estabelecida. Além disso, cepas patogénicas de *E. coli* (ex.: *EHEC*, *ETEC*) são responsáveis por surtos globais associados a alimentos contaminados, como o surto de *EHEC* O157:H7 em espinafre nos EUA (2006), que causou 205 hospitalizações (Heiman *et al.*, 2015).

A presença de *E. coli* em alimentos é regulamentada por padrões internacionais, como os do *Codex Alimentarius* (OMS/FAO), que estabelecem limites máximos (ex.: 100 UFC/g) para alimentos prontos para consumo. Já na água potável, a OMS exige ausência de *E. coli* em 100 (WHO, 2017). Em Moçambique, o saneamento precário, a falta de infraestrutura de drenagem e a falta de infraestrutura para monitoramento microbiológico em zonas urbanas e rurais agrava riscos, com estudos reportando contaminação por *E. coli* em 23 % de amostras de água potável em alguns bairros da cidade de Maputo (Nhantumbo *et al.*, 2023).

7.4. Patótipos de *Escherichia coli*

Os patótipos de *E. coli* intestinais são principalmente classificados em cinco categorias descritas: *E. coli* enteropatogénica (*EPEC: eae* e *bfpA*), *E. coli* enterohemorrágica (*EHEC*), *E. coli* enterotoxigénica (*ETEC*), *E. coli* enteroagregativa (*EAEC*), *E. coli* enteroinvasiva (*EIEC*) e *E. coli* difusamente aderente (*DAEC*). Este estudo não aborda as estirpes de *E. coli* intestinal (comensal) devido a limitação de reagentes laboratoriais e tempo para a caracterização dos factores de virulência (Kaper *et al.*, 2004).

7.4.1. *Escherichia coli* Enterohemorrágica (*EHEC*)

E. coli enterohemorrágica (*EHEC*) inclui a toxina semelhante a Shiga (*SLTEC*) e *E. coli* produtora verocitotoxina (*SLTEC*) que é um comensal normal no trato gastrointestinal de ruminantes, incluindo, caprinos, bovinos, ovinos e outros animais de criação. É caracterizada pela produção de dois tipos de toxinas Shiga: *stx₁* e *stx₂* (Aslan *et al.*, 2018).

É a causa importante de doenças transmitidas por alimentos e as infecções têm sido associadas a uma ampla gama de doenças clínicas humanas que variam de diarreia leve a sanguinolenta e Síndrome Hemolítico-Urémica (*SHU*) que é um factor importante na insuficiência renal aguda em criança (Nguyen & Sperandio, 2012; Croxen *et al.*, 2013)

O principal reservatório de *EHEC* é o gado bovino. A *EHEC* também pode permanecer vivo durante meses em fezes, solo e água de bovinos. O modo de transmissão é fecal-oral. Ocorre principalmente através da ingestão ou manipulação de alimentos contaminados, pode ser transmitida também a humanos por contacto directo ou indirecto com animais principalmente ruminantes, ou também através de água contaminada (Croxen *et al.*, 2013).

Cerca de 85% das infecções por EHEC são de origem alimentar. Os vegetais, frutas e água contaminada têm sido associados a surtos de *E. coli* O157:H7 um sorotipo de EHEC (Manhique *et al.*, 2020).

Embora a carne bovina moída, mal cozida tenha sido identificada como principal veículo de EHEC, os vegetais crus frescos incluindo a alface também estão se tornando fontes cada vez mais importante de transmissão alimentar deste patótipo (Croxen *et al.*, 2013). Com base na gravidade da doença, EHEC é considerada como patótipo de *E. coli* mais importante entre os patógenos de origem alimentar. O tratamento geral é a terapia de rehidratação oral e antibioticoterapia (Croxen *et al.*, 2013).

A patogenicidade da EHEC tem sido associada aos seguintes factores de virulência: toxina shiga, factores de adesão, locus de apagamento de enterócitos (LEE) e intimina. As toxinas shiga (*stx*₁ e *stx*₂) são os principais factores de virulência de EHEC (Kaper *et al.*, 2004). Os genes que codificam as toxinas *stx*₁ são carregados por bacteriófagos e *stx*₂ podem ser encontrados tanto em bacteriófagos como no cromossoma bacteriano. Os outros factores de patogenicidade envolvendo adesinas, fímbrias, flagelos e ilha de patogenicidade LEE, são usados pela EHEC para colonização e fixação. LEE é uma região cromossómica chamada locus de apagamento de enterócitos que codifica um factor de secreção do tipo III (T3SS), adesão chamada intimina (*eae*) (Kaper *et al.*, 2004).

As técnicas de diagnóstico e detecção de EHEC incluem a cultura e detecção de toxinas. Ao contrário da maioria de *E. coli*, muitos patótipos de EHEC não fermentam o sorbitol. Utiliza-se o ágar MacConkey-Sorbitol (SMAC), onde as colónias são transparentes. Adicionalmente, faz-se a pesquisa dos genes *stx*₁ e *stx*₂ que codificam para toxinas usando a técnica de PCR (Croxen *et al.*, 2013).

7.4.2. *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)

E. coli enteroagregativa (EAEC) é um enteropatogénico de origem alimentar, cada vez mais reconhecido como agente causador de diarreia do viajante e diarreia persistente em crianças imunocomprometidas em Países em desenvolvimento (Jenkins, 2018). É a segunda causa mais comum de diarreia de viajantes depois de ETEC e está associado a surtos de diarreia de origem alimentar em países em desenvolvimento (Okoh & Osode, 2008).

Os sintomas da infecção por EAEC frequentemente são diarreias aquosas com muco e são acompanhados por febre, vômito e dor abdominal. O tratamento da infecção por EAEC

consiste na terapia de rehidratação oral e terapia antimicrobiana. Os antibióticos são úteis para o tratamento de casos de diarreia do viajante. No entanto, a resistência aos antibióticos de *EAEC* está aumentando em todo mundo (Croxen *et al.*, 2013).

A patogênese da *EAEC* é determinada pela capacidade de aderência às células intestinais, produção de enterotoxinas e citotoxinas, e induzir a inflamação da mucosa. As estirpes de *EAEC* caracterizam-se pela capacidade de se agregarem intimamente entre si, aderir as células HEp-2 humanas e também se ligar a superfícies abióticas quando cultivadas em placas de cultura de tecidos vivos. Neste ambiente de crescimento, as colónias de *EAEC*, se assemelham a tijolos empilhados quando vistas por microscopia de luz (Croxen *et al.*, 2013).

No nível molecular, os genes que codificam para o fenótipo agregativo estão contidos em um grande plasmídeo (pAA). O regulador *aggR* presente em pAA controla uma série de genes de plasmídeo que codificam para factores de virulência e pelo menos 2 ilhas de patogenicidade no cromossoma *EAEC* (Durand *et al.*, 2016). A dispersina, uma proteína antiagregativa antigénica codificada pelo gene *aap* no plasmídeo pAA e regulada por *aggR*, modula a adesão fimbrial e facilita a penetração do microrganismo através do muco intestinal pela ligação ao lipopolissacarídeo e alterando as propriedades electrostáticas da superfície da membrana externa da *EAEC*. Embora nem toda *EAEC* contém o gene *aap* (Durand *et al.*, 2016).

Os métodos que têm sido utilizados para a identificação de *EAEC*, incluem um ensaio de reacção em cadeia da polimerase (PCR), teste de formação de aglomerados (agregação bacteriana visível na superfície do meio de cultura líquido), ensaio de aderência de lâmina de vidro e o ensaio convencional de aderência a células HEp-2 (Petro *et al.*, 2020). Geralmente, a PCR é direccionada aos seus genes de virulência que são predominantemente codificados por plasmídeo, incluindo um regulador de múltiplos factores de virulência de plasmídeo (*aggR*), gene transportador de antígeno de agregação (*aat*) e o gene que codifica a dispersina (*aap*) (Petro *et al.*, 2020).

7.4.3. *Escherichia coli* Enteropatogénica (*EPEC*)

EPEC constitui a causa de diarreias em bebés em Países em desenvolvimento. A infecção por *EPEC* é rara em crianças mais velhas e em adultos, provavelmente porque apresentam imunidade protectora. A presença da doença se caracteriza pela adesão bacteriana às células epiteliais do intestino delgado ocorrendo a destruição das microvilosidades (lesão *attachment and effacement*[A/E]) (Hu & Torres, 2015). Os genes responsáveis pelo *locus*

of enterocyte effacement (LEE) se localizam numa ilha de patogenicidade contendo mais de 40 genes que media a adesão e a destruição da superfície mucosa do hospedeiro (Hu & Torres, 2015).

As estirpes de *EPEC* formam microcolónias na superfície das células epiteliais, com bactérias aderidas às células do hospedeiro através da formação de pedestais. No começo, ocorre uma adesão fraca mediada por pili (formadores de feixes) e seguidamente pela secreção activa de proteínas pelo sistema de secreção bacteriano do tipo III para o interior da célula do hospedeiro. Uma proteína, o receptor da intimina translocada (Tir) é inserida na membrana da célula epitelial funcionando como receptor para uma adesina da membrana bacteriana externa, a intimina. A diarreia aquosa característica desta doença, resulta da má absorção causada pela destruição de microvilosidades (Hu & Torres, 2015).

7.4.4. *Escherichia coli* Enterotoxigênica (*ETEC*)

ETEC é a mais comum em países de baixa e média renda. A fonte de infecção é normalmente de alimentos ou água contaminados e não ocorre a disseminação de pessoa a pessoa. As infecções ocorrem em crianças pequenas e em pessoas que viajam para essas áreas (Croxen *et al.*, 2013; Jenkins, 2018).

ETEC produz duas classes de enterotoxinas: toxina termolábeis (*LT-I*, *LT-II*) e toxinas termoestáveis (*STa* e *STb*). A toxina *LT-I*, está associada a doenças humanas e consiste em uma subunidade A e cinco subunidades B idênticas. As subunidades B se ligam ao mesmo receptor que a toxina colérica (GM, gangliosídeos GM1) bem como a outras glicoproteínas de superfície no intestino delgado. Depois da endocitose, a subunidade A de *LT-I* passa para a membrana do vacúolo. Esta unidade apresenta ADP-ribosiltransferase e interage com uma membrana (Gs) que regula adenilato ciclase onde o efeito final é o aumento nos níveis de cAMP e com o aumento da secreção do cloreto. Estas alterações se manifestam como diarreia aquosa (Croxen *et al.*, 2013).

A exposição à toxina estimula também a secreção de prostaglandinas e a produção de citoxinas inflamatórias resultando em maior perda de líquidos. *STa* é um pequeno peptídeo monomérico que se liga ao receptor transmembrana de guanilato ciclase e está associado à doença humana o que não ocorre em *STb*. Os genes para *LT-I* e *STa* estão presentes num plasmídeo transferível que porta também genes (*CFA/I*, *CFA/II*, *CFA/III*). As fimbrias são

factores de colonização que definem a especificidade do hospedeiro e são fundamentais para que a doença ocorra (Murray *et al.*, 2005).

Não é possível, distinguir se a doença é causada pelas toxinas termolábeis ou termoestáveis (Croxen *et al.*, 2013). A produção de toxinas não está associada a sorogrupos específicos, no entanto se recomenda a realização da cultura em imunoenaios para a detecção das toxinas. Nisto, foram desenvolvidos ensaios comerciais que detectam toxinas em culturas de células, mas estes exames, são usados principalmente em Laboratórios de referência (Croxen *et al.*, 2013).

7.4.5. *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)

EIEC não é comum em países de baixa e média renda. São apontadas como principais estirpes patogénicas incluindo os serotipos O: 0124, 0143 e O164. Estas estirpes são semelhantes a *Shigella* em termos fenotípicos e patogénicos. As bactérias invadem e destroem o epitélio do colon produzindo uma diarreia aquosa. Uma série de genes bacterianos são encontrados em plasmídeos (genes *pInv*)- mediadores da invasão do epitélio ao colon. O movimento dentro do citoplasma e a invasão é regulado pela formação de caudas de actina processo pelo qual pode terminar com a progressão para a ulceração do colon (Murray *et al.*, 2005; Croxen *et al.*, 2013).

A detecção de estirpes de *EIEC* está restrita a laboratórios de pesquisa. Embora tenham sido desenvolvidos imunoenaios e testes baseados em ácidos nucleicos para a detecção de factores relacionados à invasão, a utilidade destes ensaios é limitada, porque os genes que codificam estes factores de virulência residem num grande plasmídeo que é rapidamente perdido *in vitro* (Croxen *et al.*, 2013).

7.5. Resistência Antimicrobiana

A resistência antimicrobiana (RAM) é a forma como as bactérias estão sujeitas a sobreviver à acção de antimicrobianos. A resistência a antibióticos pode ser resultante de mutações espontâneas, como modificações de sítio de ligação de antibiótico, ou ainda, provocada pela aquisição de genes de resistência (Christaki *et al.*, 2020; Lee, 2019). Os mecanismos de resistência a antibióticos são expressos por genes localizados, geralmente, em elementos móveis como transposons, integrons e plasmídeos. Estes componentes podem ser difundidos entre bactérias de espécies diferentes, num processo designado por transferência horizontal de genes (Babakhani & Oloomi, 2018).

A resistência antimicrobiana ocorre naturalmente, contudo, torna-se cada vez mais frequente em consequência das actividades humanas, que com o uso indiscriminado de antibióticos tomados por via oral para tratar infeções bacterianas, causa pressão selectiva em bactérias, eliminando os microrganismos susceptíveis e poupando os que possuem mecanismos de sobrevivência (Babakhani & Oloomi, 2018; Christaki *et al.*, 2020)

A exposição da *E. coli* a antibióticos, contribui para a pressão selectiva e desenvolvimento de resistência (Allocati *et al.*, 2013). De facto, *E. coli* comensal é um dos principais reservatórios para a transmissão de resistência a antibióticos a outras bactérias patogénicas por meio de troca de plasmídeos. Os seres humanos podem ser expostos a *E. coli* comensal resistente a antibióticos por contacto com gado ou um ambiente natural contaminado e por alimentos inadequadamente cozidos ou por contaminação cruzada (Marshall *et al.*, 2020).

O uso indiscriminado de antibióticos, seja em aplicação terapêutica, profilática ou na promoção de crescimento no sector pecuário, tem impulsionado a emergência da resistência bacteriana em escala mundial. Este cenário, tem aumentado drasticamente os custos com a medicação e internamento de pacientes, além de ocasionar aumento no número de óbitos (Feldman *et al.*, 2022)

7.5.1. Resistência Intrínseca

A resistência intrínseca refere-se à capacidade natural e inerente de uma bactéria de resistir à acção de um antibiótico (Christaki *et al.*, 2020). A título de exemplo, a resistência intrínseca a glicopeptídeos exibido por bactérias Gram-negativas devido à capacidade de impermeabilização da membrana externa presente no envelope da célula bacteriana Gram-negativa (Christaki *et al.*, 2020).

7.5.2. Resistência Adquirida

Entende-se como resistência adquirida, à resistência exibida quando uma bactéria previamente sensível adquire um mecanismo de resistência por mutação ou pela aquisição de novo material genético de uma fonte exógena (transferência horizontal de genes) (Zhang *et al.*, 2011).

7.5.3. Resistência Adaptativa

A resistência adaptativa é tida como a resistência de um ou mais antibióticos induzidos por um sinal ambiental específico (por exemplo, estresse, estado de crescimento, pH, concentrações de íons, condições de nutrientes, níveis sub-inibitórios de antibióticos). Em contraste com a resistência intrínseca e adquirida, esta é transitória, permite que as bactérias possam responder mais rapidamente ao desafio com antibióticos, geralmente reverte ao estado original quando o sinal indutor é removido (Fernández *et al.*, 2011; Lee, 2019; Motta *et al.*, 2015).

Este tipo de resistência, parece ser o resultado de modulações na expressão génica como resposta a mudanças ambientais, e ela é possivelmente o resultado de mudanças epigenéticas. Especificamente, tem sido sugerido que a metilação do DNA poderia ser responsável pela presença de diferentes perfis de expressão génica numa população bacteriana e poderia fornecer a heterogeneidade e a hereditariedade epigenética da expressão génica essencial para a ocorrência de resistência adaptativa (Motta *et al.*, 2015).

Em particular, a modulação da expressão de bombas de fluxo e porinas, tem sido implicada no surgimento de resistência adaptativa (Motta *et al.*, 2015).

7.6. Mecanismos de Resistência de *E. coli*

As espécies bacterianas incluindo a *E. coli* resistem à ação inibitória de antibióticos por meio de quatro (4) mecanismos primários que muitas vezes operam em simultâneo entre si, nomeadamente: diminuição da captação dos antibióticos, modificação do alvo, efluxo de antibióticos e inativação enzimática dos antibióticos (β -lactamases). Dentre os mecanismos, a inativação enzimática é o principal mecanismo de resistência contra os β -lactâmicos (Tooke *et al.*, 2019).

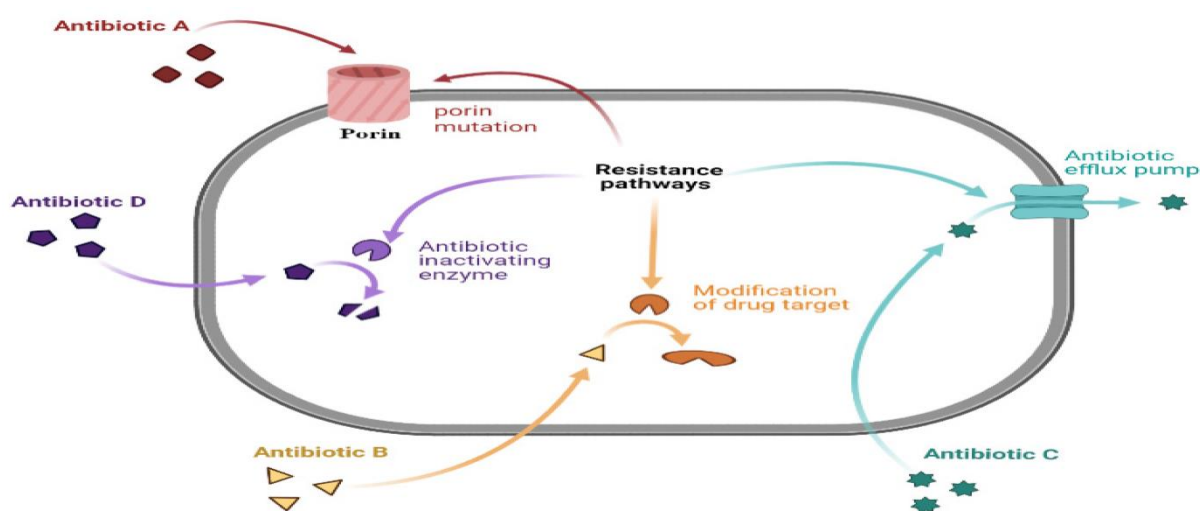


Figura 1: Representação de uma célula bacteriana, ilustrando os mecanismos comuns de resistência antibacteriana.

O antibiótico A corresponde ao mecanismo de limitação da captação do fármaco; B, à modificação do alvo do fármaco; C, ao efluxo do antibiótico; e D, à inativação do fármaco por enzimas bacterianas. Fonte: Iskandar *et al.* (2022).

7.7. Mecanismos de Acção dos Antibióticos

7.7.1. Antibióticos β -Lactâmicos

Os antimicrobianos β -lactâmicos contêm na sua estrutura química um anel de amida cíclica, porém, a subclassificação do antibiótico é definida de acordo com a junção de outros anéis que lhe é adicionado (Lima *et al.*, 2020).

Esta classe de antimicrobianos, tem o mesmo alvo e actividade sob a parede celular bacteriana, provocando uma ruptura celular osmótica (Christaki *et al.*, 2020)

A parede bacteriana é formada por uma camada (polímero) de peptidoglicano, composto por unidades estruturais de ácido N-acetilmurâmico e carbohidrato N-acetilglicosamina, como também aminoácidos que constituem tetrapeptidoglicano - responsáveis pela junção das cadeias cruzadas-, este complexo estrutural, configura o arcabouço celular. Esse polímero é sintetizado, alongado e ligado através da actividade de enzimas transglicosidase, transpeptidase, carboxipeptidase e endopeptidase, conhecidas como proteínas de ligação de penicilina (PBP) (Madigan *et al.*, 2022). Esse grupo de antibióticos, se subdivide em cinco (5) subclasses principais, com espectro estruturais e espectro de acção distintos, nomeadamente: monobactâmicos, penicilinas, cefalosporinas, carbapenemicos e β -lactâmicos em combinação com inibidores da β -lactamase (Madigan *et al.*, 2022).

7.7.2. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antibióticos naturais eficientes contra bactérias Gram negativas, e com média actuação contra Gram positivos, sendo utilizados como recurso terapêutico desde 1944 (Murray *et al.*, 2005). Esta classe de antibióticos, apresenta alguns efeitos adversos como nefrotoxicidade, e não atravessam a barreira hematoencefálica. A sua acção bactericida é muito utilizada em combinações por actuar bem em sinergismo, principalmente com antibióticos beta-lactâmicos. Sendo que, a sua concentração é mais importante do que sua exposição a célula bacteriana (Becker & Cooper, 2013; Ramirez & Tolmasky, 2017). Os antibióticos desta

classe, são formados pela presença do anel aminociclitol com ligações glicosídicas a açúcares aaminados (Becker & Cooper, 2013; Ramirez & Tolmasky, 2017).

7.7.3. Quinolonas e Fluoroquinolonas

São grupos de antibióticos relacionados com os derivados do ácido nalidíxico, usados no tratamento das infecções bacterianas. Estas classes, podem desencadear efeitos colaterais debilitantes e, portanto, não devem ser usadas como primeira linha de tratamento (Majalekar & Shirote, 2020).

As fluoroquinolonas apresentam um átomo de flúor não observado nas quinolonas. Ambas formam o grupo de antibióticos mais tóxicos actualmente em uso com mais de 40% de efeitos colaterais aos usuários. Mais de metade de fármacos desta classe, já foram removidos do uso clínico devido a reacções adversas que podem causar danos permanentes. São efectivos contra bacilos entéricos Gram-negativos (família *Enterobacteriaceae*) (Majalekar & Shirote, 2020).

7.7.4. Tetraciclinas

As tetraciclinas constituem uma classe de antibióticos bacteriostáticos de amplo espectro, cujo mecanismo de acção primário envolve a inibição da síntese proteica bacteriana. Estes agentes ligam-se reversivelmente à subunidade ribossomal 30S, especificamente ao sítio de ligação do aminoacil-tRNA, impedindo a conexão adequada do tRNA carregado ao complexo ribossomo-mRNA. Esse bloqueio, interrompe a elongação da cadeia polipeptídica, comprometendo processos vitais de crescimento e reprodução bacteriana (Murray *et al.*, 2005; Tortora *et al.*, 2017).

7.7.5. Antagonistas da Via Folato

As sulfonamidas são agentes antimicrobianos classificados como antimetabólicos, capazes de inibir competitivamente a enzima di-hidropteroato sintetase (DHPS), essencial para a síntese do ácido fólico em bactérias. Estes fármacos, competem estruturalmente com o ácido *p*-aminobenzóico (PABA), um precursor do di-hidrofolato (DHF), impedindo a formação de cofactores necessários para a síntese de purinas, timidina e aminoácidos como metionina e glicina. Como as células humanas obtêm folato diretamente da dieta, esse mecanismo é selectivo para microrganismos dependentes da síntese endógena de folato (Tortora *et al.*, 2017).

A trimetoprima, por sua vez, actua em uma etapa subsequente da via metabólica: inibe a enzima dihidrofolato redutase (DHFR), bloqueando a conversão de DHF em tetraidrofolato (THF). Esta dupla inibição sequencial explica a sinergia clínica observada quando a trimetoprima é combinada ao sulfametoxazol (uma sulfonamida), resultando em um bloqueio eficaz da síntese de DNA e proteínas bacterianas. Esta combinação é amplamente utilizada no tratamento de infecções do trato urinário e outras infecções por patógenos sensíveis (Murray *et al.*, 2005).

As enterobactérias, como *E. coli*, desenvolvem resistência a sulfonamidas e trimetoprima principalmente por meio de mutações nos alvos enzimáticos (*DHPS* e *DHFR*), que reduzem a afinidade pelos fármacos. Além disso, a aquisição de genes de resistência plasmidiais (e.g., *sul1*, *sul2* para sulfonamidas; *dfrA*, *dfrB* para trimetoprima), permite a produção de enzimas alternativas insensíveis à inibição. Outros mecanismos incluem a superexpressão de bombas de efluxo e a redução da permeabilidade da membrana, limitando a concentração intracelular dos agentes (Procop *et al.*, 2018).

7.7.6. Macrolídeos

Os macrolídeos, como a eritromicina e azitromicina, são uma classe de antibióticos bacteriostáticos de amplo espectro, com actividade predominante contra bactérias Gram-positivas e alguns patógenos Gram-negativos. Seu mecanismo de acção baseia-se na ligação reversível ao domínio V do rRNA 23S da subunidade ribossomal 50S, bloqueando a translocação do peptidil-tRNA durante a elongação da cadeia polipeptídica. Essa interacção obstrui o túnel de saída do peptídeo, interrompendo a síntese protéica e, conseqüentemente, o crescimento bacteriano (Murray *et al.*, 2005).

7.7.7. Fenicóis

Os fenicóis, como é o caso da cloranfenicol e florfenicol, são uma classe de antibióticos bacteriostáticos que actua na inibição da síntese protéica bacteriana. Seu mecanismo de acção envolve a ligação reversível ao centro de peptidiltransferase da subunidade ribossomal 50S, impedindo a formação de ligações peptídicas entre aminoácidos durante o alongamento da cadeia polipeptídica. Esta interacção bloqueia a elongação do peptídeo, comprometendo processos celulares essenciais, como replicação e reparo de DNA (Murray *et al.*, 2005). Em

enterobactérias, a resistência aos fenicóis está associada principalmente a produção de enzimas inactivadoras (acetiltransferases), bombas de efluxo activo e mutação do alvo ribossomal (Murray *et al.*, 2005).

8. Enquadramento Conceptual ou Teórico

8.1. *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria bacilar, Gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, comensal do trato gastrointestinal de humanos e animais endotérmicos (Clements *et al.*, 2012). Embora 80% das estirpes sejam componentes inofensivos da microbiota intestinal, actuando como antagonistas contra patógenos por exclusão competitiva, certos serotipos (e.g., *STEC*, *ETEC*) possuem fatores de virulência que os tornam agentes de doenças entéricas e extraintestinais (Kaper *et al.*, 2004).

A relevância clínica de *E. coli* reside na plasticidade genómica que permite a aquisição horizontal de genes de virulência e resistência antimicrobiana (RAM), especialmente em contextos de pressão seletiva por uso inadequado de antibióticos (Mathers *et al.*, 2015). A transmissão fecal-oral é a principal via de disseminação de cepas patogênicas, destacando a interconexão entre saúde humana, animal e ambiental (WHO, 2017).

O uso de antibióticos na medicina humana e veterinária pode originar variantes de *E. coli* resistentes a estes medicamentos. Estas bactérias, por sua vez, disseminam-se pelo ambiente, estando presentes em alimentos, fezes e efluentes, e podem ser transmitidas entre humanos, animais de produção e o ecossistema através de diversas vias, como a água, os alimentos e os resíduos (Xu *et al.*, 2022).

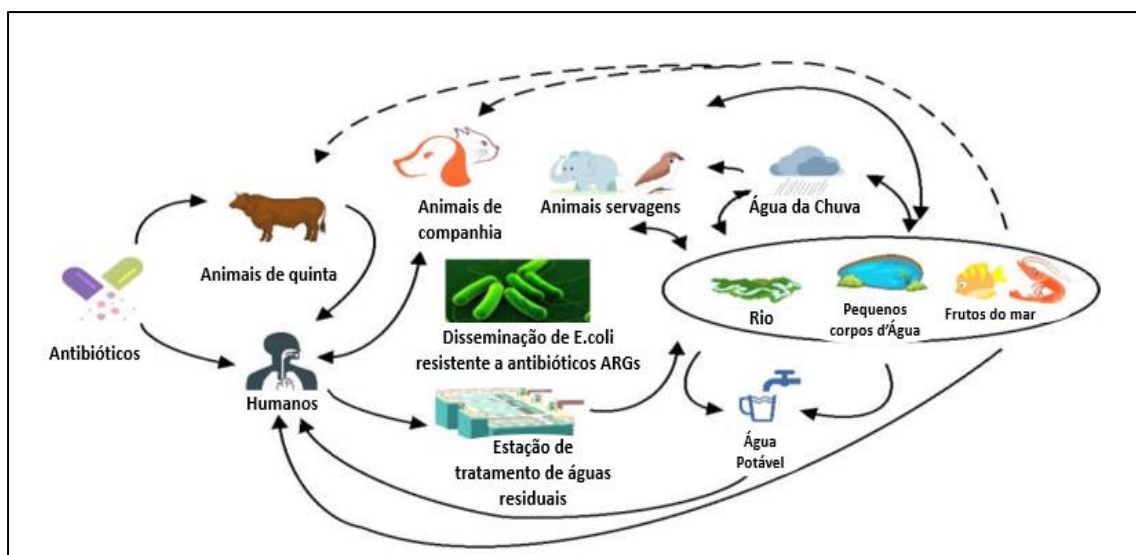


Figura 2: Múltiplas vias envolvidas na transferência de *E. coli* com resistência antimicrobiana e de genes de resistência antimicrobiana para animais, humanos e ambiente.

Fonte: Adaptado (Xu *et al.*, 2022).

A abordagem *One Health* é fundamental para interromper ciclos de transmissão, integrando vigilância epidemiológica em humanos, animais e ecossistemas. Estudos recentes demonstram que mesmo estirpes comensais podem actuar como vectores de RAM entre nichos ecológicos, destacando sua relevância em saúde pública (Bengtsson-Palme *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2022).

8.2. Microrganismos Comensais

Os microrganismos comensais são definidos como espécies que colonizam o hospedeiro sem causar dano aparente, estabelecendo relações de mutualismo ou comensalismo. Em contraste com patógenos obrigatórios (e.g., *Salmonella* spp.), bactérias como *E. coli* comensal exibem versatilidade ecológica: coexistem no microbioma intestinal, mas podem evoluir para variantes patogênicas através da aquisição de elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons) carregando genes de virulência ou RAM (Mathers *et al.*, 2015; Partridge *et al.*, 2018). Esta dualidade ressalta o seu papel como reservatórios silenciosos de resistência, capazes de transferir genes para patógenos, via conjugação bacteriana (Madigan *et al.*, 2022).

A caracterização fenotípica de estirpes comensais é, portanto, essencial para monitorar o surgimento e disseminação da RAM. A título de exemplo, um estudo pioneiro em Moçambique

demonstrou que 20% dos portadores assintomáticos abrigavam estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) (Chirindze *et al.*, 2018).

8.3. Patogenicidade

A patogenicidade refere-se à capacidade de um microrganismo causar doença, dependente da expressão coordenada de factores de virulência (e.g., adesinas, toxinas) que favorecem a colonização, evasão imunológica e dano tecidual (Murray *et al.*, 2005). Em *E. coli*, a transição de comensal para patogênica está associada à aquisição de ilhas de patogenicidade, como o locus *eae* em estirpes enterohemorrágicas (*EHEC*) (Kaper *et al.*, 2004). Paralelamente, a coexistência de genes de virulência e RAM em plasmídeos conjugativos cria fenótipos multidroga-resistentes, desafios terapêuticos em infecções hospitalares (Mathers *et al.*, 2015).

8.4. Antimicrobianos

Antimicrobianos são agentes naturais, semissintéticos ou sintéticos capazes de inibir o crescimento bacteriano (bacteriostáticos) ou causar morte celular (bactericidas). O uso indiscriminado desses fármacos, especialmente em Países de baixa renda, exerce pressão selectiva que favorece a disseminação de RAM via selecção de variante resistente (Levy & Marshall, 2004).

Em *E. coli*, a resistência a β -lactâmicos (e.g., penicilinas, cefalosporinas) está frequentemente associada à produção de ESBLs, enzimas codificadas por genes plasmídicos (e.g., *blaCTX-M*, *blaTEM*) que hidrolisam esses antibióticos (Bush & Jacoby, 2010). A caracterização fenotípica de perfís de resistência em cepas comensais é crucial para orientar políticas de controlo da disseminação da RAM

9. Metodologia

9.1. Tipo de Estudo

Tratou-se de um estudo descritivo e analítico e que consistiu na recolha de dados de forma prospectiva.

9.2. Local de Estudo

O estudo decorreu na cidade e província de Maputo. A província de Maputo engloba na sua área, a Província de Maputo e cidade de Maputo, tendo como fronteiras à Norte, limitado por Província de Gaza, no extremo Sul, a África do Sul, a Oeste por África do Sul e Eswatini e no extremo Este pelo Oceano Índico; com coordenadas geográficas de Latitude: Norte: 24°15'00"S; Sul: 26°51'45"S e Longitude: Oeste: 32°02'25"E; Este: 32°58'46"E. Ambas Províncias possuem uma área total de 26 404 Km² e com uma população total estimada em 3 341 448 habitantes em 2020, segundo os dados estatísticos do Instituto Nacional de Estatística.

Todos os participantes do estudo, buscavam serviços no Centro de Exames Médicos de Maputo (CEM), que é uma instituição designada para realizar exames médicos ocupacionais, emitir certificados de saúde (como para carteiras de motorista e viagens internacionais) e administrar vacinas obrigatórias, em conformidade com o Regulamento Sanitário Internacional (RSI). Uma parte dos exames solicitados no CEM (detecção de *Salmonella spp.*, de *Shigella spp.*, *Vibrio spp.* e Bacilos de Kock.), são realizados na Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Eduardo Mondlane (UEM), Laboratório de Microbiologia/Departamento Académico de Microbiologia, sita na Av. Salvador Allende, no recinto do hospital central de Maputo, cidade de Maputo, sendo este o local onde foi feito o recrutamento dos participantes do estudo e a posterior selecção, administração do consentimento informado, recolha de dados de interesse e a recepção de amostras dos participantes do estudo.

9.3. Período de Estudo

O estudo, recolha de dados, foi realizado num período de 8 meses que compreendeu dentre Novembro a Dezembro de 2023 e Janeiro a Junho de 2024.

9.4. População do Estudo

A população de estudo foi constituída por indivíduos saudáveis provenientes do CEM que procuravam serviços nesta instituição de utilidade pública durante o período de estudo.

9.5. Amostragem

A amostragem foi probabilística por conveniência, tendo seguido os critérios de inclusão e exclusão. De modo a garantir representatividade amostral, o universo amostral previamente planificado era de pelo menos quatrocentos (400) participantes.

Para o cálculo do tamanho amostral, teve-se por base o erro padrão de 5% (margem de erro) e admitindo a população total estimada em 2020 de 3 341 448 habitantes, de acordo com o Instituto Nacional de Estatística, tendo-se padronizado para as seguintes fórmulas:

1.
$$n_o = \frac{1}{\varepsilon^2}$$
 Onde: n_o = tamanho amostral inicial; ε = margem de erro.
Substituindo: $n_o = 1 / (0.05)^2 = 400$

2.
$$n = \frac{n_o * N}{n_o + N}$$
 Onde: n_o = tamanho amostral inicial; N = população total da província e cidade de Maputo.

Substituindo: $n = \frac{400 * 3341448}{400 + 3341448} = 400$.

9.5.1. Critérios de Inclusão e Exclusão

Os critérios de inclusão dos participantes do estudo foram os seguintes:

- Indivíduos saudáveis (sem infecção gastrointestinal activa) residentes na cidade e Província de Maputo;
- Indivíduos com a requisição passada pelo Centro de Exames Médicos de Maputo (CEM);
- Foi considerada apenas uma única amostra por participante;
- Indivíduos com idade igual ou superior a dezoito anos

Os critérios de exclusão dos participantes do estudo foram os seguintes:

- Indivíduos que se encontravam a medicarem, com antibióticos, num período superior a 14 dias;
- Indivíduos que se apresentavam ao CEM com sintomas de doença gastrointestinal.

9.6. Recolha de Dados

Os participantes que atenderam aos critérios de inclusão foram recrutados a participar do estudo após uma clara e breve explicação dos objectivos e relevância do estudo. Os participantes que aceitaram participar do estudo foram-lhes administrados o consentimento informado, e após a assinatura do mesmo lhes foi administrado um questionário para recolha de dados sociodemográficos e outros dados de interesse, conforme consta dos anexos.

9.7. Procedimentos Laboratoriais

9.7.1. Colheita de Amostras

A colheita de amostras de fezes nos participantes consistiu na entrega de frascos de colecta de amostras e zaragatoas a cada participante e em seguida os participantes foram orientados a executar o procedimento nas suas respectivas casas, sendo que foram instruídos a defecar em um papel limpo e de seguida efectuar o depósito da amostra no respetivo frasco com a ajuda da zaragatoa, com amostra do tamanho da cabeça do palito de fósforo (1g), e aconselhou-se a levar ao Laboratório no mesmo dia da colheita.

9.7.2. Cultura e Identificação de *Escherichia coli*

Após a recepção das amostras de fezes, estas foram cultivadas em ágar MacConkey (MCA) com cristal violeta (meio pelo qual distingue os fermentadores e não fermentadores de lactose) e incubadas na estufa a 37°C durante 18 a 24h (Procop *et al.*, 2018). Após esse período a cultura foi examinada, sendo que nos casos em que houve crescimento de mistura bacteriana foi necessária uma subcultura de isolados sugestivos para *E. coli* novamente em meio MCA com o intuito de purificar a cultura.

Nos casos em que não se verificou o crescimento bacteriano de colónias sugestivas, para *E. coli*, a cultura foi considerada negativa. Por outro lado, nos casos em que houve crescimento de colónias sugestivas para *E. coli* a cultura foi considerada positiva.

A identificação das colónias bacterianas suscetivas de *E. coli* foi feita por meio de subcultura desses isolados, já purificados, em meio cromogénico (CPSE) e em meio agar citrato de Simmons, seguidos de incubação a 37°C por 18 a 24h, sendo que isolados citrato negativos e CPSE positivos foram identificadas como sendo *Escherichia coli* comensal (Procop *et al.*, 2018). Isolados purificados identificados como *E. coli* foram preservados em meio *Skim milk* a -80° C para procedimentos adicionais (Rappelli *et al.*, 2005)

9.7.2. Confirmação de *Escherichia coli*

Os isolados de *E. coli* foram confirmados usando técnicas moleculares antes do TSA, que consistiram em extracção de ADN pelo método de fervura (*boiling*) e posterior reacção em cadeia da polimerase (PCR) para o gene *uidA* (623 pb), marcador molecular cuja enzima (β -glucuronidase) está associada ao metabolismo de açúcares complexos em *E. coli* (Pavlovic *et al.*, 2010). Os iniciadores oligonucleotídeos usados neste estudo foram *uidA Forward* 5'-CCAAAAGCCAGACAGAGT -3' e *uidA Reverse* 3'- GCACAGCACATCAAAGAG -5' (Rappelli *et al.*, 2005).

A extracção de ADN e as condições da PCR foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Rappelli *et al.* (2005) e apresentado nos anexos (Anexo V). A mistura de PCR para amplificação do gene *uidA* consistiu de um volume final de 25 μ L, em que 12,5 μ L correspondeu ao tampão supermix [1x] (tampão de reacção contendo 0,05 Taq polimerase de ADN, 4 mM de MgCl₂; 0,4 mM da mistura de dNTPs) que foi misturado com 12,5 μ L água bidestilada, iniciadores e ADN da seguinte maneira: 9,5 μ L de água bidestilada (ddH₂O); 0,5 μ L de cada iniciador (*uidA F* e *uidA R*) e 2 μ L do ADN molde. No criotubo de controlo negativo foram adicionados 2 ml de dd H₂O (água desionizada estéril/água livre de nucleases) e no de controlo positivo foi adicionado 2 μ L do ADN conhecido, previamente positivo para *uidA*. Seguidamente, os criotubos foram inseridos no termociclador e, finalmente configurou-se às condições de PCR.

Tabela 1: Composição da mistura de PCR para amplificação do gene *uidA* (623bp)

Reagentes	Concentração final	Volume final (μ L)
Tampão Supermix [2X]	1X	12,5
Primer F(<i>uidA</i>)[10 μ M]	0,2 μ M	0,5
Primer F(<i>uidA</i>)[10 μ M]	0,2 μ M	0,5
ddH ₂ O	-	9,5
DNA molde	-	2
Total	-	25

Tabela 2: Condições de amplificação do gene *uidA* (623bp)

Etapa	Objectivo	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Nº de ciclos
1	Desnaturação inicial	94	300	1
2	Desnaturação	94	60	
3	Anelamento	58	60	35
4	Extensão	72	60	
5	Extensão final	72	300	1

Terminada a PCR, os *amplicons* (num volume de 7 µL) foram misturados com 2 µL de tampão de carregamento (*Loading Dye*), em seguida foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%; submerso em tampão TAE em concentração final 1X e 5 µL de Gel Red (2M). As condições de migração electroforética foram a 100V, 400 mA por 1h. Utilizou-se, um marcador de peso molecular de 100 pb como padrão de peso molecular. Os *amplicons* detectados (bandas de 623 pb) foram visualizados e analisados em transiluminador de luz ultravioleta (UV), com auxílio de óculos de protecção e fotografados com recurso à câmara profissional.

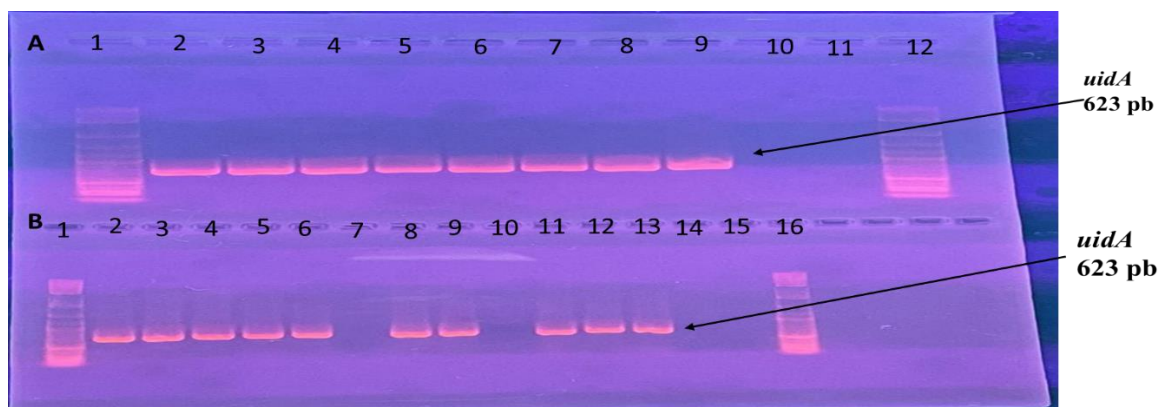


Figura 3: Visualização de bandas do gene *uidA* (623pb), confirmativas para *E. coli*, em gel de agarose após eletroforese.

Legenda: **Fig 3A.** Electroforese em gel de agarose (1%; TAE 1X). 1- Marcador de peso molecular 100 pb; 2-Amostra 3 (+); 3-Amostra 5 (+); 4-Amostra 10 (+); 5-Amostra 27 (+); 6-Amostra 41 (+); 7-Amostra 67 (+); 8-Amostra 70 (+); 9- **Controlo Positivo** (+); 10- Sem Amostra; 11-**Controlo negativo ddH₂O** (-); 12- Marcador de peso molecular 100 pb. **Fig 3B.** Electroforese em gel de agarose (1%; TAE 1X). 1- Marcador de peso molecular 100 pb; 2- Amostra 4 (+); 3-Amostra 6 (+); 4- Amostra 12 (+); 5-Amostra 19 (+); 6- Amostra 27 (+); 7- Sem Amostra; 8- Amostra 31 (+); 9- Amostra 53 (+); 10-

Sem Amostra; 11- Amostra 88 (+); 12- Amostra 93 (+); 13- **Controlo Positivo (+)**; 14- Sem Amostra; 15- **Controlo Negativo ddH₂O (-)**; 16- Marcador de peso molecular 100 pb.

Fonte: o autor.

9.7.3. Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana

Os isolados de *E. coli* foram testados para a susceptibilidade antimicrobiana. O teste de susceptibilidade antimicrobiana (TSA) foi realizado para treze (13) antibióticos incluindo ampicilina (10µg), amoxicilina/clavulanato (20/10 µg), piperacilina/tazobactam (100/10 µg), ceftriaxona (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), imipeném (30 µg), meropeném (30 µg), amicacina (30µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), sulfametoxazole/trimetoprima (23.75/1.25 µg) e tetraciclina (30 µg), usando o método disco-difusão de Kirby-Bauer. Para o efeito, usou-se o método de suspensão directa de colónias morfológicamente similares em soro fisiológico de modo que se obteve uma suspensão com densidade equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala de *McFarland*. Em seguida, uma zaragatoa estéril foi saturada na suspensão e depois inoculada uniformemente por toda a superfície do meio Ágar Müeller-Hinton (MHA). Os discos de antibióticos seguidamente foram firmemente aplicados sob à superfície do meio. Em seguida, as placas foram incubadas a 37° C por 24h (Madigan *et al.*, 2022; Tortora *et al.*, 2017).

Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados e interpretados de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* edição de 2024 (CLSI, 2024).

A OMS classifica os antibióticos em três grandes categorias no modelo AWaRe:

- **Access (Acesso)** - Primeira linha: antibióticos com menor risco de selecção de resistência, indicados para a maioria das infecções comuns (ampicilina, amoxicilina/clavulanato, sulfametoxazole/trimetoprima, tetraciclina, amicacina e gentamicina).
- **Watch (Vigilância)** - Maior potencial de selecção de resistência. Uso mais restrito (piperaciclina-tazobactam, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima, meropenem, imepenem, ciprofloxacina).
- **Reserve (Reserva)** - Última linha: para infecções multirresistentes. Uso limitado e criterioso.

O fenótipo de multidroga-resistência (MDR) foi definido como resistência adquirida a pelo menos um agente em três ou mais classes antimicrobianas (Magiorakos *et al.*, 2012).

9.8. Variáveis, Gestão e Análise de Dados

9.8.1. Variáveis do estudo

Constituíram variáveis de interesse do presente estudo: os dados sociodemográficos, os hábitos e comportamentos e as condições sanitárias dos participantes de estudo (Tabela 3).

Tabela 3: Variáveis de estudo

Variáveis	Categorização	
Dados Sociodemográficos	Sexo	Masculino/Feminino
	Idade	Faixas etárias: (≤ 20anos/ 21-30 anos/31-40anos/41-50 anos/>50anos)
	Proveniência	Maputo cidade/ Província
	Nível de escolaridade	Nenhum/primário/secundário/superior
Histórico de medicação	Consumo de antibióticos nos últimos 14 dias	Sim/Não
Hábitos e comportamentos	Consumo de alimentos de rua	Sim/Não
	Contacto com animais de estimação	Sim/Não
Condições Sanitárias	Tipo de casa de banho/latrina	Convencional/moderno
Perfil de susceptibilidade antimicrobiana	Sensível/intermediário/resistente	
Perfil de Multidroga-Resistência (MDR)	Presente/ausente	

9.8.2. Plano de Gestão e Análise de dados

A análise dos dados, incluindo a criação e categorização de variáveis, bem como a limpeza de dados, foi feita através do *Microsoft Office Excel* 2013. Seguidamente, os dados foram exportados ao pacote estatístico *Statistical Package for Social Sciences* (IBM SPSS®, Inc. Chicago, Illinois. Versão 21) para verificação de frequências de colonização e isolamento de *E. coli* em função das variáveis sociodemográficas. A verificação das frequências foi extensiva ao perfil de susceptibilidade antimicrobiana e ao perfil MDR de *E. coli*. O teste χ^2 (Qui-quadrado) de *Pearson* / Exato de Fischer, conforme apropriado, foram usados para verificar a associação entre a multidroga-resistência (MDR) de *E. coli* e as variáveis de interesse. As inferências foram feitas ao IC (intervalo de confiança) de 95% e um valor de P menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$) foi considerado estatisticamente significativo

Todos os dados, foram lançados num computador, com senha de entrada para protecção dos dados, do Departamento de Microbiologia da FM-UEM. As bases de dados secundárias são controladas pelo investigador exclusivamente e tem acesso a base de dados primária os supervisores do estudo. A base de dados primária e formulários de recolha de dados serão mantidos e arquivados no Departamento de Microbiologia da FM-UEM por um período máximo de 5 anos.

9.9 Aspectos éticos

Este estudo, foi conduzido com consentimento informado e foi aprovado pelo Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) a 01 de Julho de 2025 (Ref: 345/CNBS/25).

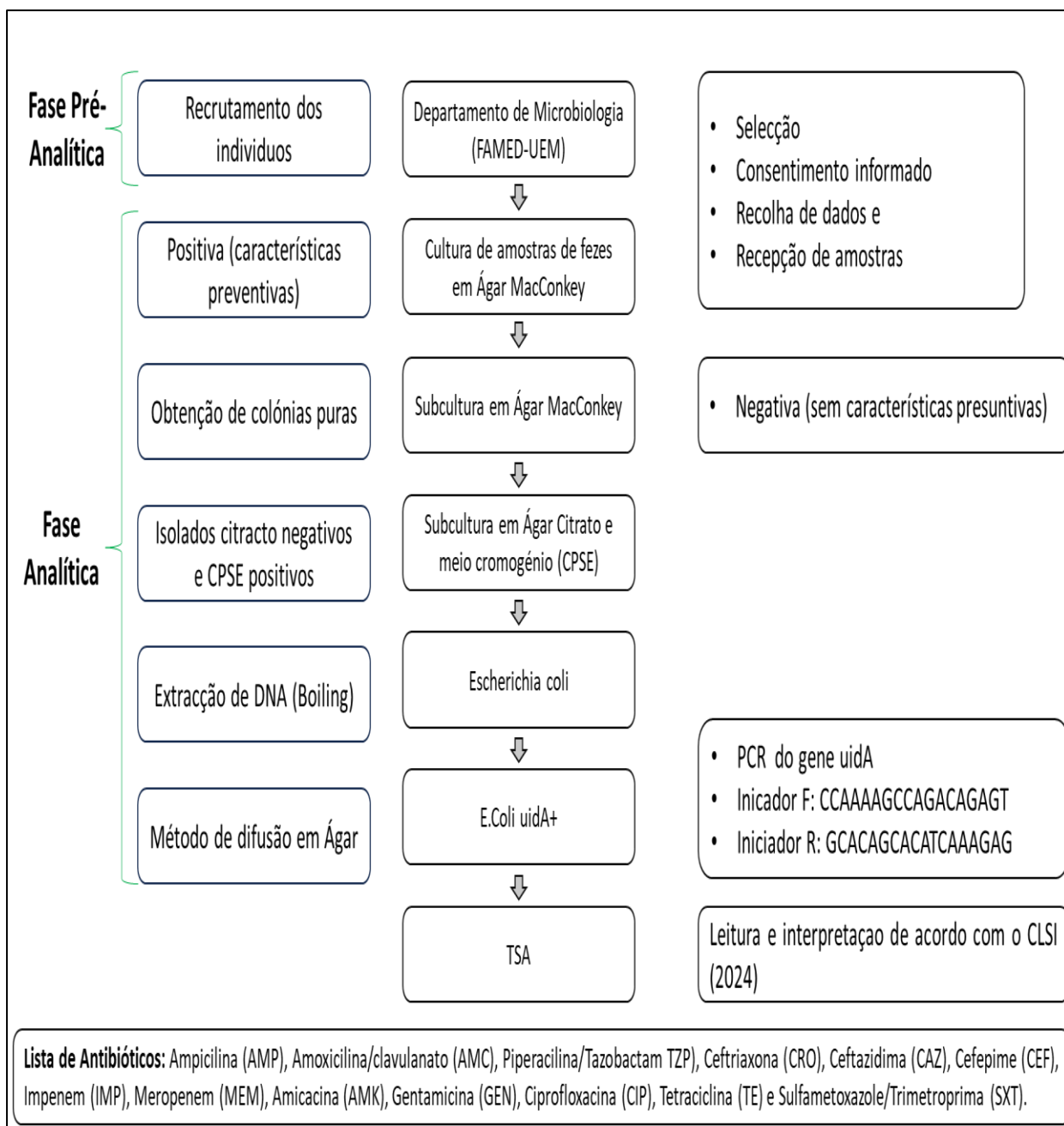


Figura 4: Representação esquemática resumida dos procedimentos aplicados no estudo.

O estudo esteve dividido em duas fases: a primeira fase, pré-analítica, que consistiu no recrutamento e selecção dos participantes do estudo e a segunda, analítica, que consistiu no processamento das amostras: cultura, identificação, confirmação e teste de susceptibilidade antimicrobiana das estirpes de *E. coli* comensal.

Fonte: O autor.

10. Resultados e Discussão

10.1. Resultados

10.1.1. Distribuição de *Escherichia coli*

De um total de 158 participantes seleccionados para o estudo, a taxa de colonização e isolamento de *E. coli* foi de 100% (158/158).

A distribuição de estirpes de *E. coli* obtidas de amostras de fezes de indivíduos saudáveis em Maputo revelou uma predominância de participantes do sexo masculino (61,4%; 97/158), da faixa etária dos 31-40 anos (31,6%; 50/158), residentes em Maputo Cidade (23,9%; 101/158).

Em relação aos hábitos e comportamentos, a maior proporção de participantes referiu não consumir alimentos vendidos na rua (60,8%; 96/158), não ter tido contacto com animais de estimação (60,8%; 96/158) ver a tabela 4.

Variáveis tais como: nível de escolaridade (55,1%; 87/158), consumo de antibióticos nos últimos 14 dias 51,9%; (82/158), tipo de casa de banho/latrina 55,1%; (87/158) foram classificadas como "Sem Informação" por conter informações incompletas ou inexistentes.

Tabela 4: Distribuição de *Escherichia coli* em função das características sociodemográficas, hábitos e comportamentos, histórico de uso prévio de antibióticos e condições sanitárias dos participantes do estudo.

Distribuição de isolados de <i>Escherichia coli</i> em função do sexo		
Categorização	n de participantes	Frequência (%)
Masculino	97	61,4
Feminino	61	38,6
Total	158	100
Distribuição de isolados de <i>Escherichia coli</i> em função da faixa etária		
Categorização	n de participantes	Frequência (%)
21-30 Anos de idade	39	24,7
31-40 Anos de idade	50	31,6
41-50 Anos de idade	47	29,7
>50 Anos de idade	22	13,9
Total	158	100
Distribuição de isolados de <i>E. coli</i> em função da proveniência		
Categorização	n de participantes	Frequência (%)
Maputo Cidade	101	63,9
Maputo Província	57	36,1
Total	158	100
Distribuição de isolados de <i>E. coli</i> em função do nível de escolaridade		
Categorização	n de participantes	Frequência (%)
Nenhum	3	1,9
Primário	7	4,4
Secundário	42	26,6
Superior	19	12,0
Sem informação	87	55,1
Total	158	100
Distribuição de isolados de <i>E. coli</i> em função do consumo de alimentos de rua		
Categorização	n de participantes	Frequência (%)
Sim	62	39,2
Não	96	60,8
Total	158	100
Distribuição de isolados de <i>E. coli</i> em função do contacto com animais de estimação		
Categorização	n de participantes	Frequência (%)
Sim	62	39,2
Não	96	60,8
Total	158	100
Distribuição de isolados de <i>E. coli</i> em função do consumo de antibióticos nos últimos 14 dias		
Categorização	n de participantes	Frequência (%)
Sim	14	8,9
Não	62	39,2
Sem informação	82	51,9
Total	158	100
Distribuição de isolados de <i>E. coli</i> em função do tipo de casa de banho/latrina		
Categorização	n de participantes	Frequência (%)
Convencional	23	14,6
Moderna	48	30,4
Sem informação	87	55,1
Total	158	100

10.1.2. Perfil de Susceptibilidade Antimicrobiana de *Escherichia coli*

O teste de susceptibilidade antimicrobiana (TSA) em isolados de *E. coli*, revelou elevadas taxas de resistência a ampicilina (42,4%), sulfametoxazol/trimetoprima (40,5%), amoxicilina-clavulanato (32,9%), tetraciclina (27,2%). Por outro lado, altas taxas de sensibilidade de estirpes de *E. coli* comensal foram constatadas para imipenem (99,4%), cefepima (98,7%), piperacilina/tazobactam e meropenem (98,1%), ceftriaxona (94,3%), ceftazidima (80,4%), amicacina e gentamicina (74,7%), ver figura 4.

No presente estudo, sobre a caracterização fenotípica de estirpes de *E. coli* isoladas de amostras de fezes de indivíduos saudáveis, constatou-se, também alto percentual de isolados de *E. coli* comensal com perfil de susceptibilidade intermediária à ciprofloxacina (54,7%). Adicionalmente, determinou-se o perfil de MDR das estirpes de *E. coli* isoladas de amostras de fezes de indivíduos saudáveis (45/158, 28,5 %).

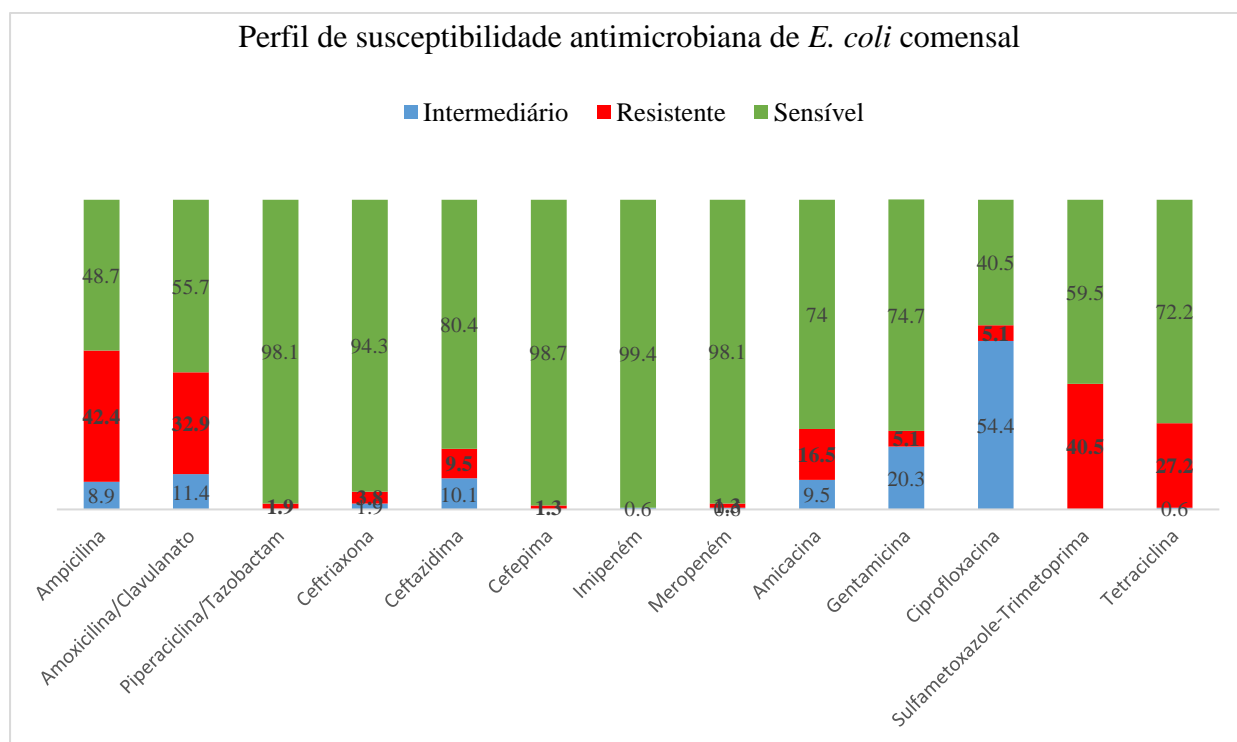


Figura 5: Frequência de susceptibilidade antimicrobiana de *E. coli* comensal de isolados de amostras de fezes de indivíduos saudáveis em Maputo.

10.1.3. Factores Associados a Multidroga-Resistência em *E. coli*

No presente estudo, também foi feito o teste Qui-quadrado (χ^2) para estabelecer possíveis associações entre a presença de perfil MDR nas estirpes de *E. coli* e as características de interesse nos participantes do estudo.

Constatamos maior prevalência de MDR estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação a variável faixa etária, sendo que a maior proporção foi observada nos indivíduos dos 41-50 anos de idade (44,7%) comparado com as demais categorias ($\chi^2 = 11,478$; $p = 0,009$); e na variável contacto com animais de estimação em que uma proporção significativa foi observada nos indivíduos que tiveram contacto (46,8%) comparado com os que não tiveram contacto ($\chi^2 = 16,764$; $p < 0,001$), ver tabela 5.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a prevalência do perfil MDR em relação as variáveis sociodemográficas tais como como sexo, proveniência, nível de escolaridade. Similarmente, em relação as variáveis sobre o histórico de consumo prévio de antibióticos, comportamento de consumir alimentos de rua e sobre as condições sanitárias dos participantes do estudo, ver tabela 5.

Em algumas variáveis, como é o caso do nível de escolaridade, consumo de antibióticos e tipo de casa de banho/latrina, uma fracção dos dados foi classificada como “Sem Informação” o que pode ter limitado a nossa interpretação de dados.

Tabela 5: Associação entre o perfil multidroga-resistência de *E. coli* com as características de interesse dos participantes do estudo.

Legenda: n-número total dos participantes do estudo cujas amostras foram positivas para *E. coli*; MDR-multidroga-resistência; %-percentagem; χ^2 - valor de teste Qui-quadrado de Pearson/ teste Exato de Fischer (conforme apropriado); *P value*- valor de P.

Variáveis Sociodemográficas		Perfil Multidroga-Resistência			χ^2	<i>P value</i>
		MDR n (%)	Não MDR n (%)	Total n (%)		
Sexo (n=158)	Masculino	25 (32,8)	72 (74,2)	97 (100)	0,904	0,342
	Feminino	20 (25,8)	41 (67,2)	61 (100)		
Faixa etária (n=158)	21-30	10 (25,6)	29 (74,4)	39 (100)	11,478	0,009
	31-40	7 (14)	43 (86)	50 (100)		
	41-50	21 (44,7)	26 (55,3)	47 (100)		
	> 50	7 (31,8)	15 (68,2)	22 (100)		
Proveniência (n=158)	Maputo Cidade	26 (25,7)	75 (74,3)	101 (100)	1,031	0,310
	Maputo Província	19 (33,3)	38 (66,7)	57 (100)		
Nível de Escolaridade (n=158)	Nenhum	1 (33,3)	2 (66,7)	3 (100)	3,621	0,451
	Primário	0 (0,0)	7 (100)	7 (100)		
	Secundário	12 (28,6)	30 (71,4)	42 (100)		
	Superior	7 (36,8)	12 (63,2)	19 (100)		
	Sem informação	25 (28,7)	62 (71,3)	87 (100)		
Consumo de alimentos de rua (n=158)	Sim	17 (27,4)	45 (72,6)	62 (100)	0,056	0,812
	Não	28 (29,2)	68 (70,8)	96 (100)		
Consumo de antibióticos nos últimos 14 dias (n=158)	Sim	7 (50,0)	7 (50,0)	14 (100)	3,596	0,175
	Não	15 (24,2)	47 (75,8)	62 (100)		
	Sem informação	23 (28,0)	59 (72,0)	82 (100)		
Contacto com animais de estimação (n=158)	Sim	29 (46,8)	33 (53,2)	62 (100)	16,764	<0,001
	Não	16 (16,7)	80 (83,3)	96 (100)		
Tipo de casa de banho/latrina (n=158)	Convencional	6 (26,1)	17 (73,9)	23 (100)	0,079	0,961
	Moderna	14 (29,2)	34 (70,8)	48 (100)		
	Sem informação	25 (28,7)	62 (71,3)	87 (100)		

10.2. Discussão

10.2.1. Distribuição de *Escherichia coli*

Uma elevada taxa de colonização e isolamento de *E. coli* foi observada no presente estudo (100%), sendo que os nossos achados se mostraram superiores à de outro estudo anterior conduzido em Moçambique, em *E. coli* isolada da comunidade, por Chirindze e colaboradores (2018), que reportou 20%. Esta diferença pode ser atribuída ao facto destes últimos autores terem focado exclusivamente no estudo de estirpes previamente resistentes a cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona) com objectivo de caracterizar mecanismos fenotípicos e moleculares associados. Contudo, nossos dados corroboram com vários autores, tais como Clements e colaboradores (2012) e Blount (2015), que enfatizam que *E. coli* coloniza o trato intestinal de humanos e animais de sangue quente como um comensal benéfico, contribuindo para a síntese de vitamina K e competição contra patógenos.

A taxa de colonização e isolamento de *E. coli* em indivíduos saudáveis (sem infecção activa) de Maputo revela padrões sociodemográficos e comportamentais críticos para a compreensão da epidemiologia bacteriana na região. A predominância de isolados de *E. coli* em participantes do sexo masculino em relação aos do sexo feminino, pode ser explicada provavelmente pela não representatividade da população de estudo, e, conseqüentemente um viés de recrutamento e selecção dos participantes do estudo, o que não nos permite a generalização dos resultados para a população total de Maputo, especialmente em contextos onde factores culturais ou geográficos influenciam práticas de saúde, fenómeno bem elucidado por George e colaboradores (2014).

A faixa etária mais representativa (31-40 anos), reflecte possivelmente a população economicamente activa enquanto a sub-representação de indivíduos >50 anos limita inferências sobre riscos específicos a essa faixa etária, com maior vulnerabilidade a infecções ou padrões diferenciados de uso de antibióticos, um padrão já documentado em estudos microbiológicos urbanos por Van Spall e colaboradores (2007). Por outro lado, não houve neste estudo, participantes com idade igual ou inferior a 20 anos (18-20 anos) o que impossibilitou qualquer análise para este grupo etário restrito.

A maior concentração de participantes em Maputo Cidade *versus* Maputo Província evidencia um viés urbano de recrutamento, comum em pesquisas de saúde pública de acordo com Bonevski e colaboradores (2014). Nessa ordem de ideia, levando em conta o local de

recrutamento e selecção dos participantes do estudo, essa diferença deveu-se, provalvemente ao facto de existir outro Centro de Exames Médicos na Matola (Maputo Província).

Dados educacionais apresentaram lacunas significativas, dificultando análises sobre a relação entre escolaridade e colonização microbiana. Contudo, o nível secundário destacou-se entre os registados. Por outro lado, a baixa frequência de participantes sem escolaridade pode indicar exclusão de grupos vulneráveis, um desafio metodológico recorrente bem elucidado por Braveman & Gottlieb (2014).

Em suma, os nossos achados destacam a necessidade de uma amostragem estratificada para equilibrar sexo e representatividade rural-urbana, seguindo diretrizes de estudos epidemiológicos. Além disso, é crucial a implementação de protocolos rigorosos para reduzir dados ausentes, especialmente em variáveis críticas como uso prévio de antibióticos, utilizando métodos validados, tal como referenciado por Van Spall e colaboradores (2007).

10.2.2. Perfil de Susceptibilidade Antimicrobiana de *Escherichia coli*

E. coli, membro integrante da microbiota normal intestinal humana, tem sido amplamente utilizada como bioindicador para monitorar a disseminação de RAM em comunidades, refletindo pressões selectivas ambientais e clínicas (van Schaik, 2015). Em Moçambique, País com desafios socioeconómicos e sanitários, a RAM representa uma ameaça crescente à saúde pública (Mandomando *et al.*, 2010). Este estudo, realizado em indivíduos saudáveis em Maputo, identificou altas taxas de resistência de *E. coli* a antibióticos de primeira linha como ampicilina, amoxicilina/clavulanato, e sulfametoxazol/trimetoprima e uma prevalência consideravelmente alta de perfil multidroga-resistência (MDR).

A resistência à ampicilina relatada nesse estudo é inferior à média de 72% reportada em uma meta-análise de 12 países africanos por Nji e colaboradores (2021), mas aproxima-se a de estudos conduzidos na República Democrática do Congo (57%) por Mfoutou Mapanguy e colaboradores (2021). Esta variação, pode reflectir diferenças no acesso a antibióticos, em Moçambique a automedicação é comum devido à venda não regulamentada, enquanto em países com sistemas de saúde mais estruturados, como África do Sul, a resistência à ampicilina é menor (cerca de 25%) como referenciado por Essack e colaboradores (2017).

A frequência de resistência de isolados de *E. coli* no presente estudo, para sulfametoxazol/trimetoprima (40,5%), aproxima-se aos achados de Nji e colaboradores (2021), em uma meta-análise realizada em vários países de média e baixa renda, em *E. coli* comensal, entre 1989 e 2019, com idades variando de 0 a 77 anos, em que reportaram uma taxa de resistência de 63% para este antibiótico.

O uso indiscriminado de sulfametoxazol/trimetoprima para infecções urinárias e gastrointestinais incluindo a profilaxia em paciente vivendo com HIV, em Moçambique, está associado a altas taxas de resistência bacteriana, reflectindo a pressão selectiva causada pelo uso excessivo de antibióticos de amplo espectro, facto referenciado por van der Meeren e colaboradores (2013).

Em Moçambique, a alta prevalência de RAM em *E. coli* isolada de indivíduos saudáveis para antibióticos de primeira linha, como ampicilina e sulfametoxazol/trimetoprima, de acordo com os autores Mshana e colaboradores (2013) e Elton e colaboradores (2020), pode ser o reflexo das pressões selectivas associadas ao uso inadequado de antimicrobianos e à fragilidade dos sistemas de vigilância característicos dos países de baixa e média renda (PBMRI).

A sobrecarga no uso de fluoroquinolonas é um factor provável do alto índice de susceptibilidade intermediária à ciprofloxacina reportado neste estudo, fenómeno comumente observado em PBMRI e descritos por Elton e colaboradores (2020) e Mshana e colaboradores (2013). Portanto, este fenómeno é preocupante na medida em que a persistência de estirpes de *E. coli* com susceptibilidade intermediária no microbioma intestinal representa um risco evolutivo, pois mutações adicionais podem levar à resistência plena, comprometendo tratamentos terapêuticos futuros, tal como enfatizado por de Lastours e colaboradores (2020) e van Schaik (2015).

Ao contrário da alta taxa de resistência observada aos antibióticos de primeira linha, alta taxa de sensibilidade aos antibióticos de vigilância foi observada neste estudo, com destaque para o grupo dos carbapenémicos (imipenem e meropenem). Estes achados corroboram com outros estudos em Moçambique, em isolados comunitários, conforme reportado por Chirindze e colaboradores (2018), bem como clínicos de *E. coli*, descritos por Mahaluça e colaboradores (2019) e Estaleva e colaboradores (2021). Nossos achados são, ainda consistentes com os de

outros estudos feitos na região da ASS em *E. coli* isolados da comunidade, por Fleece e colaboradores (2019) e Mfoutou Mapanguy e colaboradores (2021), reforçando a contínua vigilância e uso racional destes antibióticos.

Os carbapenémicos são antibióticos usados para tratar infecções graves causadas por bacilos Gram-negativos produtores de ESBLs e/ ou com alto grau de MDR (Wilson & Török, 2018). Os antibióticos carbapenémicos são de uso com vigilância de acordo com a OMS (2023), e o uso irracional como a automedicação e seu uso na veterinária podem aumentar a pressão selectiva e emergência de estirpes resistentes. Desde modo, é crucial que a eficácia desse grupo de antibióticos seja preservada.

Referente à alta sensibilidade das cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona e ceftazidima), reportadas neste estudo, verificou-se um enorme contraste em relação ao estudo conduzido em estirpes de *E. coli* isoladas na comunidade por Chirindze e colaboradores (2018) em que reportou-se taxa alta de resistência de *E. coli* a esses antibióticos (ceftazidima 71%; ceftriaxona 100%). Estas diferenças podem ser explicadas pelo facto desses últimos autores terem estudado exclusivamente estirpes previamente resistentes à ceftriaxona e fenotipicamente positivas para ESBL (enzimas β -lactamase de espectro estendido). Sendo que, de acordo com os autores Bush & Jacoby (2010), as enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL) exibem actividade hidrolítica significativamente aumentada contra este grupo de antibióticos.

Nossos achados, ainda em relação às cefalosporinas de terceira geração, contrastam também a de estudos realizados na ASS como é o caso o estudo conduzido por Mfoutou Mapanguy e colaboradores (2021), na República Democrática do Congo, em que 65% das estirpes de *E. coli* comensal foram resistentes à ceftazidima. Esta diferença pode estar relacionada à menor pressão selectiva a cefalosporinas de terceira geração em Moçambique, onde o acesso a esses antibióticos é limitado, tal como destacado por van der Meeren e colaboradores (2013).

O perfil combinado intermediário-resistência à amicacina e à gentamicina superior a 25% nas estirpes de *E. coli* do nosso estudo, sugere uma emergência de mecanismos de resistência a esta classe de antibióticos, possivelmente mecanismos moleculares associados à produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) entre bactérias comensais e patogénicas. Esses mecanismos geralmente encontram-se localizados em plasmídeos conjugativos, permitindo a disseminação horizontal, conforme enfatizado por Ramirez e Tolmasky (2017).

Entre os β -lactâmicos em combinação com inibidores de β -lactamase testados no nosso estudo, a *E. coli* apresentou um perfil de resistência distinto, com alta resistência à amoxicilina/clavulanato, mas alta sensibilidade à piperacilina/tazobactam. Mfoutou Mapanguy e colaboradores (2021) ao estudarem o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *E. coli* isolada em amostras de fezes de estudantes saudáveis, na República Democrática do Congo, reportaram uma taxa de apenas 1% para a amoxicilina/clavulanato. Portanto, os nossos dados sugerem uma maior sobrecarga na administração e uso da amoxicilina/clavulanto em Maputo, facto que pode ser fundamentado por vários autores, Levy e Marshall (2004); Dadgostar (2019); Klein e colaboradores (2019), ao enfatizarem que quanto maior for a exposição, maior será a pressão selectiva para as bactérias resistentes.

Uma frequência consideravelmente alta (28,5%) de MDR em estirpes de *E. coli*, foi constatada no nosso estudo. Estes resultados corroboram com um estudo anterior conduzido por Chirindze e colaboradores (2018), onde reportou uma elevada taxa MDR (88%) em estirpes de *E. coli* fenotipicamente ESBL, em Moçambique, sendo que o perfil elevado de MDR sugere a necessidade do uso e gestão racional dos antimicrobianos.

A colonização intestinal por estirpes de *E. coli* MDR em indivíduos assintomáticos, representa um reservatório para infecções clínicas. Estaleva e colaboradores (2021) e Santana e colaboradores (2022) reportaram 32,6% e 71% de MDR, respectivamente, em *E. coli* patogénica extra-intestinal (ExPEC), fenotipicamente positivas para produção de ESBL, no Hospital Central de Maputo (HCM). Embora, o nosso estudo, tenha-se focado em estudar estirpes de *E. coli* em indivíduos saudáveis em Maputo, nossos dados são preocupantes, isso levando em conta que estirpes comensais podem evoluir para patógenos invasivos em hospedeiros vulneráveis, tal como enfatizado por Kaper e colaboradores (2004).

A RAM em bactérias incluindo *E. coli*, representa um desafio global de saúde pública, especialmente em Países de baixa e média renda, como Moçambique, onde factores socioeconómicos e sanitários podem amplificar sua disseminação, fenómeno descrito por Cassini e colaboradores (2019).

A automedicação impulsionada pela venda não regulamentada de antibióticos, tal como reportado pelos autores Mate e colaboradores (2019); Rodrigues (2020) e Torres e colaboradores (2020), e a terapia empírica, decorrente da escassez de diagnósticos

microbiológicos, enfatizados por Mandomando e colaboradores (2010) e Van der Meeren e colaboradores (2013), constituem factores críticos para o aumento da RAM no País.

A contínua vigilância de bactérias comensais é essencial para além de compreender a dinâmica da resistência antimicrobiana, detectar precocemente os mecanismos de resistência emergentes como *blaNDM*, reportado pela primeira vez por Sumbana e colaboradores (2021), em ExPEC, afim de orientar políticas de gestão antimicrobiana.

Em suma, intervenções multissetoriais alinhadas às directrizes da OMS, para preservar a eficácia de antimicrobianos essenciais, incluindo educação comunitária, reforço da vigilância epidemiológica, investimentos no saneamento, e investimento em diagnósticos são urgentes para conter a disseminação de bactérias multidroga-resistentes (WHO, 2017; WHO, 2022).

10.2.3. Factores Associados a Multidroga-Resistência em *Escherichia coli*

A maior frequência de MDR de isolados de *E. coli*, observada no presente estudo, principalmente na faixa etária de 41-50 anos de idade, sugere que os factores relacionados a exposição acumulada a antibióticos ao longo da vida podem influenciar a selecção de estirpes resistentes Dadgostar (2019).

A idade está correlacionada com o aumento do uso de antibióticos, especialmente para condições crónicas, o que pode promover a pressão selectiva de bactérias resistentes, fenómeno descrito por Dadgostar (2019). Adicionalmente, alterações no microbioma intestinal associadas ao envelhecimento, como redução da diversidade microbiana e disbiose, podem criar um ambiente propício à colonização por patógenos resistentes a antimicrobianos, especialmente em indivíduos expostos a antibióticos ou hospitalizações frequentes, fenómenos bem descritos por Biagi e colaboradores (2016); Buffie e Pamer (2013). Contudo, outros factores desconhecidos podem provavelmente explicar o padrão de sensibilidade observado na faixa etária acima de 50 anos.

A associação significativa entre o contacto com animais de estimação e a MDR ressalta o papel potencial dos animais como reservatórios de bactérias resistentes. Os autores Lindahl e Magnusson (2020) e Rocha-Gracia e colaboradores (2015) afirmam que indivíduos com exposição frequente a animais apresentam maior risco de colonização por *E. coli* e outras Enterobactérias MDR, facto constatado neste estudo. Evidências recentes, demonstram ainda

que animais domésticos podem carregar estirpes de *E. coli* MDR, compartilhando genes de resistência via transmissão zoonótica, conforme reportado por Rocha-Gracia e colaboradores (2015) e Belas e colaboradores (2020).

Este fenómeno é particularmente relevante em regiões com práticas inadequadas de higiene, onde o contacto próximo entre humanos e animais é comum. A presença de genes de resistência na comunidade, como CTX-M/pAmpC genes, já foi documentada em estudos comparativos conduzidos em Moçambique por Chirindze e colaboradores (2018), reforçando a necessidade de políticas de educação sanitária para reduzir riscos.

A ausência de associação entre MDR e variáveis como sexo, proveniência e consumo de alimentos de rua, pode refletir características específicas da população estudada ou limitações metodológicas. Por exemplo, a não significância da variável sexo contrasta com estudos conduzidos por Brandl e colaboradores (2021), que associam diferenças hormonais ou comportamentais à colonização bacteriana. No entanto, a homogeneidade sociocultural da amostra (todos provenientes de Maputo), pode ter minimizado as variações geográficas ou socioeconómicas mais amplas. De acordo com os autores, o consumo de alimentos vendidos em ambientes informais está significativamente associado à contaminação por *Enterobacteriaceae* MDR em países de baixa e média renda, com taxas acima de 30% em análises microbiológicas. Contudo, não foi verificada associação significativa entre esses factores no presente estudo.

O presente estudo, sobre a caracterização fenotípica de estirpes de *E. coli*, isoladas de amostras de indivíduos saudáveis em Mputo, a ausência de informação foi constatada para variáveis referentes ao nível de escolaridade e uso prévio de antibióticos. Estas limitações impediram análises robustas sobre a relação entre educação, medicação prévia e colonização por estirpes MDR de *E. coli*. Além disso, os autores Auta e colaboradores (2019), ressaltam que falhas metodológicas na colheita de dados, como amostragem não representativa (viés de selecção), fadiga do respondente, e dificuldade de interpretação das perguntas são desafios críticos em ambientes de baixa e média renda.

11. Limitações do Estudo

No presente trabalho, foram constatadas as seguintes limitações:

- A falta de informações sobre o consumo de alimentos de rua e das condições sanitárias, limitaram a compreensão dos mecanismos de transmissibilidade de *E. coli*.
- O período que antecedeu este estudo, foi marcado por uma pandemia devastadora, onde as atenções do executivo, estavam viradas na mobilização de recursos, materiais e reagentes para dar resposta a esta pandemia tendo os laboratórios, passado por um momento de falta de reagentes e consumíveis para o seguimento de pesquisas; e, por outro lado, muitas empresas declararam falência o que comprometeu a selecção de participantes anteriormente definidos na busca da representatividade amostral.

Apesar das limitações aqui listadas, este trabalho, contribui para a base de dados epidemiológicos em Moçambique sobre padrões de susceptibilidade antimicrobiana de *E. coli* comensal no ambiente comunitário. Os nossos achados apoiam a reformulação de políticas de saúde pública, destacando a urgência de intervenções multissetoriais alinhadas às directrizes da OMS para preservar a eficácia de antimicrobianos essenciais, incluindo educação comunitária, reforço da vigilância epidemiológica, investimentos no saneamento, e investimento em diagnósticos para conter a disseminação de bactérias MDR.

12. Conclusões e Recomendações

12.1. Conclusões:

- O nosso estudo, revelou a frequência de indivíduos adultos de sexo masculino, residentes na cidade de Maputo.
- Observou-se altas taxas de resistência a antibióticos de **primeira linha** e um considerável padrão de susceptibilidade intermediária à ciprofloxacina; constatou-se, ainda, uma resistência de antibióticos da classe dos carbapenémicos, pese embora não na proporção verificada aos antibióticos de primeira linha. Esta classe de antibióticos trata infecções bacterianas Gram-negativas, altamente resistentes aos antibióticos de primeira linha, bem como infecções intra-hospitalares de patógenos resistentes e MDR, sendo importante a preservação da sua eficácia .
- A **idade mais avançada** e o **contacto com animais de estimação** foram as variáveis significativamente associadas ao perfil MDR em *E. coli* comensal isolada de indivíduos saudáveis em Maputo.

12.2. Recomendações

De acordo com as nossas conclusões recomendamos:

1. Ao Ministério de Saúde:

- Reforçar a regulamentação da venda de antibióticos e implementação de sistemas de monitoramento de RAM em zonas urbanas e rurais, seguindo o modelo *One Health*;
- Promover mais campanhas de vigilância nas comunidades sobre a aquisição dos antibióticos, o seu consumo, preservação do ambiente e das medidas a tomar em conta com o contacto com animais de estimação para conter a RAM.

2. Aos Investigadores/pesquisadores:

Fortalecimento de pesquisa

- Que sejam feitos mais estudos similares para sustentar a questão de carência de dados sobre a RAM em bactérias comensais do tracto gastrointestinal em Moçambique envolvendo uma amostra maior que pode assegurar a representatividade demográfica, a diversidade geográfica e socioeconómica seleccionada probabilisticamente;
- Incluir análises genómicas para mapear e identificar mecanismos específicos de resistência e virulência emergentes em Enterobactérias comensais.

13. Referências Bibliográficas

- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *10*(12), 6235–6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- Aslan, S., Altindis, M., Kara, R., Demiray, T., & Koroglu, M. (2018). Detection and Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 and Shiga-toxin Genes stx1, stx2 in Cattle Meat Samples. *Clinical Laboratory*, *64*(11). <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2018.180323>
- Auta, A., Hadi, M. A., Oga, E., Adewuyi, E. O., Abdu-Aguye, S. N., Adeloye, D., Strickland-Hodge, B., & Morgan, D. J. (2019). Global access to antibiotics without prescription in community pharmacies: A systematic review and meta-analysis. *The Journal of Infection*, *78*(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.07.001>
- Babakhani, S., & Oloomi, M. (2018). Transposons: The agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, *58*(11), 905–917. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800204>
- Becker, B., & Cooper, M. A. (2013). Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS Chemical Biology*, *8*(1), 105–115. <https://doi.org/10.1021/cb3005116>
- Belas, A., Menezes, J., Gama, L. T., & Pomba, C. (2020). Sharing of Clinically Important Antimicrobial Resistance Genes by Companion Animals and Their Human Household Members. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, *26*(10), 1174–1185. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0380>
- Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D. G. J. (2018). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, *42*(1), fux053. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux053>
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., & Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. *Nature Reviews. Microbiology*, *13*(5), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
- Biagi, E., Franceschi, C., Rampelli, S., Severgnini, M., Ostan, R., Turrioni, S., Consolandi, C., Quercia, S., Scurti, M., Monti, D., Capri, M., Brigidi, P., & Candela, M. (2016). Gut Microbiota

and Extreme Longevity. *Current Biology: CB*, 26(11), 1480–1485. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.016>

Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife*, 4, e05826. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>

Bonevski, B., Randell, M., Paul, C., Chapman, K., Twyman, L., Bryant, J., Brozek, I., & Hughes, C. (2014). Reaching the hard-to-reach: A systematic review of strategies for improving health and medical research with socially disadvantaged groups. *BMC Medical Research Methodology*, 14, 42. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-42>

Brandl, M., Hoffmann, A., Willrich, N., Reuss, A., Reichert, F., Walter, J., Eckmanns, T., & Haller, S. (2021). Bugs That Can Resist Antibiotics but Not Men: Gender-Specific Differences in Notified Infections and Colonisations in Germany, 2010-2019. *Microorganisms*, 9(5), 894. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050894>

Braveman, P., & Gottlieb, L. (2014). The social determinants of health: It's time to consider the causes of the causes. *Public Health Reports (Washington, D.C.: 1974)*, 129 Suppl 2(Suppl 2), 19–31. <https://doi.org/10.1177/00333549141291S206>

Buffie, C. G., & Pamer, E. G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews. Immunology*, 13(11), 790–801. <https://doi.org/10.1038/nri3535>

Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>

Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D. A., Oliveira, T. C., Struelens, M. J., Suetens, C., Monnet, D. L., & Burden of AMR Collaborative Group. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 19(1), 56–66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)

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 Infectious Diseases*, 18(1), 244. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3154-1>

Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 26–40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>

Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N., & Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, 3(2), 71–87. <https://doi.org/10.4161/gmic.19182>

Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>

CLSI. (2024). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 34th ed. CLSI Supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>

Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3903–3910. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>

de Lastours, V., Laouénan, C., Royer, G., Carbonnelle, E., Lepeule, R., Esposito-Farèse, M., Clermont, O., Duval, X., Fantin, B., Mentré, F., Decousser, J. W., Denamur, E., & Lefort, A. (2020). Mortality in *Escherichia coli* bloodstream infections: Antibiotic resistance still does not make it. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(8), 2334–2343. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa161>

Durand, D., Contreras, C. A., Mosquito, S., Ruíz, J., Cleary, T. G., & Ochoa, T. J. (2016). Pic gene of enteroaggregative *Escherichia coli* and its association with diarrhea in Peruvian children. *Pathogens and Disease*, 74(6), ftw054. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw054>

Edberg, S. C., Rice, E. W., Karlin, R. J., & Allen, M. J. (2000). *Escherichia coli*: The best biological drinking water indicator for public health protection. *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)*, 29, 106S-116S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2000.tb05338.x>

Elton, L., Thomason, M. J., Tembo, J., Velavan, T. P., Pallerla, S. R., Arruda, L. B., Vairo, F., Montaldo, C., Ntoumi, F., Abdel Hamid, M. M., Haider, N., Kock, R., Ippolito, G., Zumla, A., McHugh, T. D., & the PANDORA-ID-NET consortium. (2020). Antimicrobial resistance preparedness in sub-Saharan African countries. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00800-y>

Essack, S. Y., Desta, A. T., Abotsi, R. E., & Agoba, E. E. (2017). Antimicrobial resistance in the WHO African region: Current status and roadmap for action. *Journal of Public Health (Oxford, England)*, 39(1), 8–13. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdw015>

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. (2021). High prevalence of multidrug resistant ESBL- and plasmid mediated AmpC-producing clinical isolates of *Escherichia coli* at Maputo Central Hospital, Mozambique. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05696-y>

Feldman, S. F., Temkin, E., Wulffhart, L., Nutman, A., Schechner, V., Shitrit, P., Shvartz, R., Schwaber, M. J., & Carmeli, Y. (2022). Effect of temperature on *Escherichia coli* bloodstream infection in a nationwide population-based study of incidence and resistance. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 11(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s13756-022-01184-x>

Fernández, L., Breidenstein, E. B. M., & Hancock, R. E. W. (2011). Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 14(1), 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2011.01.001>

Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(5), 269–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>

Foxman, B. (2014). Urinary tract infection syndromes: Occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infectious Disease Clinics of North America*, 28(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.003>

George, S., Duran, N., & Norris, K. (2014). A systematic review of barriers and facilitators to minority research participation among African Americans, Latinos, Asian Americans, and Pacific Islanders. *American Journal of Public Health*, 104(2), e16-31. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2013.301706>

- Heiman, K. E., Mody, R. K., Johnson, S. D., Griffin, P. M., & Gould, L. H. (2015). *Escherichia coli* O157 Outbreaks in the United States, 2003–2012. *Emerging Infectious Diseases*, 21(8), 1293–1301. <https://doi.org/10.3201/eid2108.141364>
- Hu, J., & Torres, A. G. (2015). Enteropathogenic *Escherichia coli*: Foe or innocent bystander? *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21(8), 729–734. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.01.015>
- Iskandar, K., Murugaiyan, J., Hammoudi Halat, D., Hage, S. E., Chibabhai, V., Adukkadukkam, S., Roques, C., Molinier, L., Salameh, P., & Van Dongen, M. (2022). Antibiotic Discovery and Resistance: The Chase and the Race. *Antibiotics*, 11(2), 182. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020182>
- Jenkins, C. (2018). Enteroaggregative *Escherichia coli*. Em G. Frankel & E. Z. Ron (Eds.), *Escherichia coli, a Versatile Pathogen* (pp. 27–50). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/82_2018_105
- Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G. Y., & Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews. Immunology*, 13(5), 321–335. <https://doi.org/10.1038/nri3430>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Klein, E. Y., Tseng, K. K., Pant, S., & Laxminarayan, R. (2019). Tracking global trends in the effectiveness of antibiotic therapy using the Drug Resistance Index. *BMJ Global Health*, 4(2), e001315. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2018-001315>
- Lee, J.-H. (2019). Perspectives towards antibiotic resistance: From molecules to population. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 57(3), 181–184. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-0718-8>
- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10(12 Suppl), S122-129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>
- Lima, L. M., Silva, B. N. M. da, Barbosa, G., & Barreiro, E. J. (2020). β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 208, 112829. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>

- Lindahl, J., & Magnusson, U. (2020). Zoonotic pathogens in urban animals: Enough research to protect the health of the urban population? *Animal Health Research Reviews*, 21(1), 50–60. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000100>
- Machado-Moreira, B., Richards, K., Brennan, F., Abram, F., & Burgess, C. M. (2019). Microbial Contamination of Fresh Produce: What, Where, and How? *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(6), 1727–1750. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12487>
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., Stahl, D. A., & Brock, T. D. (2022). *Brock biology of microorganisms* (Sixteenth edition, global edition). Pearson.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mahaluça, F., Essack, S., Zimba, T., & Sacarlal, J. (2019). Profile of Antibacterial Resistance of the Enterobacteriaceae Family in Pediatric and Adult Patients. *Annals of clinical and laboratory science*, 1, 1–6.
- Majalekar, P. P., & Shirote, P. J. (2020). Fluoroquinolones: Blessings Or Curses. *Current Drug Targets*, 21(13), 1354–1370. <https://doi.org/10.2174/1389450121666200621193355>
- Makelele, L. K., Kazadi, Z. A., Oleko, R. W., Foma, R., Mpalang, R. a, Ngbolua, K. T. N., & Gédeon, B. N. (2015). Microbiological quality of food sold by street vendors in Kisangani, Democratic Republic of Congo. *African Journal of Food Science*, 9(5), 285–290. <https://pdfs.semanticscholar.org/354b/0cfb6af8b3be5d4c7ec0cdd7724c5988ba9e.pdf>
- Mandomando, I., Sigaúque, B., Morais, L., Espasa, M., Vallès, X., Sacarlal, J., Macete, E., Aide, P., Quintò, L., Nhampossa, T., Machevo, S., Bassat, Q., Menéndez, C., Ruiz, J., Roca, A., & Alonso, P. L. (2010). Antimicrobial drug resistance trends of bacteremia isolates in a rural hospital in southern Mozambique. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(1), 152–157. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0578>

Manguiat, L. S., & Fang, T. J. (2013). Microbiological quality of chicken- and pork-based street-vended foods from Taichung, Taiwan, and Laguna, Philippines. *Food Microbiology*, 36(1), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.005>

Manhique, G. A., Hessel, C. T., Plessis, E. D., Lopes, S. M., Elias, S. O., Tondo, E., & Korten, L. (2020). Prevalence of Enterobacteriaceae on Ready to Eat Salads, Drinking Water and Surfaces in Food Markets of Maputo, Mozambique. *Journal of Food and Nutrition Research*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Prevalence-of-Enterobacteriaceae-on-Ready-to-Eat-in-Manhique-Hessel/fb263a9cb9f47e1f1ad7ed6fdb3be0c8c2be9ab1>

Marshall, K. E., Hexemer, A., Seelman, S. L., Fatica, M. K., Blessington, T., Hajmeer, M., Kisselburgh, H., Atkinson, R., Hill, K., Sharma, D., Needham, M., Peralta, V., Higa, J., Blickenstaff, K., Williams, I. T., Jhung, M. A., Wise, M., & Gieraltowski, L. (2020). Lessons Learned from a Decade of Investigations of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Outbreaks Linked to Leafy Greens, United States and Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 26(10), 2319–2328. <https://doi.org/10.3201/eid2610.191418>

Mate, I., Come, C. E., Gonçalves, M. P., Cliff, J., & Gudo, E. S. (2019). Knowledge, attitudes and practices regarding antibiotic use in Maputo City, Mozambique. *PloS One*, 14(8), e0221452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221452>

Mathers, A. J., Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 565–591. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-14>

Mfoutou Mapanguy, C. C., Adedaja, A., Kecka, L. G. V., Vouvougui, J. C., Nguimbi, E., Velavan, T. P., & Ntoumi, F. (2021). High prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in Congolese students. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 103, 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.1441>

Motta, S. S., Cluzel, P., & Aldana, M. (2015). Adaptive resistance in bacteria requires epigenetic inheritance, genetic noise, and cost of efflux pumps. *PloS One*, 10(3), e0118464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118464>

Mshana, S. E., Matee, M., & Rweyemamu, M. (2013). Antimicrobial resistance in human and animal pathogens in Zambia, Democratic Republic of Congo, Mozambique and Tanzania: An

urgent need of a sustainable surveillance system. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12, 28. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-28>

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Tenover, M. C. (2005). *Medical microbiology* (5th ed). Elsevier Mosby.

Nguyen, Y., & Sperandio, V. (2012). Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 90. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00090>

Nhantumbo, C., Cangi Vaz, N., Rodrigues, M., Manuel, C., Rapulua, S., Langa, J., Nhantumbo, H., Joaquim, D., Dosse, M., Sumbana, J., Santos, R., Monteiro, S., & Juízo, D. (2023). Assessment of Microbial Contamination in the Infulene River Basin, Mozambique. *Water*, 15(2), Artigo 2. <https://doi.org/10.3390/w15020219>

Nji, E., Kazibwe, J., Hambridge, T., Joko, C. A., Larbi, A. A., Dampsey, L. A. O., Nkansa-Gyamfi, N. A., Stålsby Lundborg, C., & Lien, L. T. Q. (2021). High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* from healthy human sources in community settings. *Scientific Reports*, 11(1), 3372. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82693-4>

Ochoa, T. J., & Contreras, C. A. (2011). Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24(5), 478–483. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834a8b8b>

Okoh, A. I., & Osode, A. N. (2008). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): A recurring decimal in infants' and travelers' diarrhea. *Reviews on Environmental Health*, 23(2), 135–148. <https://doi.org/10.1515/reveh.2008.23.2.135>

Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>

Pavlovic, M., Huber, I., Skala, H., Konrad, R., Schmidt, H., Sing, A., & Busch, U. (2010). Development of a multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(7), 801–808. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0457>

Petro, C. D., Duncan, J. K., Seldina, Y. I., Allué-Guardia, A., Eppinger, M., Riddle, M. S., Tribble, D. R., Johnson, R. C., Dalgard, C. L., Sukumar, G., Connor, P., Boisen, N., & Melton-

Celsa, A. R. (2020). Genetic and Virulence Profiles of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Isolated From Deployed Military Personnel (DMP) With Travelers' Diarrhea. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 200. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00200>

Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., Janda, W. M., Koneman, E. W., Schreckenberger, P. C., & Woods, G. L. (2017). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 7th ed. Jones & Bartlett Learnin.

Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2017). Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(12), 2267. <https://doi.org/10.3390/molecules22122267>

Rappelli, P., Folgosa, E., Solinas, M. L., Dacosta, 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(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.07.006>

Rocha-Gracia, R. C., Cortés-Cortés, G., Lozano-Zarain, P., Bello, F., Martínez-Laguna, Y., & Torres, C. (2015). Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2 β -lactamases. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 203(3), 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.12.026>

Rodrigues, C. F. (2020). Self-medication with antibiotics in Maputo, Mozambique: Practices, rationales and relationships. *Palgrave Communications*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1057/s41599-019-0385-8>

Santona, A., Sumbana, J. J., Fiamma, M., Deligios, M., Taviani, E., Simbine, S. E., Zimba, T., Sacarlal, J., Rubino, S., & Paglietti, B. (2022). High-risk lineages among extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from extraintestinal infections in Maputo Central Hospital, Mozambique. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 60(4), 106649. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106649>

Sumbana, J. J., Santona, A., Fiamma, M., Taviani, E., Deligios, M., Zimba, T., Lucas, G., Sacarlal, J., Rubino, S., & Paglietti, B. (2021). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* ST405 Isolate Coharboring blaNDM-5 and blaCTXM-15: A New Threat in Mozambique. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 27(12), 1633–1640. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0334>

- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(3), 207–217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Torres, N. F., Solomon, V. P., & Middleton, L. E. (2020). Identifying the commonly used antibiotics for self-medication in urban Mozambique: A qualitative study. *BMJ Open*, 10(12), e041323. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-041323>
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2017). *Microbiology: An introduction* (Twelfth edition). Pearson.
- Ur Rahman, S., Ali, T., Ali, I., Khan, N. A., Han, B., & Gao, J. (2018). The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *BioMed Research International*, 2018, 9519718. <https://doi.org/10.1155/2018/9519718>
- van der Meeren, B. T., Chhaganlal, K. D., Pfeiffer, A., Gomez, E., Ferro, J. J., Hilbink, M., Macome, C., van der Vondervoort, F. J., Steidel, K., & Wever, P. C. (2013). Extremely high prevalence of multi-resistance among uropathogens from hospitalised children in Beira, Mozambique. *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde*, 103(6), 382–386. <https://doi.org/10.7196/samj.5941>
- van Duin, D., & Paterson, D. L. (2016). Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2), 377–390. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.004>
- van Schaik, W. (2015). The human gut resistome. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 370(1670), 20140087. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0087>
- Van Spall, H. G. C., Toren, A., Kiss, A., & Fowler, R. A. (2007). Eligibility criteria of randomized controlled trials published in high-impact general medical journals: A systematic sampling review. *JAMA*, 297(11), 1233–1240. <https://doi.org/10.1001/jama.297.11.1233>

von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. M., & Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7, 173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>

World Health Organization-WHO. (2015). *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*.

World Health Organization-WHO. (2017). *Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017*. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

World Health Organization-WHO. (2022). *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022*. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Wilson, H., & Török, M. E. (2018). Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Microbial Genomics*, 4(7), e000197. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000197>

Xu, C., Kong, L., Liao, Y., Tian, Y., Wu, Q., Liu, H., & Wang, X. (2022). Mini-Review: Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* from Farm Animal-Associated Sources. *Antibiotics*, 11(11), Artigo 11. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111535>

Zhang, L., Kinkelaar, D., Huang, Y., Li, Y., Li, X., & Wang, H. H. (2011). Acquired antibiotic resistance: Are we born with it? *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), 7134–7141. <https://doi.org/10.1128/AEM.05087-11>

Apêndices

ANEXO I: Formulário de Consentimento Informado para os Participantes do Estudo



FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA OS PARTICIPANTES DO ESTUDO

TÍTULO DO ESTUDO: Caracterização Fenotípica de Estirpes de *Escherichia coli* Isoladas de Amostras de Fezes de Indivíduos Saudáveis em Maputo no Período de 2023-2024

Investigador principal: Ventura Relvas Elisa Jaime Azarias Chongo

Outros Investigadores: Alice Afonso Manjate e Jerónimo Langa

Este formulário tem como finalidade fornecer-lhe informações sobre o estudo, de modo a ajudá-lo (a) a decidir se quer ou não participar nele. Por favor, leia-o com toda atenção e pergunte se tiver alguma dúvida sobre este estudo.

1. Objectivo do estudo:

No Mundo e em países em desenvolvimento tem-se verificado muita resistência aos antibióticos por bactérias do estomago. O estudo não tem fins lucrativos e enquadra-se na pesquisa no âmbito da Dissertação para candidatura à obtenção de grau de mestre. Pretendemos neste estudo avaliar indivíduos não doentes da província e cidade de Maputo se existem esses factores que são indicados pelos estudos como os causadores dessa resistência aos antibióticos

2. O que significa participar neste estudo:

A sua participação neste estudo é voluntaria, caso você decida não participar não irá-lhe acontecer nada. Se você aceitar em participar no estudo, vamos-lhe pedir o seguinte:

- Assinar a ficha do consentimento informado
- Dar informações sobre a idade, morada entre outras informações que serão pedidas no questionário e que será fornecido pelos investigadores;
- Fazer a colheita de fezes em casa: defecar numa folha limpa e transferir a amostra para o frasco uma quantidade igual ao tamanho da cabeça do palito do fosforo (1g de fezes) com a ajuda duma zaragatoa.

3. Custos na participação neste estudo:

Não há nenhum custo para você participar neste estudo. Os custos dos exames laboratoriais por realizar serão cobertos pelos fundos do estudo.

4. Risco possível se você participar neste estudo:

O estudo não prevê riscos elevados para os participantes, um dos potenciais riscos estaria ligado ao mau procedimento na colheita e transporte das amostras. Como forma de minimizar este risco, os participantes serão instruídos a embrulharem devidamente com papel higiênico o frasco e fazer assepsia das mãos no momento, igualmente os frascos a serem entregues aos participantes terão uma colherinha junto à tampa. O estudo prevê algum desconforto aos participantes durante o inquérito e como forma de minimizar, o inquiridor irá interromper o questionário ou então, deixar em branco a pergunta que terá causado desconforto. Em caso de se interromper o questionário, o consentimento previamente assinado será desconsiderado e anulado, sem prejuízo ao participante.

5. Os benefícios da participação neste estudo:

Em relação aos benefícios, estes podem não ter um impacto imediato aos participantes. Os benefícios para o presente estudo têm efeitos a medio e longos prazos na medida em que irão depender dos fazedores e decisores de políticas nacionais na criação de modelos de orientação prática sobre o uso de antibióticos e tratamento de infeções bacterianas nas comunidades.

6. O que poderá acontecer se você decidir interromper (desistir) a sua participação neste estudo:

Nada. Qualquer participante estará livre de interromper a sua participação em qualquer momento, sem nenhum problema. O que pedimos é que informe que gostaria de desistir de participar no estudo. Você pode dizer isso a qualquer membro da equipe de pesquisa e a qualquer hora. A sua desistência não terá nenhuma implicação nos resultados Laboratoriais. Você será atendida e tratada sempre que se apresentar nesta ou noutra Centro de Saúde.

7. Pessoas a contactar em caso de dúvidas ou qualquer esclarecimento sobre o estudo:

Você tem o direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer esclarecimento, bastando para isso entrar em contacto com o Sr. Jerónimo Langa pelo telefone: +258 867803888, a Sra. Alice Afonso Manjate pelo telefone: +258 82 41 84 600 ou +258 84 06 84 84 6 ou com o Comité Nacional de Bioética para Saúde no Ministério da Saúde pelo nr +258 84 40 66 350 e ainda pode falar com a Sr. Ventura Relvas Elisa Jaime Azarias Chongo pelo telefone: +258 842305000.

8. Confidencialidade da informação recolhida:

Esforços serão envidados para proteger a informação dos seus resultados das análises laboratoriais. A informação será mantida confidencial através do sistema de codificação. Quando os resultados deste estudo forem divulgados e partilhados em conferencias, toda a informação identificadora dos participantes será removida ou alterada para que você e, outros participantes não possam ser identificados. Porém, antes desta divulgação o participante será informado detalhadamente sobre os resultados da pesquisa em que participou.

9. Registo do seu consentimento:

Uma cópia do formulário de consentimento será guardada juntamente com os resultados do estudo num armário e trancado à chave na Faculdade de Medicina, em que só os membros da equipa terão acesso, outra cópia ser-lhe-á entregue.

DECLARAÇÃO DO CONSENTIMENTO INFORMADO

1. **Título do Protocolo:** Caracterização Fenotípica de Estirpes de *Escherichia coli* Isoladas de Amostras de Fezes de Indivíduos Saudáveis em Maputo no Período de 2023-2024

Eu li esta declaração de consentimento para participação na pesquisa e/ou foi-me lido o consentimento e explicados os propósitos da pesquisa. Todas as minhas perguntas e dúvidas foram respondidas e livre e voluntariamente aceito em participar nesta pesquisa.

Assinatura do participante _____

Data e hora

Nome do participante (em maiúsculas)

Impressão digital
do participante
que não possa
assinar

Assinatura da pessoa que realizou a explicação do consentimento _____

Data

Nome (em maiúsculas) da pessoa que realizou a explicação do consentimento

Data

Se o participante/representante legal não souber ler, uma testemunha imparcial deve também assinar este formulário:

Assinatura da testemunha imparcial

Data _____

Nome da testemunha imparcial (em maiúsculas)

ANEXO II: Formulário de Recolha de Dados



FACULDADE DE MEDICINA DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA FORMULÁRIO DE RECOLHA DE DADOS

I. Identificação do Participante

1. N° do Participante:/2023..... Data:/...../202....
2. Sexo: M F
3. Idade:.....anos
4. Endereço: Província.....Cidade/Distrito.....Bairro.....
5. Nível de escolaridade? Nenhum.....Primário.....Secundário..... Superior.....

Factores Predisponentes

A. Histórico de uso de Antibióticos

- a) Consumo de antibióticos nos últimos 14/30 dias? Sim..... Não.....

B. Hábitos e exposições comportamentais

- a) Consumo de Alimentos vendidos nas ruas? Sim..... Não.....
b) Portagem ou contacto com animais de estimação? Sim..... Não.....

C. Condições sanitárias

- a) Tipo de casa de banho/latrina? Convencional Moderno.....

ANEXO III: Formulário de Dados de laboratório



**FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FORMULÁRIO DE DADOS DE LABORATÓRIO**

TÍTULO DO ESTUDO: Caracterização Fenotípica de Estirpes de *Escherichia coli* Isoladas de Amostras de Fezes de Indivíduos Saudáveis em Maputo no Período de 2023-2024

I. Dados Microbiológicos e TSA

1. **Cultura Bacteriana:** Positiva () Negativa ()

Características.....
.....
.....
.....
.....

2. **Identificação e confirmação bacteriana**
.....

3. **Teste de Susceptibilidade aos Antibióticos:**

Antibiótico	[Concentração]	Halo de Inibição	S	I	R
<i>Amoxicillin/Clavulanic acid (AUG)</i>	30µgmm
<i>Piperacilim/Tazobactam (TZP)</i>	110 µgmm
<i>Ampicilin (AMP)</i>	10µgmm
<i>Ceftazidime (CAZ)</i>	30µgmm
<i>Ciprofloxacin (CIP)</i>	5µgmm
<i>Imepenem (IMP)</i>	10µgmm
<i>Meropenem (MEM)</i>	10µgmm
<i>Amikacin (AK)</i>	30µgmm
<i>Tetracycline (TE)</i>	30µgmm
<i>Sulphamethoxazole/trimethoprim (STX)</i>	25µgmm
<i>Cefepime (CEF)</i>	30µgmm
<i>Gentamicina (GN)</i>	30ugmm
<i>Ceftriaxone (CRO)</i>	30ugmm

ANEXO IV: Materiais e Equipamentos Utilizados no Estudo

Material Laboratorial

- Bico de Bunsen
- Fósforo
- Ansas de inoculação de 10 μ L;
- Amostras de fezes;
- Cronómetro;
- *Descartex*;
- Luvas de látex;
- Luvas térmicas;
- Máquina fotográfica;
- Micropipetas ajustáveis de 10, 50, 100, 200 e 1000 μ L;
- Óculos contra UV;
- Papel toalha;
- Craveira;
- Pente de espessura;
- Água peptonada;
- Meio cromogénico CPSE;
- Álcool (70%);
- Caldo Luria Bertani;
- Ágar MacConkey;
- Ágar Citrato *Simmons*;
- *Skim milk*;
- *DNA Away*;
- *PBS 1X*;
- Buffer[10X] (com MgCl₂);
- dNTP's [10 mM];
- Soro fisiológico 85%;
- Discos de antibióticos;
- Papel de *parafilm*;
- Placas de Petri (20 × 150mm);
- Pontas estéreis com filtro de 10 a 1000 μ L;
- Proveta graduada de 100 mL;
- Sacos de *Ziplock*;
- Suportes para tubos;
- Tubos *ependorf* de 1.5 mL;
- Tubos *ependorf* de 0.5 mL;
- Tubos de *Falcon* de 15-45 mL;
- Tubos de PCR;
- *Weighing boats* e Espátula.

Meios de cultura e reagentes

- Iniciador *uidA*[10 μ M];
- *Taq DNA* polimerase;
- Água desionizada;
- Controle positivo (*uidA+*);
- DNA molde;
- Agarose;
- *DNA gel loading dye* (6X);
- *DNA ladder* (100pb);
- *Gel red* [10.000X];
- *TAE* (1X);

Equipamentos

- Agitador tipo *vórtex*;
- Banho-maria;
- Balança analítica;
- Cabine de Biossegurança de classe
- Câmara de PCR;
- Centrífuga;
- Geleira -80°C;
- Termociclador Gene Amp PCR System 9700;
- Incubadora;
- Congelador;
- Fonte e cuba para eletrofores
- Micro-ondas;
- Transiluminador UV.

ANEXO V: Protocolo de Extração de DNA

A extração de ADN foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rappelli *et al.* (2005), tendo seguido os seguintes passos:

1. Subcultivou-se uma colónia de *E. coli* em tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo Lúria Bertani (LB) e incubou-se a 37°C por 24h;
2. Pipetou-se 300 µL da solução bacteriana em tubos *Eppendorf* com auxílio de uma micropipeta;
3. Colocou-se os tubos de *Eppendorf* na centrífuga a 6000 rpm, por 5 minutos, 20°C para sedimentação;
4. Descartou-se o sobrenadante cuidadosamente por inversão dos tubos no papel toalha, e ressuspendeu-se o *pellet* (sedimento das células) em 300 µL de PBS, agitou-se por 10s e levou-se ao banho-maria, onde incubou-se durante 7 min a 95°C;
5. Retirou-se os tubos do banho-maria, limpou-se, e centrifugou-se a 12000 rpm por 5min, 20°C;
6. Retirou-se 50 µL do sobrenadante (ADN), cuidadosamente com auxílio de micropipeta para novos tubos *Eppendorf*;
7. Guardou-se o sobrenadante na geleira a -20°C para posterior uso.

ANEXO VI: Etapas de Preparação do Gel de Agarose para Electroforese

1. Pesou, com auxílio de uma balança analítica, 1 g de agarose e dissolveu-se em 100 mL do tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) num frasco de vidro esterilizado;
2. A solução foi fundida no microondas por 3 min, tendo sido evitada a fervura da mesma por meio da visualização;
3. Foram adicionados 5 µL do gel Red [10.000X] no frasco e fez-se a mistura completa da solução por meio de movimentos circulares;
4. A solução foi colocada lentamente num suporte eletroforético com pente de espessura colocado para formação dos poços para carregamento dos *amplicons*;
5. A solução do gel foi deixada solidificar durante 30 min;
6. No final, o pente de espessura foi retirado e o gel foi imerso na cuba eletroforética contendo o tampão TAE 1X.

ANEXO VII: Aprovação Ética do Estudo

Título: Caracterização Fenotípica de Estirpes de *Escherichia coli* Isoladas de Amostras de Fezes de Indivíduos Saudáveis em Maputo no Período de 2023-2024



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

Exmo. Senhor
Dr. Ventura Relvas
Faculdade de Medicina

Ref:345/CNBS/25 Data 01 de Julho de 2025

Assunto: Renovação da aprovação do protocolo de estudo intitulado: “*Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de Escherichia coli isoladas de fezes de indivíduos saudáveis em Maputo no período de 2023-2024*”.


O Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS), analisou o relatório de progresso do estudo intitulado: “*Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de Escherichia coli isoladas de fezes de indivíduos saudáveis em Maputo no período de 2023-2024*”, 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 01 de Julho de 2026. 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 Presidente do CNBS



Profª Doutora Esperança Sevéne Comiche

Endereço:
Ministério da Saúde - 2º andar dto
Av. Eduardo Mondlane, Nº 1008 / Salvador Allende
Maputo - Moçambique

C. Postal: 264
Telefone: +258 82 406 6350
E-mail: cnbsmocambique@gmail.com
NUI: 700 253 481