



Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas
Licenciatura em Biologia e Saúde
Culminação de Estudos II



Trabalho de Investigação

Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas em amostras de Alface (*Lactuca sativa*) e Água do Vale de Infulene, cidade da Matola

Autora: Agar Abel Matsinhe



Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas
Licenciatura em Biologia e Saúde
Culminação de Estudos II



Trabalho de Investigação

Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas em Amostras de Alface (*Lactuca sativa*) e Água do Vale de Infulene, cidade da Matola

Autora:

Agar Abel Matsinhe

Supervisores:

José Sumbana, PhD, MSc.

Esménia João, BSc.

Maputo, Agosto de 2024

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à Deus pelo dom da vida e por ser o meu maior alicerce e ajudador durante esta longa jornada.

Aos colaboradores do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane pela recepção, acompanhamento, suporte e aprendizado no decorrer deste trabalho, o meu muito obrigado, o vosso contributo foi essencial para o alcance desta meta.

Aos meus supervisores, Prof. Doutor José Sumbana e dr^a Esménia João, pela paciência, colaboração, orientação, suporte e principalmente pelos ensinamentos durante a realização do presente trabalho, o meu muito obrigada.

Os meus agradecimentos são extensivos aos Engenheiros Michaque Dosse e Dominic Joaquim, da Faculdade de Engenharia, com os quais tive grande prazer de conviver e contar com a sua ajuda na execução do trabalho e colaboração contínua durante as actividades do campo.

Sou imensamente grata aos meus pais, Abel Vasco Matsinhe e Regina Vasco Balate, pela educação, amor, apoio moral transmitido de forma incondicional e por sempre me incentivarem a levar os estudos como prioridade, aos meus tios Gabriel Balate, Marcos Mulima e Neli Balate pelo incentivo.

Aos meus irmãos, Vasco de Belém, Fáusia Matsinhe, Mauro Matsinhe e Artimiza Pelembe pela amizade, companheirismo e por sempre mostrarem-se disponíveis a ajudar na tajectória para o sucesso académico e profissional, a vós também dirijo o meu profundo agradecimento.

Ao meu melhor amigo Justino Tambo e aos meus amigos Cláudio Muendane, Alda Macamo, Ivete Samuel, Tivânia Chissico, Fernanda Mortar, Júlio Mula, Maurício Machanguane, Juvêncio Filipe, Óscar Chissico, Vinésia Nhamirre, Nilsa Roque, Khriss Berr e Edna Correia pelo suporte emocional, material e científico que prestaram durante a minha formação, muito obrigada!

Por fim, aos colegas de turma de Biologia e Saúde 2020, em especial, Nilton Ngoca, Lectícia Luísa, Marlene Facitela, Berta Tambisse, Pedro Pedro, o meu agradecimento pelos anos de companheirismo na academia.

E a todos que directa ou indirectamente contribuíram para que este momento chegasse,

o meu muito obrigada.

Dedicatória

Ao meu saudoso tio Mário Vasco Balate (*em memória*) que foi um amigo, conselheiro que sempre acreditou no meu sucesso acadêmico.

Aos meus pais e a mim, por nunca deixar que as adversidades da vida me abatessem e por cultivar a esperança de que tudo é possível se acreditarmos, buscarmos e nos empenharmos.

Porque para Deus, nada é impossível (Lucas 1: 37)

Declaração de Honra

Eu, Agar Abel Matsinhe, declaro por minha honra que este trabalho com o tema “Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isolada em amostras de alface (*Lactuca sativa*) e água do Vale de Infulene, Cidade da Matola” é resultado da minha pesquisa e empenho sob a orientação dos supervisores e que o seu conteúdo é original e as fontes foram devidamente referenciadas.

Maputo, Agosto de 2024



(Agar Abel Matsinhe)

Resumo

As estirpes de *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) patogênicas e resistentes aos antibióticos têm sido isoladas em amostras água e vegetais incluindo alface e associadas a infecções humanas. Estudos de vigilância de resistência antimicrobiana em água e alimentos são escassos em Moçambique, dificultando o controlo da emergência de estirpes resistentes e orientações de tratamento das infecções. O estudo teve como objectivo avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas em amostras de alface (*Lactuca sativa*) e água do Vale de Infulene, Cidade da Matola.

Foi um estudo descritivo transversal que consistiu na colheita de um total de 153 amostras das quais, 99 (64,7%) foram de de alface e 54 (35,3%) de água no Vale do Infulene, entre Maio e Novembro de 2023. A identificação dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* foi feita através de testes bioquímicos (ágar MacConkey e ágar Citrato de Simmons), meios cromogénicos específicos para *E. coli* e *Klebsiella* spp. e o kit de Índice de Perfil Analítico 20E (API 20E). O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi feito incluindo 13 antibióticos, nomeadamente: ampicilina, amoxicilina ácido-clavulânico ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, amicacina, gentamicina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, aztreonam, ciprofloxacina, meropenem e imipenem, através do método de disco em difusão de Kirby-Bauer, seguindo as directizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020).

Do total de 153 amostras colhidas, identificamos 33 (22%) isolados de *E. coli* (13 em alface e 20 em água) e 30 (20%) isolados de *K. pneumoniae* (15 em alface e 15 em água). Os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* obtidos de amostras de água e alface apresentaram altas frequências de resistência para a maior parte dos antibióticos testados, como a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, amicacina, gentamicina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, aztreonam e ciprofloxacina, variando entre 27% e 79% em isolados de *E. coli* e 30% e 100% em isolados de *K. pneumoniae*. Os antibióticos carbapenémicos, foram os mais eficazes apresentando, tanto o meropenem quanto o imipenem sensibilidade em 100% de isolados de *E. coli* e em 90% de isolados de *K. pneumoniae*, sendo estes considerados antibióticos de reserva para o tratamento de infecções multidroga-resistentes.

A frequência de isolados de *E. coli* multidroga-resistente em amostras de água foi de 20/20 (100%) e em amostras de alface foi de 8/13 (62%), enquanto a frequência de isolados de *K.*

pneumoniae multidroga-resistente em amostras de água foi de 14/15 (93%) e em amostras de alface foi de 9/15 (60%).

A presença de estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* resistentes em amostras de alface e água no Vale de Infulene constitui um risco para a saúde pública, tornando-se imprescindível o controle das fontes de contaminação, reforço das regras de higiene na preparação da alface e vigilância contínua de resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: Alface, água, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, resistência antimicrobiana, vale de Infulene.

Índice Geral

Agradecimentos	III
Dedicatória.....	IV
Declaração de Honra	V
Resumo	VI
Índice de tabelas	XI
Índice de figuras	XII
Lista de Abreviaturas.....	XIII
Unidades de Medida	XV
1. Introdução.....	1
1.1. Problema	3
1.2. Justificativa	4
2. Objectivos.....	5
2.1. Geral.....	5
2.2. Específicos	5
3. Hipóteses	5
4. Revisão de literatura.....	6
4.1. Importância da Água e Alface para a saúde humana.....	6
4.2. Água e Alface como veículos de patógenos resistentes.....	7
4.3. Bactérias Gram-negativas associadas a infecções veiculadas pela água e alface	8
4.3.1. <i>Escherichia coli</i>	9
4.3.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
4.3.3. <i>Salmonella</i> spp.....	10
4.3.4. <i>Shigella</i> spp.	11
4.3.5. <i>Vibrio cholerae</i>	11
4.4. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos	12

4.4.1.	Inativação enzimática do antibiótico	13
4.4.2.	Modificação do alvo do antibiótico	14
4.4.3.	Bombas de efluxo	14
4.4.4.	Alteração da permeabilidade da membrana.....	14
5.	Área de estudo	16
6.	Metodologia	18
6.1.	Tipo de estudo.....	18
6.2.	Amostragem.....	18
6.3.	Critérios de inclusão	19
6.4.	Critérios de exclusão.....	19
6.5.	Variáveis do estudo.....	19
6.6.	Materiais	19
6.7.	Procedimentos laboratoriais.....	21
6.8.	Análise laboratorial.....	22
6.8.1.	Isolamento e Identificação bioquímica dos isolados de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> em amostras de água e alface.....	22
6.8.2.	Identificação de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> em amostras de água e alface	24
6.8.3.	Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> em amostras de água e alface	25
6.9.	Análise de dados	26
7.	Resultados	27
7.1.	Características sociodemográficas dos participantes do estudo e condições de cultivo de alface no vale de Infulene	27
7.2.	Frequência de isolados de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> obtidas de amostras de água e alface no Vale de Infulene	27
7.3.	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de <i>Escherichia coli</i> isolados em amostras de água e alface.....	28

7.4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolados em amostras de água e alface.....	32
8. Discussão.....	36
8.1. Características sociodemográficas dos participantes do estudo e condições de cultivo de alface no vale de Infulene	36
8.2. Frequência de isolados de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> obtidas em amostras de água e alface do Vale de Infulene	36
8.3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de <i>Escherichia coli</i> isolados de amostras de água e alface.....	38
8.4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , isolados de amostras de água e alface.....	41
9. Conclusão.....	45
10. Limitações	46
11. Recomendações.....	47
12. Referências bibliográficas	48
13. Anexos.....	61

Índice de tabelas

Tabela 1: Pontos de colheita de amostras de água e alface.	18
Tabela 2: Materiais utilizados no presente estudo.	19
Tabela 3: Antibióticos incluídos para a avaliação do perfil de susceptibilidade dos isolados de <i>E. coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
Tabela 4: Frequência de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> identificados em alface e água no Vale de Infulene.	28
Tabela 5: Pontos de colheita das amostras de alface e água e o padrão de resistência aos antimicrobianos de isolados de <i>E. coli</i>	31
Tabela 6: Pontos de colheita das amostras de água e alface e o padrão de resistência aos antimicrobianos de isolados de <i>K. pneumoniae</i>	34

Índice de figuras

Figura 1: Alface (<i>Lactuca sativa</i>).....	6
Figura 2: Mapa do vale de Infulene.	16
Figura 3: Fluxograma dos procedimentos laboratoriais.	21
Figura 4: Placa contendo colónias suspeitas de <i>E. coli</i> (cor púrpura) e <i>Klebsiella pneumoniae</i> (azuis) em meio ágar cromogénico.	22
Figura 5: Placas contendo crescimento de culturas sugestivas de <i>K. pneumoniae</i> (5A) e <i>E. coli</i> (5B) em ágar MacConkey.	23
Figura 6: Placas contendo culturas de <i>E. coli</i> em meio Agar Brilliance <i>E. coli</i> selective (A) e <i>Klebsiella</i> spp. em meio Agar <i>Klebsiella</i> selective (B).	24
Figura 7: Galerias de API 20E, com características bioquímicas confirmativas da espécie <i>Klebsiella pneumoniae</i>	24
Figura 8: Frequência dos participantes do estudo em função da idade.	27
Figura 9: Perfil de susceptibilidade aos antibióticos de <i>E. coli</i> isolada em amostras de água proveniente do Vale de Infulene.	29
Figura 10: Perfil de susceptibilidade aos antibióticos de <i>E. coli</i> isoladas em amostras de alface no Vale de Infulene.	30
Figura 11: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de <i>K. pneumoniae</i> isolada em amostras de água proveniente do vale de Infulene.	32
Figura 12: Perfil de susceptibilidade aos antibióticos de <i>K. pneumoniae</i> isolada em amostras de alface proveniente do Vale de Infulene.	33

Lista de Abreviaturas

AK	Amicacina
AM	Ampicilina
AMC	Amoxicilina-ácido clavulânico
API 20E	Índice de Perfil Analítico 20E
AZM-	Aztreonam
BGN	Bactérias Gram-negativas
BGP	Bactérias Gram-positivas
CAZ-	Ceftazidima
CDM	Cervejas de Moçambique
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CRO	Ceftriaxona
CS	Citrato de Simmons
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Betalactamases de espectro estendido
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
FEP	Cefepime
GM	Gentamicina
HCM	Hospital Central de Maputo
IMI	Imipenem
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LA-FENG	Laboratório de água da Faculdade de Engenharia

LB	Caldo Luria Bertani
LM-FAMED	Laboratório de microbiologia da Faculdade de Medicina
MAC	Ágar MacConkey
MDR	Multidroga-resistente
MHA	Ágar Müeller-Hinton
MEM	Meropenem
OMS	Organização Mundial de Saúde
RAM	Resistência antimicrobiana
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TE	Tetraciclina
TSA	Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

Unidades de Medida

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius ou centígrado
h	Hora
min	Minuto
mL	Mililitro
s	Segundo
µL	Microlitro

1. Introdução

As bactérias Gram-negativas constituem parte da microbiota intestinal normal de humanos e animais, entretanto possuem grande diversidade morfológica e metabólica permitindo a sua permanência no meio ambiente e desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (Ribeiro, 2016; Ferreira, 2018).

A resistência bacteriana é um problema crítico de saúde pública global, tendo sido definida como questão prioritária pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Nos hospitais, espécies bacterianas resistentes surgem como consequência do uso inapropriado de antibióticos e considerando que nestes locais, a terapia antimicrobiana é usada de forma rotineira, a seleção de cepas resistentes bem como a sua propagação é feita com mais facilidade (Vieira & Vieira, 2017), porém espécies bacterianas resistentes aos antimicrobianos não estão restritas a ambientes hospitalares, encontrando-se também disseminadas no meio ambiente (WHO, 2017).

Nos países em vias de desenvolvimento, incluindo os da África subsaariana, os sistemas de esgoto e estações de tratamento de águas residuais na sua maioria não são operacionais contribuindo para a contaminação dos rios. Adicionalmente, a troca horizontal de genes de resistência a antimicrobianos entre bactérias acelera a emergência de estirpes resistentes nas águas (Amoah *et al.*, 2007).

Em Moçambique, devido a problemas do funcionamento das estações de tratamento de águas residuais (ETAR), os efluentes são despejados directamente nos corpos de água, incluindo o rio Infulene causando a sua contaminação (Amoah *et al.*, 2007; Gekenidis *et al.*, 2018; Nhantumbo *et al.*, 2023).

Estudos feitos recentemente na bacia do rio Infulene, identificaram 5 focos de poluição desta, que incluem duas estações de tratamento de águas residuais, um hospital, uma empresa de fabricação de papel e uma fábrica de cerveja (Nhantumbo *et al.*, 2023). Verificou-se ainda que 67% e 27% das amostras de água do rio Infulene foram positivas para coliformes totais e *E. coli*, respectivamente, apresentando maus resultados em termos de qualidade da água (Nhantumbo *et al.*, 2023).

Os produtores de vegetais na baixa do rio Infulene utilizam principalmente a água deste rio para a irrigação de vegetais incluindo alfaces, facto que contribui para a sua

contaminação (Salvador *et al.*, 2016). A água de irrigação é uma das principais fontes de contaminação de produtos vegetais por bactérias, tornando-os veículos de infecção do ser humano principalmente quando consumidos frescos, como é o caso da alface (*Lactuca sativa*) (Gekenidis *et al.*, 2018). A contaminação de vegetais tem sido associada a infecções diarreicas nos agricultores e consumidores (Callejón *et al.*, 2015).

Os estudos sobre bactérias Gram-negativas resistentes incluindo enterobactérias são escassos no continente africano (Banu *et al.*, 2021). Os poucos estudos existentes demonstraram a presença de enterobactérias produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) como a *E. coli* em água potável e águas residuais na República Democrática do Congo e em águas residuais, e ambientes avícolas na Nigéria (Banu *et al.*, 2021). As enterobacteriaceae produtoras ESBL em vegetais, solo e água do ambiente agrícola já foram também reportadas na Tunísia (Said *et al.*, 2015).

Estudos realizados em Gana para avaliar os padrões de resistência a antibióticos de *E. coli* e os respectivos genes de resistência em alface, mostraram prevalência de resistência bacteriana entre 49 e 70%, das quais 82% foram multidroga-resistentes (MDR) (Quarcoo *et al.*, 2022).

Em Moçambique, as bactérias Gram-negativas, nomeadamente: *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Vibrio cholerae* são os principais motivos de preocupação em surtos de infecções causadas por água e alimentos (GARP, 2015). Recentemente foram registados surtos de cólera nas regiões Centro e Norte de Moçambique (INS, 2023). Um estudo realizado para determinar o risco de disseminação de *Enterobacteriaceae* resistentes a antibióticos através de *L. sativa* e *Allium fistulosum* L. do vale do Infulene, revelou alta frequência de *Klebsiella oxytoca* (21,1%), *Proteus vulgaris* (19,3%) e *Enterobacter cloacae* (12,3%), com altas taxas de resistência à amoxicilina-clavulanato (98,2%) e com perfil de multirresistência em 35,1%, evidenciando a necessidade de contínua vigilância (Salvador *et al.*, 2016).

O uso de dejectos de aves e bovinos como fertilizantes do solo no cultivo da alface é uma prática comum em África e estudos indicam a presença de *E. coli* em ambientes avícolas e de criação de gado (Aworh *et al.*, 2020). O desenvolvimento da alface próxima ao solo contribui para o contacto da folha comestível com os dejectos, aumentando o risco de contaminação por bactérias resistentes, tornando esta cultura importante para a vigilância de estirpes bacterianas resistentes (Amoah *et al.*, 2007).

Os antimicrobianos são também frequentemente usados para prevenção ou tratamento de infecções bacterianas na medicina veterinária, e são ainda adicionados às rações animais como promotores de crescimento, aumentando a eficácia alimentar (Normanno *et al.*, 2007). O uso de antimicrobianos em animais tem contribuído para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana em humanos, visto que muitos antibióticos usados em animais também são empregados em seres humanos para o tratamento de infecções, propiciando falhas terapêuticas, devido à transferência de bactérias resistentes ao longo da cadeia alimentar (Souza *et al.*, 2022).

No presente estudo pretendeu-se avaliar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isolada em amostras de alface (*Lactuca sativa*) e água do vale de Infulene.

1.1. Problema

O uso de esterco animal, água de irrigação contaminada e saúde e higiene dos trabalhadores na produção de vegetais como alface são reconhecidas como fontes de contaminação dos produtos vegetais por patógenos potencialmente resistentes (EFSA, 2014; Antwi-agyei & Ensink, 2016). O facto destes vegetais não serem submetidos a nenhuma inativação microbiana, como pasteurização da superfície ou cozimento, torna-os uma importante rota de transmissão para patógenos transmitidos por alimentos (EFSA, 2014).

A resistência aos antimicrobianos vem se tornando de forma crescente uma preocupação global de saúde pública, ocasionando milhões de mortes devido a infecções resistentes a medicamentos todos os anos (WHO, 2017; ONU, 2022). Cerca de 700.000 mortes associadas à resistência antimicrobiana são registadas anualmente, com possibilidade de que até 2050, esse número se acresça a dez milhões ao ano, pela resistência antimicrobiana (ONU, 2022).

A emergência de bactérias Gram-negativas resistentes como *E. coli* e *K. pneumoniae* em vegetais é associada ao uso de descargas poluídas para a irrigação e estrume de animais como fertilizantes (Mesbah *et al.*, 2017).

Os estudos anteriores realizados no vale de Infulene incluindo amostras de alfaces reportaram a presença de *E. coli* e *Klebsiella oxytoca* multirresistentes em alface, (João

et al., 2021, Salvador *et al.*, 2016) e elevada quantidade de *E. coli* em águas utilizadas para vários fins no vale de Infulene (Nhantumbo *et al.*, 2023), mostrando na necessidade de estudos contínuos.

Contudo, estudos de vigilância de resistência bacteriana em alimentos e água são escassos no país, dificultando o controlo de infecções resistentes, pelo que surge a seguinte questão: **Qual é o perfil de susceptibilidade de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de amostras de alface e água no vale do Infulene?**

1.2. Justificativa

O conhecimento sobre o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *E. coli* e *K. pneumoniae* em amostras de alface (*Lactuca sativa*) e água provenientes do vale do Infulene, cidade da Matola, contribui para o controlo efectivo de infecções. A exposição e o consumo de vegetais frescos como alface, cebolinha e tomate, bem como água contaminados por bactérias patogénicas pode colocar o produtor e o consumidor em risco de doenças (Callejón *et al.*, 2015; Salvador *et al.*, 2016).

Adicionalmente, os surtos que possam advir de patógenos como *E. coli* e *K. pneumoniae* resistentes, associados à falta de medicamentos eficazes podem causar crises sérias à saúde nacional, prejudicando principalmente os seres humanos (Salvador *et al.*, 2016). Estas bactérias patogénicas podem ser difíceis de tratar, o que mostra a necessidade de vigilância para melhor orientação do tratamento e controlo (Callejón *et al.*, 2015; Gekenidis *et al.*, 2018).

Este estudo é importante, porque fornecerá dados actualizados sobre o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de estirpes *E. coli* e *K. pneumoniae* circulantes no vale do Infulene contribuindo para o controlo das fontes de contaminação e das resistências.

2. Objectivos

2.1. Geral

Avaliar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos de *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas em amostras de alface (*Lactuca sativa*) e água no vale do Infulene, cidade da Matola.

2.2. Específicos

- ❖ Identificar os dados sociodemográficos dos camponeses e o tipo de estrume usado para fertilização das machambas na baixa de Infulene;
- ❖ Identificar os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* em amostras de alface e água;
- ❖ Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*;
- ❖ Comparar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*.

3. Hipóteses

Predição: Estudos realizados incluindo alface (*Lactuca sativa*) no vale de Infulene reportaram a presença de *E. coli* multirresistentes em alface, (João *et al.*, 2021, Salvador *et al.*, 2016). Desta forma consideram-se as seguintes hipóteses:

Hipótese Nula

As bactérias *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas em amostras de alface e água não apresentam frequências elevadas de resistência aos antibióticos comumente usados para o tratamento de infecções humanas.

Hipótese Alternativa

Os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas em amostras de alface e água apresentam frequências elevadas de resistência aos antibióticos comumente usados para o tratamento de infecções humanas.

4. Revisão de literatura

4.1. Importância da Água e Alface para a saúde humana

A água é um recurso essencial na natureza, e o seu acesso como fonte de vida para os seres humanos e sobrevivência do planeta tem sido reconhecido como direito humano universal (UN, 2010), devendo ser garantida de forma segura e sustentável a todos (WHO, 2018).

Do total da água existente, somente 0,8% corresponde a água doce disponível para ser utilizada pelo homem. Destacam-se entre as principais fontes de água utilizada pela população, os rios, lagos e lençóis subterrâneos que são fundamentais para o desenvolvimento de actividades domésticas, industriais, abastecimento de água potável, agricultura e outros fins (Okafor, 2011).

A água é bastante utilizada na agricultura para irrigação de vegetais como a alface (*Lactuca sativa*), um vegetal herbáceo, folhoso, anual, pertencente à família *Asteraceae* (*Compositae*) de origem asiática (Hasan *et al.*, 2017; Célio *et al.*, 2021). Sendo um dos vegetais mais procurado em todo mundo para o preparo de saladas para o consumo, principalmente ainda fresco (Islam *et al.*, 2021). A alface apresenta grande valor nutritivo e propriedades medicinais sendo uma rica fonte de vitamina A e minerais como cálcio, ferro, magnésio, potássio e sódio e apresenta ainda propriedades anti-inflamatórias, sedativas, diuréticas, expectorantes, antidiabéticas, redutoras do colesterol, reduzindo o peso corporal e o risco de doenças cardiovasculares, promovendo a saúde cerebral (Yakoot *et al.* 2011).



Figura 1: Alface (*Lactuca sativa*).

Fonte: Autora.

4.2. Água e Alface como veículos de patógenos resistentes

Com aumento da globalização e o crescente aumento da população, a fonte de água vem sofrendo com os efeitos da poluição causados pela actividade antrópica (UNESCO, 2017). Devido a grande quantidade de poluentes introduzida nos corpos de água, a capacidade de auto-depuração por meio de mecanismos físico-químicos e biológicos mostrou-se ineficiente, tornando este, um grande problema global principalmente pelas suas consequências na saúde e sobrevivência dos seres vivos, incluindo o homem (Omole & Longe, 2008).

O habitat aquático, principalmente da água doce, está entre os habitats que abrigam a mais rica diversidade de bactérias na terra (Sieber *et al.*, 2020) e um importante meio de disseminação de microorganismos resistentes aos antimicrobianos entre populações humana, animal e vegetal, assim como a via pela qual os genes que conferem resistência são introduzidos no ecossistema de bactérias naturais, modificando a microbiota ambiental e possibilitando desta forma o surgimento de estirpes multirresistentes (Amarasiri *et al.*, 2019; Resende *et al.*, 2020).

As principais origens da contaminação microbiana dos recursos aquáticos naturais são descargas de estações de tratamento de água residuais, hospitais e indústrias, consideradas como fontes pontuais resultantes da acção antrópica (Amoah, *et al.*, 2007; Nhantumbo *et al.*, 2023). Águas residuais usualmente contêm bactérias entéricas patogênicas (WHO, 2018; Decol, 2018) que abrigam genes de resistência a antibióticos, inseridos por elementos genéticos móveis, que se propagam entre as comunidades bacterianas da água e solo (Sultan *et al.*, 2018), favorecendo a ocorrência de doenças de origem hídrica (Resende *et al.*, 2020).

Essa água é utilizada para irrigação de vegetais que incluem a alface, um dos vegetais cultivados em quase todo o mundo (Hasan *et al.*, 2017), que apesar do seu extenso valor nutricional, pode estar associada a riscos de transmissão de infecções resistentes inerentes á saúde humana (Holvoet *et al.*, 2013).

Em várias regiões de África, o estrume de aves é utilizado para promover o crescimento de vegetais como alface e, estudos demonstram que este pode conter resíduos de antibióticos que podem favorecer algumas bactérias patogênicas presentes (Holvoet *et al.*, 2013; Martins, 2021). A alface sendo uma cultura que cresce próxima ao solo,

podendo entrar em contacto com bactérias do solo e associado ao uso de águas de irrigação contaminadas por excrementos humanos ou animais e outros factores da cadeia de produção como a colheita, transporte e venda, pode tornar-se um veículo importante na transmissão de patógenos potencialmente resistentes (Amponsah-Doku *et al.*, 2010; Appau & Ofori, 2024).

Outro agravante, deve-se ao facto de alface ser um alimento consumido *in natura*, não passando por nenhum processo de inactivação microbiana, o que aumenta o risco de transmissão de potenciais patógenos resistentes ao longo da cadeia alimentar (Holvoet *et al.*, 2013).

Globalmente, cerca de 2,720 casos de doenças gastrointestinais são registados em cada 100 mil pessoas por ano, com maior ênfase nos países de baixa e média renda incluindo Moçambique (Lee *et al.*, 2023). A informação sobre infecções transmitidas por meio da água e alimentos é relativamente escassa em Moçambique, contudo, doenças diarreicas contribuem significativamente para a morbimortalidade, especialmente entre crianças menores de 5 anos (Chissaque *et al.*, 2018).

4.3. Bactérias Gram-negativas associadas a infecções veiculadas pela água e alface

As bactérias de Gram-negativas (BGN) estão relacionadas a um dos maiores problemas de saúde pública, devido à elevada disseminação de resistência aos antibióticos entre bactérias da mesma ou diferente espécie. Estas bactérias têm uma parede celular característica que apresenta uma membrana externa que serve de proteção, contendo lipopolissacarídeos que se encontram ligados ao lado externo da membrana, fosfolípidos conferindo a sua integridade, e proteínas da membrana externa. Segue-se uma camada fina de peptidoglicano que determina o formato celular e por fim, a camada da membrana interna, constituída por uma bicamada fosfolipídica responsável por diversos processos multifuncionais, como estrutura, transporte e biossíntese (Oliveira & Reysgaert, 2024).

As bactérias Gram-negativas estão divididas em sua maioria, entre as *Enterobacteriaceae* e bacilos não fermentadores. As espécies da família *Enterobacteriaceae* são microorganismos ubíquos encontrados no solo, na água e na

vegetação, não formadoras de esporos, anaeróbios facultativos, e capazes de fermentar açúcares, para além de serem importantes indicadores de higiene na cadeia alimentar (Ye *et al.*, 2018).

Geralmente fazem parte da microbiota normal da maioria dos animais incluindo o homem, porém, são também comumente associadas a infecções do trato urinário, gastrointestinal, bacteriemia, pneumonias, entre outras doenças, entre as quais se destacam a *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Martins, 2021).

Os bacilos não fermentadores apresentam também representantes ubíquos, entretanto, as infecções causadas por este grupo são na sua maioria de carácter oportunista e os seus representantes incluem o género *Pseudomonas* e *Acinetobacter* (Oliveira & Reygaert, 2024).

Entre as principais bactérias Gram-negativas que podem estar associadas a doenças de veiculação hídrica e alimentos encontram-se a *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* e *Klebsiella pneumoniae* (Pinto, 1996).

4.3.1. *Escherichia coli*

E. coli é um microorganismo Gram-negativo, em forma de bastonete, com presença de flagelos peritríquios, reduz nitrato a nitrito, fermenta glicose e é oxidase-negativa. Metaboliza uma ampla variedade de substâncias como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lípidos e ácidos orgânicos, produz catalase, utiliza glicose, amônia e nitrogênio como fontes de carbono, com temperatura óptima de crescimento a 37 °C, apresenta actividade das enzimas β -galactosidase e β -glucoronidase (Croxen *et al.*, 2013).

É globalmente considerado como principal indicador de contaminação fecal por ser um microorganismo integrante do trato gastrointestinal de homens e animais, sendo considerado o mais específico entre os coliformes termotolerantes (Health Canada, 2012; WHO, 2018). A *E. coli* é a principal causadora de doenças diarreicas ocasionadas pela ingestão de água e alimentos contaminados além de ser também associada frequentemente a diversas patologias intestinais e extra-intestinais, como infecções do trato urinário (ITU), bacteremia, pneumonia e meningite (Hu *et al.*, 2013).

4.3.2. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) é uma bactéria Gram-negativa, imóvel, aeróbica facultativa, geralmente encapsulada em forma de bastonete, não formadora de esporos, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, catalase e citrato positiva, oxidase e indol negativa. Apresenta colónias geralmente mucóides, de cor creme a rosada em Ágar MacConkey, com bordas irregulares e elevadas, com temperatura óptima de crescimento a 37 °C (Aly *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2022). É omnipresente, habitando ecossistemas do solo, água e esgoto, ademais é encontrado também como parte da microflora natural em diversos locais do ser humano, incluindo pele, nariz, garganta e trato intestinal (Gomez-Simmonds & Uhlemann, 2017).

A *K. pneumoniae* é parte do complexo de espécies que incluem também a *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *Quasipneumoniae* e *similipneumoniae*, sendo estas comumente associadas a infecções humanas, como pneumonia, infecções do trato urinário, infecções de tecidos moles e feridas, septicemia e abscessos hepáticos piogénicos (Wyres *et al.*, 2020; Dabrowska *et al.*, 2023).

A *K. pneumoniae* foi classificada como um dos organismos ESKAPE, que são patógenos clínicos altamente virulentos e resistentes a antimicrobianos sendo responsável por uma taxa de isolamento de aproximadamente 85% (Dong *et al.*, 2022). São patógenos frequentemente associados a infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos e pacientes hospitalizados por períodos prolongados (Massinga *et al.*, 2021) e habitualmente implicados em infecções nosocomiais do trato urinário e sepsis em lactentes da África subsaariana (Lochan *et al.*, 2017; Massinga *et al.*, 2021).

4.3.3. *Salmonella* spp.

São bactérias gram-negativas pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, comumente móveis, com flagelos peritríquios, anaeróbias facultativas e não esporuladas. São oxidase negativa, catalase positiva, utilizam citrato como única fonte de carbono, fermentam glicose produzindo ácido e gás, porém são incapazes de metabolizar a lactose e sacarose (Pui *et al.*, 2011). É um género composto por duas espécies, a *S. enterica* e *S. bongori*, sendo que a maioria dos sorovares responsáveis por causar doenças no homem e animais está relacionada a espécie *S. entérica* (Pui *et al.*, 2011).

Em seres humanos a *Salmonella* spp. é responsável por originar a febre tifóide, causada pela serovar *S. typhi*, doença bacteriana aguda de gravidade variável, transmitida pela água e alimentos contaminados com material fecal. O seu quadro clínico é caracterizado por septicemia, febre alta, vômitos, diarreia, letargia, dores abdominais com uma taxa de letalidade de 10% (Jay, 2005; Pui *et al.*, 2011). Causa também a febre paratifóide (agente etiológico *S. paratyphi*) semelhante a febre tifóide, porém com sintomas mais brandos e ainda causa outras salmoneloses que incluem gastroenterites e enterocolites causadas por outras espécies de *Salmonella* (Jay, 2005),

4.3.4. *Shigella* spp.

As bactérias do género *Shigella* são microorganismos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, não formadores de esporos, imóveis, aeróbios facultativos, fermentam a glicose com produção de ácido, geralmente sem gás, sem cápsula, com excepção da *S. flexneri* e *S. boydii*, não hidrolisam ureia, não produzem gás sulfídrico, não descarboxilam a lisina e não utilizam citrato nem acetato de sódio como única fonte de carbono (Cunha *et al.*, 2017). Inclui quatro espécies, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei*, sendo que a *S. sonnei* e *S. boydii* estão mais relacionadas às enfermidades mais brandas, a *S. flexneri* mais comum em países de baixa e média renda e a *S. dysenteriae* estão relacionadas à forma mais grave da doença (Cunha *et al.*, 2017).

Seu único reservatório é o ser humano, podendo crescer em temperaturas entre 10°C e 48°C e pH ideal de 6 a 8. Não são afectadas pela acidez do estômago, proliferam-se no intestino delgado e causam lesões no intestino grosso, destruindo o tecido da mucosa intestinal e causando diarreia intensa com sangue e muco. Os principais sintomas incluem cólicas abdominais, febre e diarreia, podendo ter até 20 evacuações por dia (Tortora, Funke & Case, 2012).

A *Shigella* é frequentemente disseminada pelo contacto directo pessoa-pessoa, por transmissão fecal-oral ou indirectamente, pelo consumo de alimentos ou água contaminados (Cunha *et al.*, 2017).

4.3.5. *Vibrio cholerae*

O *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) é um bastonete Gram-negativo recto, curvo ou levemente curvo pertencente a família *Vibrionaceae*, móvel por meio de flagelo polar, aeróbio ou anaeróbio facultativo, não formador de esporos, oxidase positivo, fermenta glicose, sacarose e manitol. É autóctone do ambiente aquático habitando em águas do mar, rios,

esgotos assim como superfície e intestino de animais, e infecta os seres humanos através da água e alimentos contaminados (Das *et al.*, 2020).

É o principal agente causador da cólera, doença endêmica em países africanos e asiáticos, causando um quadro clínico caracterizado por diarreia aquosa profusa e vômitos, gerando um quadro de desidratação, que pode elevar a gravidade da doença. Até o momento, mais de 200 sorogrupos de *V. cholerae* foram reconhecidos, no entanto, apenas os sorogrupos O1 e O139 estão associados a epidemias e a cólera pandêmica em seres humanos (Bahia, 2011).

Em Moçambique, a cólera é sazonal com aumento de casos durante o período quente e chuvoso especialmente nas regiões centro e norte. A incidência anual varia de 0 a 211 por 100000 habitantes, com taxa de letalidade entre 0.2% e 4.3%, constituindo um problema de saúde pública (INS, 2023).

4.4. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

A resistência antimicrobiana (RAM) é uma questão de saúde pública, complexa, ampla e multissetorial que requer a colaboração e o empenho de todos países envolvidos nos diferentes níveis, globais, nacionais e regionais. Mundialmente, estima-se que a RAM causa 700.000 mortes por ano (WHO, 2017). A Organização Mundial da Saúde (OMS), define a RAM como a capacidade que os microrganismos possuem de sobreviver ou alterarem-se quando expostos a acção dos antimicrobianos, tornando-se ineficazes a esses microorganismos (WHO, 2017; MISAU & MASA, 2019).

A resistência aos antimicrobianos, deriva de um processo intrínseco ou extrínseco. A resistência intrínseca ou natural resulta da capacidade inata das bactérias em associação às características estruturais ou funcionais inerentes ao microrganismo, que se opõem à acção do antibiótico, resultando assim na sua ineficácia (Blair *et al.*, 2015; Reygaert, 2018).

A resistência antimicrobiana, resulta especialmente também da permeabilidade da membrana externa da bactéria, particularmente nas bactérias gram negativas incluindo *E. coli* e *K. pneumoniae*, da produção de enzimas que degradam antibióticos e também da actividade natural das bombas de efluxo e está presente em todos os elementos de uma

espécie ou género através transmissão vertical como herança cromossómica (Machado *et al.*, 2019).

A resistência adquirida pode ser temporária ou permanente. Está presente apenas em alguns isolados de uma espécie, como resultado de mutações no ácido desoxirribonucleico (ADN) cromossómico da bactéria, ou através da aquisição de material genético exógeno (como plasmídeos e transposões), pela transferência horizontal de genes (THG) (Pang *et al.*, 2019; Martins, 2021).

Globalmente, só no ano de 2019, cerca de 4,95 milhões de pessoas morreram em decorrência de infecções resistentes aos medicamentos e RAM causou directamente 1,27 milhões dessas mortes das quais uma em cada 5 dessas mortes ocorreu entre crianças menores de 5 anos (WHO, 2022).

Em África, a ocorrência de RAM está aumentando com grande impacto, tornando-se mais evidente com aumento das infecções associadas aos cuidados de saúde (Fraser *et al.*, 2021; WHO, 2022). Esta preocupação ascendente é agravada por sistemas de saúde pública e animal fracos e fragmentados por toda a região e uma elevada carga de doenças infecciosas (Fraser *et al.*, 2021).

Estudos anteriores feitos em Moçambique demonstraram que só no ano de 2019 houve cerca de 7800 mortes atribuídas a RAM, adicionalmente, mais de 31000 mortes foram associadas a RAM (WHO, 2022).

As bactérias Gram-negativas, incluindo a *E. coli* e *K. pneumoniae*, têm a capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos através de vários mecanismos, dentre os quais se destacam a inativação enzimática do antimicrobiano, modificação do sítio alvo do antibiótico, bombas de efluxo e alteração da permeabilidade da membrana (Blair *et al.*, 2015; Costa, 2016).

4.4.1. Inativação enzimática do antibiótico

O mecanismo enzimático de resistência ocorre por conta inativação do fármaco a partir da produção de enzimas que degradam ou inactivam o antibiótico, pela bactéria, envolvendo três tipos de reacções enzimáticas, tais como, hidrólise, transferência de um grupo químico ou processo de oxi-redução (Costa, 2016).

A título de exemplo deste mecanismo de resistência encontra-se a produção de β -lactamases que hidrolisam o anel β -lactâmico das penicilinas (Kumar e Varela, 2013) e cefalosporinas, inibindo a acção desses antibióticos (Horner, 2008). A produção de β -lactamases constitui o principal mecanismo de resistência das BGN aos antimicrobianos β -lactâmicos, causando resistência através da clivagem da estrutura do anel β -lactâmicos, desactivando a propriedade antibiótica da molécula (Costa, 2016; Martins, 2021).

4.4.2. Modificação do alvo do antibiótico

A maioria dos antibióticos possui alta afinidade e especificidade aos seus sítios alvos na célula bacteriana, factor crucial para alcançarem o efeito desejado na bactéria. Entretanto mudanças estruturais do alvo que inibem a ligação efectiva entre o alvo e o antibiótico, afectam a eficácia do fármaco, conferindo resistência (Wilson, 2014; Blair *et al.*, 2015).

Um exemplo clássico, é a resistência das BGN à polimixina, que é conferida pela alteração da estrutura dos lipopolissacarídeos (LPS) da membrana bacteriana, na qual os lípidos A apresentam grupos fosfatos modificados, alterando a afinidade da polimixina aos LPS (Nogueira *et al.*, 2016; Costa, 2019).

4.4.3. Bombas de efluxo

Bombas de efluxo são proteínas membranares através das quais a resistência é expressa por meio de um efluxo que consiste no bombeamento activo de antimicrobianos do meio intracelular para o meio extracelular, mantendo as concentrações intracelulares em baixos níveis (Nikaido & Pagès, 2012; Costa & Júnior, 2017).

São consideradas os principais contribuintes para a resistência intrínseca das BGN. Sendo este um mecanismo de resistência que afecta todas as classes de antibióticos, atingindo principalmente os macrolídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas (Dzidic *et al.*, 2008; Costa, 2019).

4.4.4. Alteração da permeabilidade da membrana

Os fármacos podem penetrar a membrana celular por meio de três formas: por difusão simples através da bicamada fosfolipídica, por difusão facilitada mediada por proteínas membranares chamadas porinas ou *self promoted uptake*, onde a penetração do fármaco

nas bactérias depende de características físico-químicas dos antibióticos como a polaridade e o tamanho das moléculas (Baptista, 2013).

A permeabilidade do fármaco sobre a membrana da bactéria é fundamental para que o efeito bacteriostático ou bactericida seja efectivado. A modificação da permeabilidade da membrana constitui um dos mecanismos de resistência à entrada de substâncias tóxicas para o meio intracelular (Caumo *et al.*, 2010).

As BGN são naturalmente menos permeáveis a muitos antibióticos devido à presença da protecção adicional possibilitada pela membrana externa que desempenha a função de barreira física à entrada de moléculas no interior da célula, podendo limitar a entrada do antibiótico. Enquanto que em BGP, a ausência da membrana externa contribui para a sensibilidade a muitos antimicrobianos (Epan, 2016).

5. Área de estudo

O estudo foi realizado no rio Infulene, que é uma pequena bacia hidrográfica nacional de regime de escoamento permanente. O rio Infulene situa-se na província de Maputo e faz fronteira com os municípios de Maputo e Matola (Chibatão, 2012; Langa, 2022). Corre na direcção norte-sul da província de Maputo, desagua no estuário Espírito Santo, que é um braço-de-mar na margem ocidental da baía de Maputo (ARA-SUL, 2008).

O rio Infulene tem uma área total de 180 km² e abarca o rio Mulaúze, que tem aproximadamente 20 km. Os limites da bacia são o Distrito de Marracuene a norte, a Baía de Maputo a sul, a Cidade de Maputo a leste e a Cidade da Matola a oeste situando-se entre os paralelos de 25° 43'32" S e 25°58'4" S e entre os meridianos 32°31'26" E e 32°37'24" E (Langa, 2022).

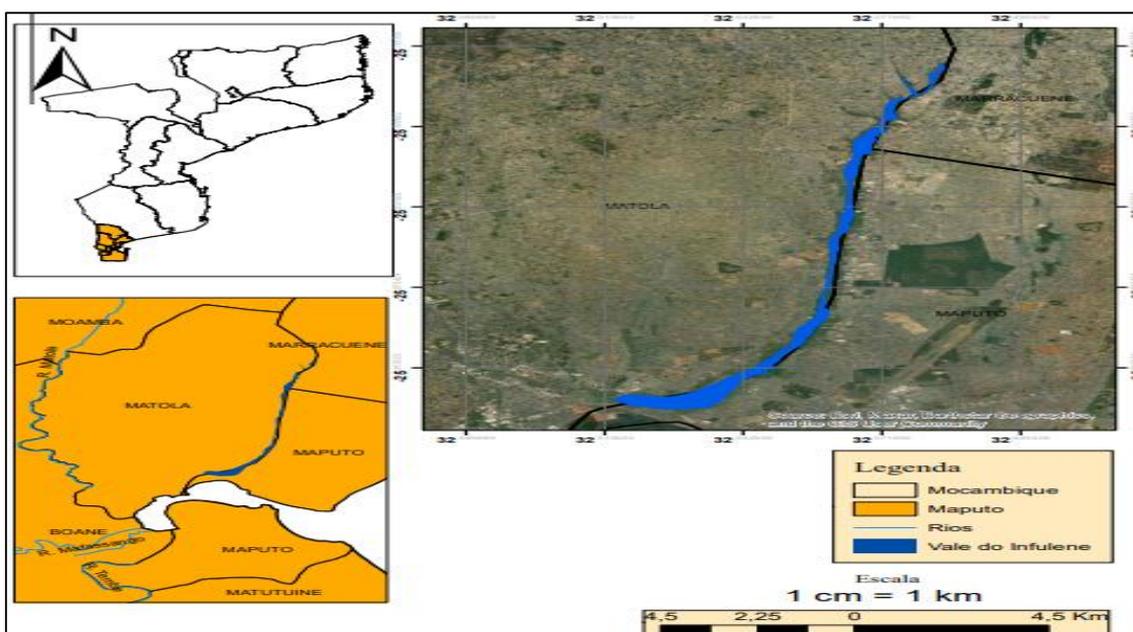


Figura 2: Mapa do vale de Infulene.
Fonte: ArcGIS, 2023.

O clima de Infulene apresenta uma estação chuvosa (Outubro a Março) e uma estação seca (Abril a Setembro), onde a precipitação anual varia de 400 a 1000 mm. A temperatura média anual varia de 22 °C a 29 °C e a humidade média relativa do ar varia entre 67,3% e 80,5% ao ano (Instituto Nacional de Estatística- INE, 2020).

Na bacia de Infulene existe uma grande influência de águas residuais de indústrias e da ETAR. A principal origem da água é a infiltração de encostas arenosas, sendo bastante

explorada pelo sector familiar, privado e cooperativo nas chamadas zonas verdes da cidade de Maputo, para irrigação de hortifruticulturas, principalmente pelo método de valas de regulação do lençol freático (Chibatão, 2012).

6. Metodologia

6.1. Tipo de estudo

O presente estudo é descritivo transversal de carácter prospectivo, no qual foram colhidas amostras de alface (*Lactuca sativa*) e água no Vale de Infulene, no período de Maio a Novembro de 2023.

6.2. Amostragem

A amostragem foi não probabilística por conveniência, por meio de selecção de agricultores produtores de alface no vale de Infulene nos pontos seleccionados para a colheita das amostras de alface e água. Catorze (14) pontos de amostragem foram seleccionados para a colheita de alface e nove (9) pontos colheita de amostras de água (tabela 1).

As amostras de alface foram colhidas directamente da machamba, acondicionadas em sacos de ziplock e transportadas para o laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina (LM-FAMED) para isolamento de bactérias, identificação e antibiograma dos isolados.

Por sua vez, as amostras de água foram colhidas em duplicado e armazenadas em recipientes plásticos estéreis de 500 mL, de seguida refrigeradas em caixa isotérmica e transportadas para o laboratório de água da Faculdade de Engenharia (LA-FENG) para filtração e o isolamento inicial. Posteriormente as placas com isolados suspeitos de *E. coli* e *K. pneumoniae*, foram transportadas em caixa isotérmica para o laboratório de água da faculdade de Medicina para testes de identificação e antibiograma dos isolados.

Tabela 1: Pontos de colheita de amostras de água e alface.

Pontos de colheita de água	Pontos de colheita de alface	Descrição dos pontos de colheita de água e alface
1	1	Depois da ponte a jusante do rio
2	3	Mistura entre canal da vala da CDM, águas residuais e água do rio
3	5	Mistura da água da CDM e águas residuais
	6	
4		Água do canal da CDM
5	8	Canal da vala de drenagem
	9	Na vala de drenagem

6	10	No rio, antes de atravessar a Estrada (Av. Eduardo Mondlane) vindo da nascente
7	12	Mistura da água residuais da vala de drenagem e água do Rio (Zimpeto)
8	13	Água residuais da vala de drenagem (Zimpeto)
9	14	Água do rio, próximo a nascente (Entrada do Intaka)

6.3. Critérios de inclusão

Neste estudo foram incluídas, amostras de alface (frescas, verde-escura, retiradas directamente da machamba) e amostras de água colhidas ao longo do vale de Infulene em pontos previamente identificados.

6.4. Critérios de exclusão

Não foram incluídas amostras de alface com características organolépticas não satisfatórias como: áreas escuras, buracos e queimaduras e amostras de água de pontos não seleccionados.

6.5. Variáveis do estudo

Constituíram variáveis deste estudo duas categorias: sóciodemográficas (sexo, idade, tipo de estrume e tipo de amostra), espécie bacteriana: *E. coli* ou *K. pneumoniae* e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos (sensível, intermediário ou resistente).

6.6. Materiais

Os materiais necessários para o estudo, incluindo instrumentos, equipamentos, reagentes são apresentados na Tabela 3. Os materiais foram fornecidos pelo Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina e pela Faculdade de Engenharia da UEM.

Tabela 2: Materiais utilizados no presente estudo.

Materiais	Equipamentos	Reagentes e meios de cultura
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tubos Falcon de 15ml e 50ml; ✓ Tubos eppendorf; 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ EPI (Batas, Luvas e máscaras cirúrgicas); 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Água destilada; ✓ Caldo Luria Bertani; ✓ Skim milk; ✓ Ágar MacConkey;

<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ansas bacteriológicas; ✓ Placas de Petri; ✓ Zaragatoas estéreis; ✓ Pipetas de Pasteur; ✓ Marcadores de tinta permanente; ✓ Pinças; ✓ Tubos de ensaio; ✓ Frasco para descarte; ✓ Suporte de tubos; ✓ Caderno; ✓ Caneta. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Congelador a - 80 °C; ✓ Geleira entre 2°C- 8°C; ✓ Estufa bacteriológica; ✓ Cronómetro; ✓ Densitómetro de McFarland; ✓ Bico de Bunsen; ✓ Sacos de Ziplock estéreis; ✓ Vórtex; ✓ Caixa isotérmica; ✓ Cabine de biossegurança. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ágar cromogénico; ✓ Ágar cromogénico <i>Klebsiella</i> selectivo; ✓ Ágar Brilliant <i>E. coli</i> selective; ✓ Ágar Mueller-Hinton; ✓ Discos de antibióticos; ✓ Soro fisiológico (NaCl a 0.9%); ✓ Kit API 20E (galerias, caixas de incubação, reagentes: TDA, JAMES, VP 1+ VP 2, óleo de parafina e ficha de resultados).
--	--	---

6.7. Procedimentos laboratoriais

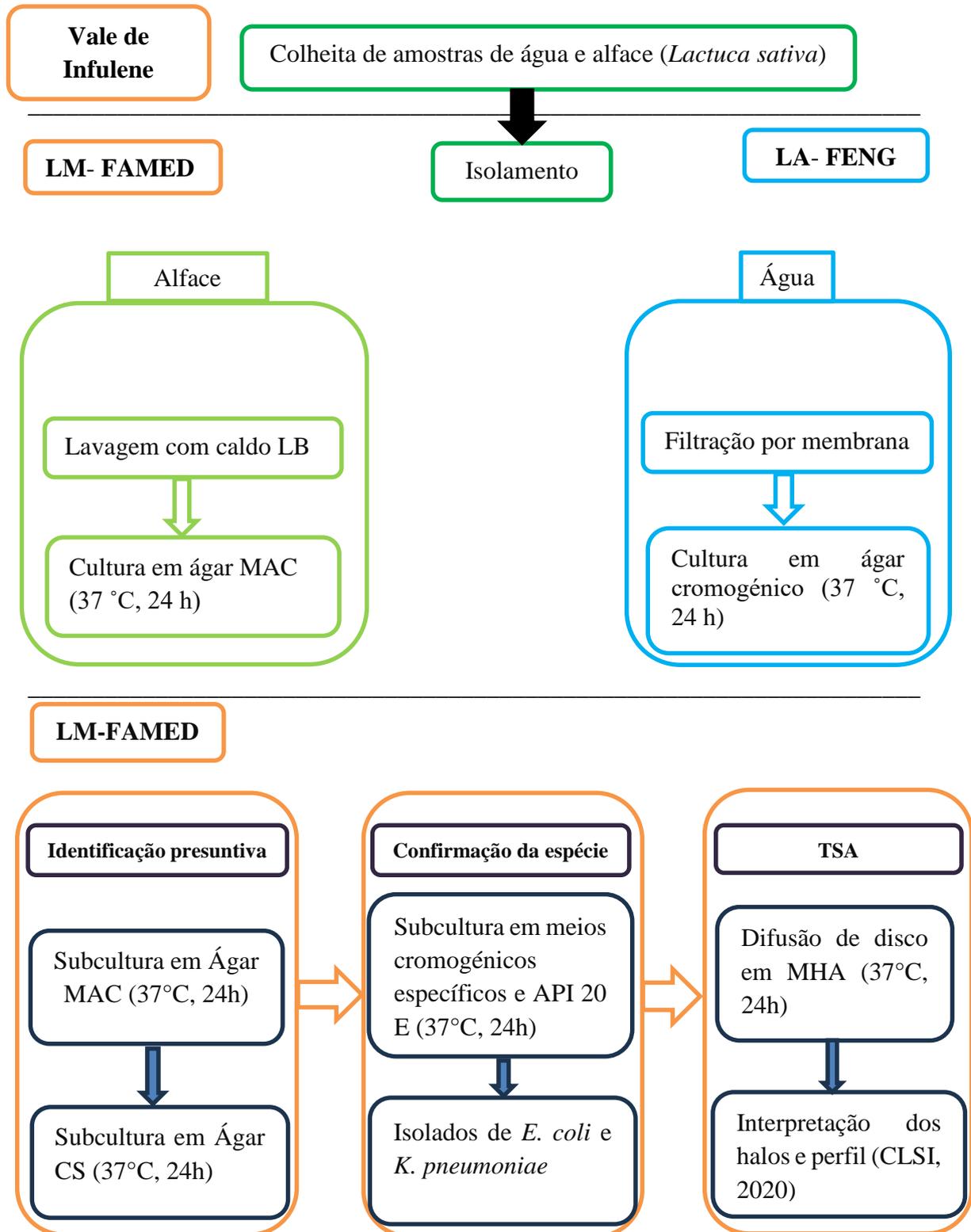


Figura 3: Fluxograma dos procedimentos laboratoriais.

6.8. Análise laboratorial

6.8.1. Isolamento e Identificação bioquímica dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* em amostras de água e alface

6.8.1.1. Amostras de água

As amostras de água foram diluídas em água destilada numa proporção de 1:100 e de seguida filtradas pelo método de filtração por membrana e posteriormente, as membranas foram semeadas em meio ágar cromogénico suplementado e incubadas a 37 °C por 24 horas. O crescimento de colónias com pigmentação púrpura foi considerado sugestivo de *E. coli* e azul metálico, foram sugestivas de *Klebsiella* spp. (Chromagar, 1940) (Figura 4).

Todas colónias sugestivas de *E. coli* e *Klebsiella* spp. foram posteriormente subcultivadas em ágar MacConkey e incubadas a 37 °C por 24 horas. O crescimento de colónias médias, cor rosa avermelhado (fermentação da lactose), formato circular e bordas regulares foram sugestivas de *E. coli* (figura 5B), enquanto que colónias grandes, rosadas (fermentação de lactose) com aspecto mucóide, foram sugestivas de *K. pneumoniae* (figura 5A), (Murray *et al.*, 2009; Aly *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2022), posteriormente as colónias foram subcultivadas em Ágar Citrato de Simmons (metabolismo de citrato como fonte de CO_2), tornando o meio azul no caso de metabolizar o citrato (Holanda *et al.*, 2017).

Todas as colónias puras foram guardadas em 1,5ml de skim milk, conservadas na geleira a -80°C para posterior identificação.



Figura 4: Placa contendo colónias suspeitas de *E. coli* (cor púrpura) e *K. pneumoniae* (azuis) em meio ágar cromogénico.

Fonte: Autora

6.8.1.2. Amostras de alface

Para o isolamento de *E. coli* foi usado o protocolo adaptado de Garcia-Villanova *et al.*, (1987):

- No laboratório, as amostras de alface foram pesadas (100g) assepticamente para posterior diluição. Adicionou-se 100ml de caldo Luria Bertani (LB) ao saco Ziplock contendo o pé de alface, agitou-se manualmente a mistura por um uma hora e deixou-se em repouso à temperatura ambiente por duas horas;
- Fez-se uma diluição de (10^{-1}) das amostras, retirando-se 1mL da solução da mistura e colocou-se em tubos Falcon contendo 9mL do caldo Luria Bertani previamente identificados;
- Da diluição, com auxílio de uma ansa esterilizada, retirou-se 10 μ L da solução e cultivou-se em ágar MacConkey e incubou-se a 37°C por 24 horas;
- O crescimento de colónias médias, cor rosa avermelhado (fermentação da lactose), formato circular e bordas regulares (figura 5B) foi sugestivo de *E. coli*, enquanto que colónias grandes, rosadas (fermentação de lactose) com aspecto mucóide (figura 5A), foram sugestivas de *K. pneumoniae*;
- As colónias sugestivas de *E. coli* e de *K. pneumoniae*, foram subcultivadas em ágar Citrato de Simmons, tornando o meio azul no caso de metabolizar o citrato.
- Todas as colónias puras foram guardadas em 1,5mL de skim milk, conservadas na geleira a -80°C para posterior identificação.

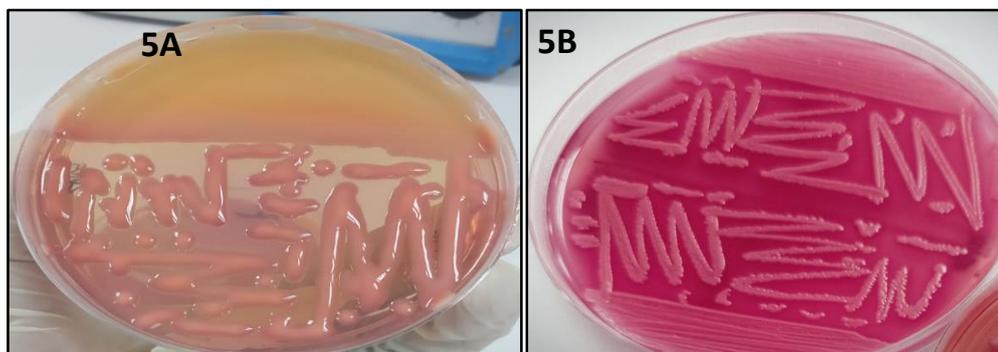


Figura 5: Placas contendo crescimento de culturas sugestivas de *K. pneumoniae* (5A) e *E. coli* (5B) em ágar MacConkey.

Fonte: Autora

6.8.2. Identificação de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* em amostras de água e alface

A confirmação dos isolados foi feita maioritariamente através de meios cromogénicos. O meio Brilliance *E. coli* selective foi usado para confirmação de *E. coli* (colónias púrpuras) (Oxoid, 2023) e o meio *Klebsiella* selective agar (colónias púrpuras e mucóides) para a confirmação do género *Klebsiella* (Figura 6) (Himedia, 2023). O método bioquímico padrão API 20E foi utilizado para a identificação da *K. pneumoniae* (Figura 7).

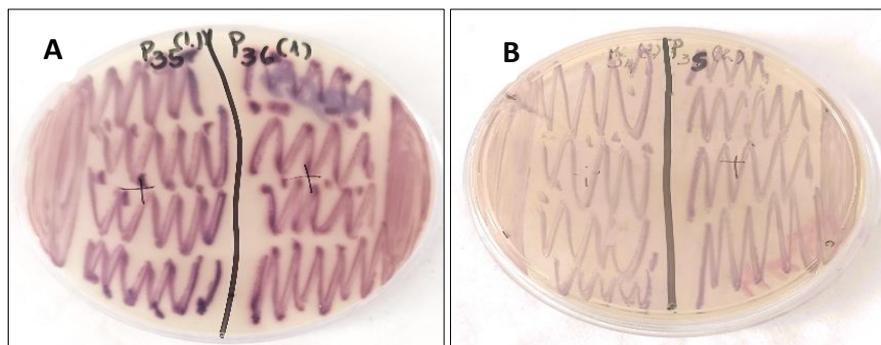


Figura 6: Placas contendo culturas de *E. coli* em meio Agar Brilliance *E. coli* selective (A) e *Klebsiella* spp. em meio Agar *Klebsiella* selective (B).

Fonte: Autora



Figura 7: Galerias de API 20E, com características bioquímicas confirmativas da espécie *K. pneumoniae*.

Fonte: Autora

6.8.3. Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* em amostras de água e alface

O Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA), foi realizado pelo método de disco-difusão de Kirby-Bauer em ágar Müeller-Hinton (Bauer *et al.*, 1996). O teste incluiu 13 antibióticos, listados com as suas respectivas concentrações na Tabela 4 e de acordo com os procedimentos abaixo:

1. Subcultivou-se as colónias conservadas a -80°C em ágar MacConkey, incubadas a 37°C por 24 horas para obtenção de colónias frescas;
2. Com auxílio de uma ansa bacteriológica flambada e arrefecida, transferiu-se uma colónia para um tubo de ensaio contendo 5mL de soro fisiológico, fazendo uma suspensão com turvação 0,5 da escala de McFarland;
3. Com uma zaragatoa estéril saturada na suspensão, o inóculo foi espalhado por toda a superfície do meio ágar Muller-Hinton (MHA) em placa de petri;
4. Distribui-se os discos de antibióticos uniformemente sobre o meio com o auxílio de uma pinça estéril;
5. Incubou-se as placas a 37°C durante 18 a 24 horas.

Os diâmetros das zonas de cada um dos discos de antibióticos foram medidos utilizando um paquímetro e os resultados interpretados com os pontos de corte do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020).

Tabela 3: Antibióticos incluídos para a avaliação do perfil de susceptibilidade dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*.

Antibióticos	Concentração do antibiótico	Classe do antibiótico	Subclasse do antibiótico
Ampicilina	10 µg	Penicilinas	
Amoxicilina-ácido clavulânico	30 µg		
Ceftriaxona	30 µg		Cefalosporina da 3 ^a geração

Ceftazidima	30 µg	Cefens	Cefalosporina da 3 ^a geração
Cefepime	30 µg		Cefalosporina da 4 ^a geração
Meropenem	10 µg	Carbapenêmicos	
Imipenem	10 µg		
Amicacina	30 µg	Aminoglicosídeos	
Gentamicina	10 µg		
Sulfametoxazol-trimetoprim	25 µg	Sulfonamidas	
Tetraciclina	30 µg	Tetraciclinas	
Aztreonam	30 µg	Monobactâmicos	
Ciprofloxacina	5 µg	Quinolonas	Fluoroquinolonas

Fonte: CLSI (2020).

Para o perfil de multirresistência, todos isolados com perfil intermediário foram considerados resistentes. As espécies bacterianas resistentes a três ou mais antibióticos foram considerados como multirresistentes (Magiorakos *et al.*, 2012).

6.9. Análise de dados

Os resultados laboratoriais foram introduzidos no Microsoft Office Excel 2019 e analisados posteriormente no pacote estatístico SPSS versão 20. As distribuições de frequência foram apresentadas em forma de tabelas e gráficos para melhor compreensão.

7. Resultados

7.1. Características sociodemográficas dos participantes do estudo e condições de cultivo de alface no vale de Infulene

No decurso do presente estudo realizado entre Maio e Novembro de 2023, foram entrevistados cerca de 7 agricultores sendo 3 (43%) do sexo feminino e 4 (57%) do sexo masculino, com idades compreendidas entre 21 e 54 anos sendo a maioria na faixa etária de 36 a 60 anos (Figura 6). Do total dos entrevistados, 100% (7/7) usavam serragem de madeira misturada com fezes de galinhas como estrume para a produção de alface.

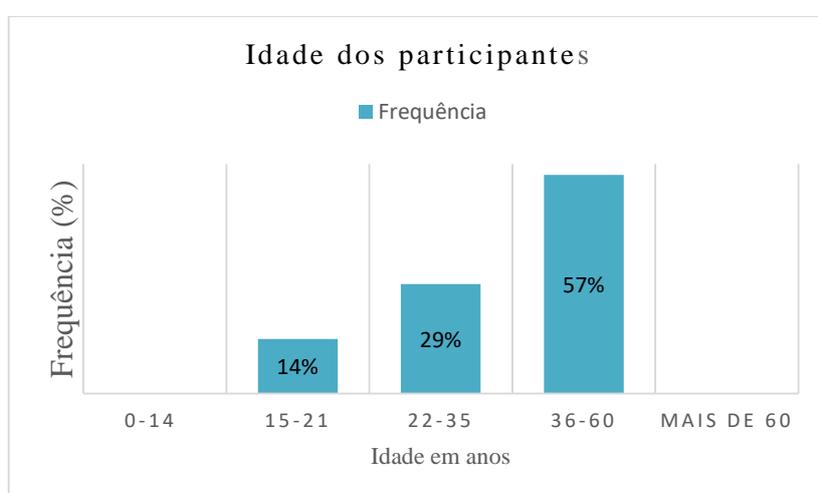


Figura 8: Frequência dos participantes do estudo em função da idade.

7.2. Frequência de isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* obtidas de amostras de água e alface no Vale de Infulene

Um total de 153 amostras foram colhidas durante o período do estudo, das quais 99 (65%) foram amostras de alface e 54 (35%) amostras de água. Do total de 153 amostras, identificamos 33 (22%) isolados de *E. coli* (13 em alface e 20 em água) e 30 (20%) isolados de *K. pneumoniae* (15 em alface e 15 em água), através de testes bioquímicos, meios cromogénicos e kit de Índice de Perfil Analítico 20E (API 20E).

Tabela 4: Frequência de *E. coli* e *K. pneumoniae* identificados em alface e água no Vale de Infulene.

Amostras	Frequência de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i>		
	<i>N</i> (%) de amostras colhidas	<i>n</i> (%) de <i>E. coli</i>	<i>n</i> (%) de <i>K. pneumoniae</i>
Alface	99 (64)	13 (13)	15 (15)
Água	54 (35)	20 (37)	15 (28)
Total	153 (100)	33 (22)	30 (20)

7.3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isolados em amostras de água e alface

Os 20 isolados de *E. coli* obtidos em amostras de água apresentaram frequências elevadas de resistência aos antibióticos testados, sendo ciprofloxacina, aztreonam e sulfametoxazol-trimetoprim em 19 (95%), ampicilina 17 (85%), amoxicilina-ácido clavulânico, ceftriaxona, ceftazidima, amicacina e tetraciclina 16 (80%) e cefepime 15 (75%). As altas frequências de sensibilidade de isolados de *E. coli* foram observadas para meropenem e imipenem em 20 (100%) e gentamicina 11 (55%) (Figura 9).

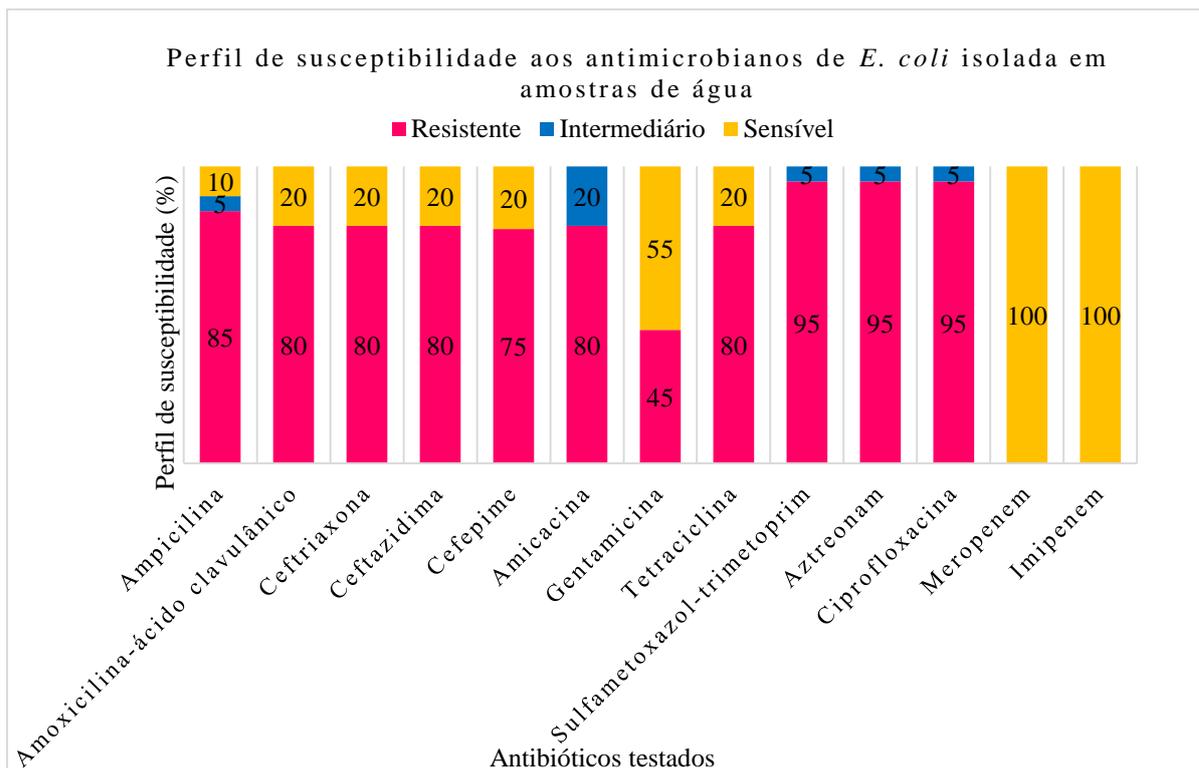


Figura 9: Perfil de susceptibilidade aos antibióticos de *E. coli* isolada em amostras de água proveniente do Vale de Infulene.

Os 13 isolados de *E. coli* obtidos em amostras de alface, apresentaram altas frequências de resistência para ampicilina e amicacina 9 (69%) (Figura 10). As altas frequências de sensibilidade de isolados de *E. coli* foram observadas para a maior parte dos antibióticos testados, nomeadamente: gentamicina, meropenem e imipenem em 13 (100%), ceftriaxona, cefepima, tetraciclina e aztreonam 10 (77%), ceftazidima 9 (69%), Sulfametoxazol-trimetoprim e ciprofloxacina 8 (62%) e amoxicilina-ácido clavulânico 5 (38%).

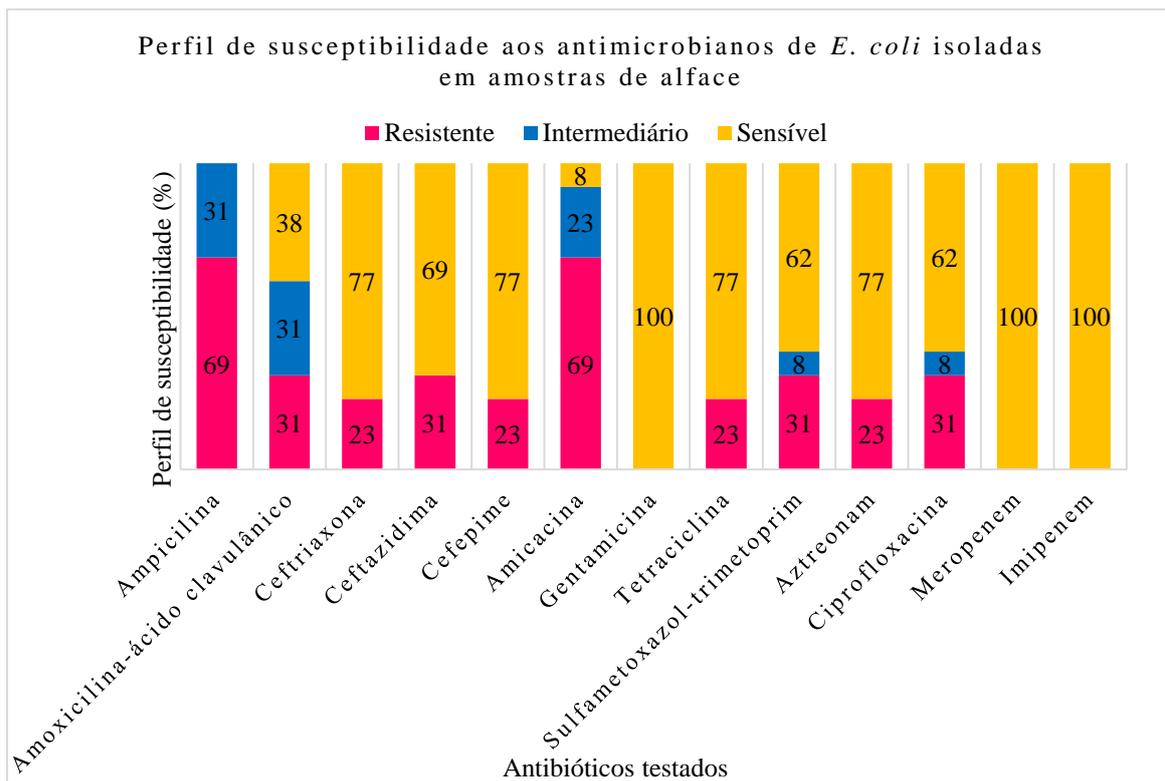


Figura 10: Perfil de susceptibilidade aos antibióticos de *E. coli* isoladas em amostras de alface no Vale de Infulene.

A frequência de isolados de *E. coli* multidroga-resistente em amostras de água foi de 20/20 (100%) enquanto em amostras de alface foi de 8/13 (62%).

Todos os isolados de *E. coli* provenientes dos pontos (P1, P2, P3, P4 e P8) apresentaram um perfil de susceptibilidade aos antibióticos heterogêneo comparativamente aos isolados obtidos nos pontos P8 e P10, onde alguns apresentam um perfil homogêneo, (W8- 1_ W17- 1_ W44-1 e W35-1_ W36-1) e (IL15-1_ IL52-1), respectivamente, apesar de terem sido colhidos em períodos diferentes (Tabela 5).

Do total de 13 antibióticos testados para *E. coli*, os isolados obtidos em amostras de água (P1, P2 e P3) apresentaram resistência a um número maior de antibióticos (pelo menos 5) comparativamente a isolados de *E. coli* obtidos em amostras de alface nos mesmos pontos, que apresentaram resistência a pelo menos 3 antibióticos. Ademais, o padrão de resistência de *E. coli* isolada em amostras de água e alface de diferentes pontos sugere a existência de uma relação genética entre os isolados e que a água seja uma possível rota de transmissão da *E. coli* resistente aos antibióticos.

Tabela 5: Pontos de colheita das amostras de alface e água e o padrão de resistência aos antimicrobianos de isolados de *E. coli*.

Código do Isolado	Data de colheita de amostra	Fonte do isolado	Ponto de colheita	Espécie identificada	Padrão resistentes
W10	26/07/2023	Água	P1*	<i>E. coli</i>	AM-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-TE-SXT-AZM-CIP
W19	09/08/2023	Água	P1	<i>E. coli</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-TE-SXT-AZM-CIP
W28	05/09/2023	Água	P1	<i>E. coli</i>	AK-TE-SXT-AZM-CIP
W37	18/10/2023	Água	P1	<i>E. coli</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-TE-SXT-AZM-CIP
IL11-1	14/06/2023	Alface	P1	<i>E. coli</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK
IL59-1	19/10/2023	Alface	P1	<i>E. coli</i>	AM-AMC-AK
IL66-1	15/11/2023	Alface	P1	<i>E. coli</i>	AM-AK-TE-SXT-CIP
W11	27/07/2023	Água	P2	<i>E. coli</i>	CRO-CAZ-FEP-AK-TE-SXT-AZM-CIP
IL47-1	15/08/2023	Alface	P3	<i>E. coli</i>	AK-TE-SXT
W12	26/07/2023	Água	P3	<i>E. coli</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-TE-SXT-AZM-CIP
W21	09/08/2023	Água	P3	<i>E. coli</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-TE-SXT-AZM-CIP
W30	05/09/2023	Água	P3	<i>E. coli</i>	AM-AMC-AK-SXT-AZM-CIP
W39	18/10/2023	Água	P3	<i>E. coli</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-TE-SXT-AZM-CIP
W48	13/11/2023	Água	P3	<i>E. coli</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-SXT-AZM-CIP
IL13-1	14/06/2023	Alface	P5	<i>E. coli</i>	AM-CAZ-AK
IL14-1	14/06/2023	Alface	P6	<i>E. coli</i>	AM-CRO-CAZ-FEP-AK-AZM
IL33-1	17/07/2023	Alface	P6	<i>E. coli</i>	AK-CIP
IL62-1	19/10/2023	Alface	P6	<i>E. coli</i>	AM-AMC
W31	05/09/2023	Água	P4	<i>E. coli</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-TE-SXT-AZM-CIP
W49	13/11/2023	Água	P4	<i>E. coli</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-SXT-AZM-CIP
W23	09/08/2023	Água	P5	<i>E. coli</i>	AM-AMC-CRO-FEP-SXT-CIP
IL20-1	26/06/2023	Alface	P8	<i>E. coli</i>	AK
IL27-1	03/07/2023	Alface	P8	<i>E. coli</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-SXT-AZM-CIP
IL63-1	19/10/2023	Alface	P8	<i>E. coli</i>	AM-AMC-AK-TE-SXT-AZM-CIP
W24	09/08/2023	Água	P6	<i>E. coli</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-TE-SXT-AZM-CIP
IL15-1	14/06/2023	Alface	P10	<i>E. coli</i>	AM
IL52-1	15/08/2023	Alface	P10	<i>E. coli</i>	AM
W43-1	18/10/2023	Água	P7	<i>E. coli</i>	AM-CRO-CAZ-FEP-TE-SXT-AZM
W8- 1	24/05/2023	Água	P8	<i>E. coli</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-TE-SXT-AZM-CIP
W17-1	26/07/2023	Água	P8	<i>E. coli</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-TE-SXT-AZM-CIP
W35-1	05/09/2023	Água	P8	<i>E. coli</i>	AM-AMC-AK-TE-SXT-AZM-CIP

W44-1	18/10/2023	Água	P8	<i>E.coli</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-TE-SXT-AZM-CIP
W36-1	05/09/2023	Água	P9	<i>E.coli</i>	AM-AMC-AK-TE-SXT-AZM-CIP

7.4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Klebsiella pneumoniae* isolados em amostras de água e alface

Os 15 isolados de *K. pneumoniae* obtidos em amostras de água, apresentaram altas frequências de resistência para a maior parte dos antibióticos testados: ampicilina 15 (100%), sulfametoxazol-trimetoprim e ciprofloxacina 14 (93%), amoxicilina-ácido clavulânico 13 (87%), amoxicilina-ácido clavulânico 13 (87%), ceftriaxona, ceftazidima, amicacina e aztreonam 12 (80%), cefepime 11 (73%), gentamicina 10 (67%) e tetraciclina 9 (60%) (Figura 11).

As altas frequências de sensibilidade de isolados de *K. pneumoniae* foram observadas para meropenem e imipenem 11 (73%).

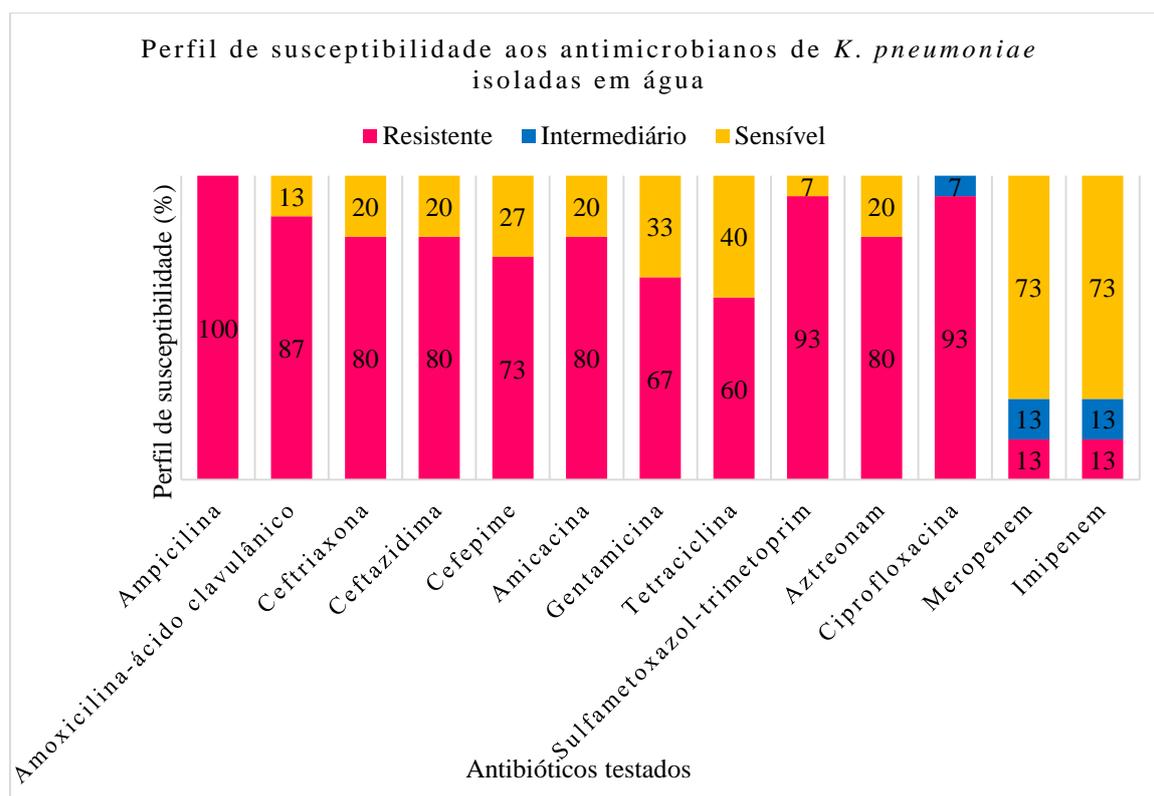


Figura 11: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *K. pneumoniae* isolada em amostras de água proveniente do vale de Infulene.

Os 15 isolados de *K. pneumoniae* obtidos em amostras de alface apresentaram altas frequências de resistência/não sensível apenas para três antibióticos quando comparados

aos isolados obtidos em amostras de água, nomeadamente: ampicilina 15 (100%), ciprofloxacina 5 (33%) e amicacina 3 (20%) (Figura 12).

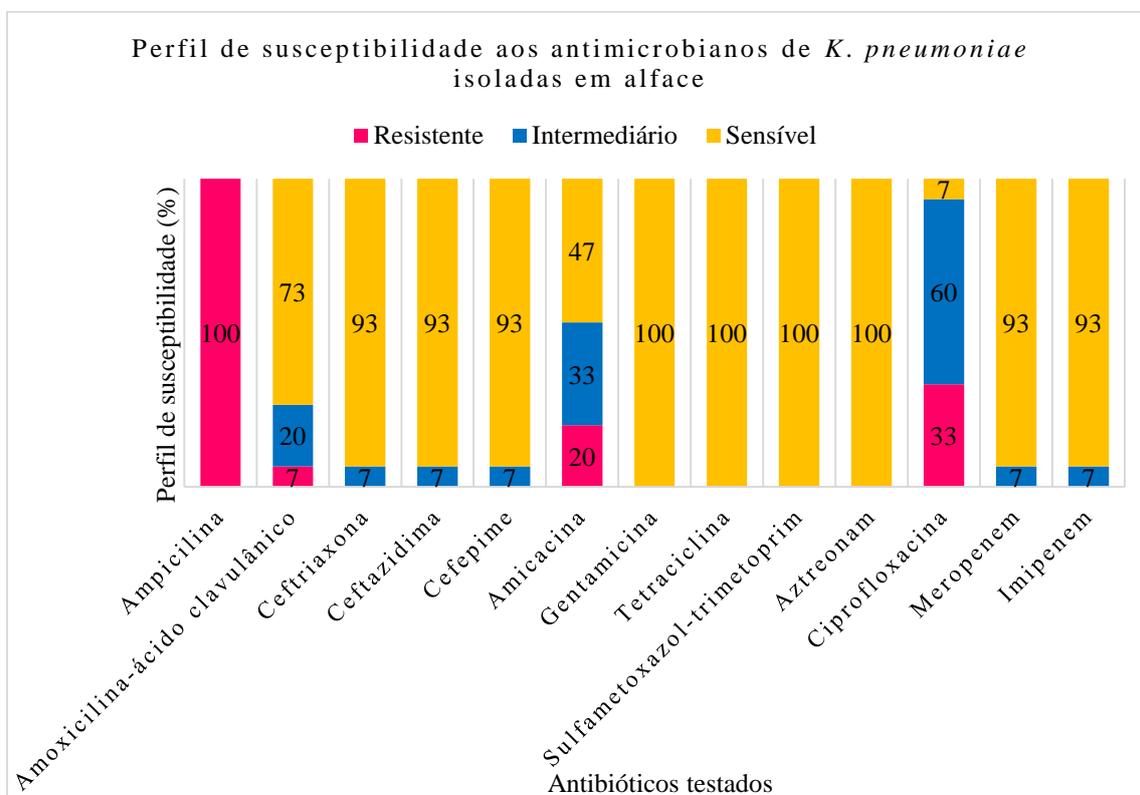


Figura 12: Perfil de susceptibilidade aos antibióticos de *K. pneumoniae* isolada em amostras de alface proveniente do Vale de Infulene.

As altas frequências de sensibilidade de 15 isolados de *K. pneumoniae* obtidos de amostras de alface foram observadas para gentamicina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim e aztreonam em 15 (100%), ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, meropenem e imipenem 14 (93%) e amoxicilina-ácido clavulânico 11 (73%).

A frequência de isolados de *K. pneumoniae* multidroga-resistente em amostras de água foi de 14/15 (93%) enquanto em amostras de alface foi de 9/15 (60%).

Os isolados de *K. pneumoniae* obtidos de amostras água e alface em vários pontos tende a apresentar o mesmo perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos (Tabela 6).

Do total de 13 antibióticos testados para *K. pneumoniae*, os isolados obtidos de amostras de alface, principalmente dos pontos P5 e P10 foram resistentes a um número reduzido de antibióticos, enquanto os isolados obtidos de amostras de água apresentaram

resistência a um número elevado de antibióticos principalmente nos pontos P1, P3, P4, P5 e P8, que apresentaram resistência a pelo menos 9 antibióticos.

Tabela 6: Pontos de colheita das amostras de água e alface e o padrão de resistência aos antimicrobianos de isolados de *K. pneumoniae*.

Código do Isolado	Data de colheita de amostra	Fonte do isolado	Ponto de colheita	Espécie identificada	Padrão resistentes
W1-2	24/05/2023	Água	P1	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-SXT-AZM-CIP
W10-2	26/07/2023	Água	P1	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-AK-GM-SXT-AZM-CIP
W19-2	09/08/2023	Água	P1	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-TE-SXT-AZM-CIP
IL23-2	03/07/2023	Alface	P1	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AK
W2-2	24/05/2023	Água	P2	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-TE-SXT-AZM-CIP
W11-2	26/07/2023	Água	P2	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-TE-SXT-AZM-CIP
W20-2	09/08/2023	Água	P2	<i>K. pneumoniae</i>	AM-CRO-CAZ-FEP-AK-TE-SXT-AZM-CIP
W29-2	05/09/2023	Água	P2	<i>K. pneumoniae</i>	AM-CIP
IL1-2	24/05/2023	Alface	P3	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AK-CIP
IL12-2	14/06/2023	Alface	P3	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AK
W3-2	24/05/2023	Água	P3	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-TE-SXT, AZM-CIP-MEM-IPM
W21-2	09/08/2023	Água	P3	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-TE-SXT-AZM-CIP
IL8-2	30/05/2023	Alface	P5	<i>K. pneumoniae</i>	AM
IL13-2	14/06/2023	Alface	P5	<i>K. pneumoniae</i>	AM
IL25-2	03/07/2023	Alface	P5	<i>K. pneumoniae</i>	AM-CIP
IL42-2	08/08/2023	Alface	P5	<i>K. pneumoniae</i>	AM
IL33-2	17/07/2023	Alface	P6	<i>K. pneumoniae</i>	AM-CIP
IL43-2	08/08/2023	Alface	P6	<i>K. pneumoniae</i>	AM
W22-2	09/08/2023	Água	P4	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-TE-SXT-AZM-CIP
W14-2	26/07/2023	Água	P5	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-GM-SXT-AZM-CIP
W23-2	09/08/2023	Água	P5	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-AK-TE-SXT-AZM-CIP
IL21-2	26/06/2023	Alface	P9	<i>K. pneumoniae</i>	AM
W33-2	05/09/2023	Água	P6	<i>K. pneumoniae</i>	AM-TE-SXT-CIP

IL15-2	14/06/2023	Alface	P10	<i>K. pneumoniae</i>	AM-CIP
IL22-2	26/06/2023	Alface	P10	<i>K. pneumoniae</i>	AM
IL29-2	03/07/2023	Alface	P10	<i>K. pneumoniae</i>	AM-CIP
IL34-2	17/07/2023	Alface	P10	<i>K. pneumoniae</i>	AM
IL45-2	08/08/2023	Alface	P10	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AMC
W34-2	05/09/2023	Água	P7	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AMC-SXT-CIP
W8-2	24/05/2023	Água	P8	<i>K. pneumoniae</i>	AM-AMC-CRO-CAZ-FEP-IMI-AK-GM-SXT-AZM-CIP-MEM-IPM

Legenda dos pontos de colheita água/Alface: P1/1- Depois da ponte, **P2/3-** Mistura entre água da CDM e águas residuais com água do rio, **P3/5 – 6-** Mistura da água da CDM e águas residuais, **P4-** Água do canal da CDM, **P5/8-** Água residual (vala de drenagem), **P6/10-** Água do rio, antes da Estrada (Av. Eduardo Mondlane), **P7-**Mistura da água da vala (Zimpeto) e água do Rio, **P8-** Água da vala de drenagem (Zimpeto), **P9-** Água do rio (Entrada do Intaka).

8. Discussão

8.1. Características sociodemográficas dos participantes do estudo e condições de cultivo de alface no vale de Infulene

Neste estudo, observou-se uma alta frequência de participantes do sexo masculino (57%) com idades compreendidas entre os 21 e 54 anos. Um estudo similar realizado no Vale de Infulene envolvendo agricultores reportou uma frequência de 82% de participantes do sexo masculino com idades compreendidas entre 22 e 46 anos (José, 2019). Adicionalmente, resultados similares também foram reportados na África do Sul (Khoza *et al.*, 2019) e na Colómbia (Diaz *et al.*, 2022), onde a frequência de participantes em actividades na agricultura foi maior em indivíduos do sexo masculino.

A agricultura no Vale de Infulene é maioritariamente para fins de comercialização, tornando-se uma fonte de renda familiar (Tejada, 2018). Em Moçambique, apesar do aumento de indivíduos do sexo feminino em actividades rentáveis, estes ainda são mais associados a agricultura de subsistência ou a actividades domésticas e indivíduos do sexo masculino continuam com o papel de provedores, participando em maior parte das actividades geradoras de renda, o que explica a elevada frequência de participantes do sexo masculino neste estudo (Tejada, 2018).

O uso de fezes de galinha como fertilizante foi mais frequente neste estudo, tendo sido apontado por todos entrevistados (100%). Estes resultados corroboram com os resultados obtidos em Gana (Appau & Ofori, 2024), Nigéria (Enukeje, 2013) e na Zâmbia (Biratu *et al.*, 2018). A preferência pelo uso de fezes de galinha neste estudo pode estar relacionado à maior disponibilidade deste estrume nas zonas peri-urbanas e aos elevados níveis de nitrogénio e outros oligoelementos na sua composição, que permitem o bom crescimento e desenvolvimento da cultura de alface (Appau & Ofori, 2024).

8.2. Frequência de isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* obtidas em amostras de água e alface do Vale de Infulene

Neste estudo, do total de 153 amostras, identificamos 33 (22%) *E. coli* (20 em água e 13 em alface) e 30 (20%) *K. pneumoniae* (15 em água e 15 em alface) provenientes do Vale de Infulene, através de testes bioquímicos, meios cromogénicos e API 20E.

Estudos anteriores feitos no Vale de Infulene, igualmente reportaram uma frequência de 22% de *E. coli* isolada em amostras de alface através da PCR (João *et al.*, 2021). Adicionalmente, um outro estudo mais recente, realizado no Vale de Infulene, registou uma frequência de 27% de *E. coli* isolada em amostras do rio (Nhantumbo *et al.*, 2023).

A nível do continente Africano, foi reportada uma frequência de 15% de *E. coli* isoladas de vegetais na Nigéria (Okojokwu *et al.*, 2015) e uma frequência de 18% de *E. coli* isoladas em amostras de vegetais frescos que incluíam alface na África do Sul (Richter *et al.*, 2019). Ainda na África do Sul, reportou-se uma frequência de 14% de *E. coli* isoladas em amostras de alface (Richter *et al.*, 2021) e uma frequência de 41,2% de *E. coli* isolada em amostras de água de um canal (Ebomah *et al.*, 2018).

Na Tailândia, obteve-se uma frequência de 36,7% de *E. coli* isolada de amostras de vegetais e ervas (Datta *et al.*, 2024), no Camboja notificou-se uma frequência de 39,2% de *E. coli* isolada em alface (Chhay *et al.*, 2018) e 29,4% de *E. coli* isolada em alface foi reportada na Califórnia (Pires *et al.*, 2020).

Adicionalmente, uma frequência de 21% de *K. pneumoniae* foi reportada em Singapura em amostras de alimentos crus incluindo alface (Hartantyo *et al.*, 2020) e 19,5% no Paquistão, em isolados de *K. pneumoniae* obtidos de alimentos crus (Junaaid *et al.*, 2022).

Na Tanzânia, uma frequência de 44,3% de *K. pneumoniae* foi notificada em isolados obtidos de amostras ambientais ao longo do da Bacia do Rio Msimbazi (Kimera *et al.*, 2021) e uma frequência relativamente baixa de *K. pneumoniae* (2,18%) foi registada na Sérvia em amostras de água do rio (Dobrijevic *et al.*, 2017).

A presença de *E. coli* e *K. pneumoniae* na água e alface do Vale de Infulene pode estar associada a presença de fontes difusas de poluição que incluem estações de tratamento de águas residuais, um hospital, uma empresa de fabricação de papel e uma fábrica de cerveja, bem como queda de chuva na época chuvosa causando inundações que espalham contaminantes por toda a área (Nhantumbo *et al.*, 2023). Estas águas contendo contaminantes, por sua vez, são utilizadas para irrigação de vegetais como alface que associado ao uso de fezes de galinhas como fertilizante, contribuem para a existência desses microorganismos na alface (Appau & Ofori, 2024).

As fezes de galinha são utilizadas com outros componentes como fertilizante orgânico para incrementar a qualidade e produtividade dos vegetais. Entretanto, estas fezes podem

estar contaminadas por vários microorganismos patogénicos, incluindo *E. coli* e *K. pneumoniae*, os quais já foram relatados em anteriormente em isolados de estrume de fezes de galinhas (Aworh *et al.*, 2020; Ngogang *et al.*, 2021).

A presença destas bactérias nas fezes de galinhas, representa um risco de contaminação para os animais, seres humanos e o ambiente, considerando também a sua capacidade de sobreviver no ambiente por um longo período (Oliveira *et al.*, 2012). Ademais, existe um risco adicional, devido ao uso elevado de antibióticos na produção de galinhas como promotores de crescimento ou para fins profiláticos, propiciando a selecção e transmissão de bactérias multirresistentes para a água e vegetais incluindo alface, o que demonstra a necessidade de vigilância contínua no Vale de Infulene (Roth *et al.*, 2018).

8.3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isolados de amostras de água e alface

No presente estudo, os isolados de *E. coli* obtidos de amostras de água e alface apresentaram altas frequências de resistência para a maioria dos antibióticos testados. Os isolados de *E. coli* obtidos em amostras de água apresentaram frequências elevadas de resistência aos antibióticos ciprofloxacina, aztreonam e sulfametoxazol-trimetoprim (95%), ampicilina (85%), amoxicilina-ácido clavulânico, ceftriaxona, ceftazidima, amicacina e tetraciclina (80%), cefepime (75%) e gentamicina (45%). Os isolados de *E. coli* obtidos em amostras de alface, também apresentaram frequências altas de resistência sobretudo para ampicilina e amicacina em (69%), amoxicilina-ácido clavulânico, ceftazidima, sulfametoxazol-trimetoprim e ciprofloxacina (31%), ceftriaxona, cefepime, tetraciclina e aztreonam (23%).

Um estudo anterior feito no Vale de Infulene, notificou altas frequências de *E. coli* resistente a amoxicilina-ácido clavulânico (100%) e ampicilina (67%) em amostras de alface (Salvador *et al.*, 2016). Adicionalmente, um estudo feito recentemente no Vale de Infulene utilizando amostras de alface, reportou altas taxas de *E. coli* resistente a ampicilina e amoxicilina-ácido clavulânico (100%), ceftazidima (50%) e sulfametoxazol-trimetoprim (45%) (João *et al.*, 2021).

A nível do continente africano, em Gana, foram reportadas altas frequências de *E. coli* resistente a todos antibióticos testados, que incluíam ampicilina, tetraciclina,

cotrimoxazol, ceftriaxona, cefotaxima, ciprofloxacina e meropenem, variando entre 87% e 98% de resistência em isolados obtidos de amostras de alface e água de irrigação (Appau & Ofori, 2024).

Ainda em Gana, foram reportadas altas frequências de resistência a amoxicilina-ácido clavulânico (77%), ciprofloxacina (49%), ceftriaxona (69%), sulfametoxazol-trimetoprim (76%) e aztreonam (59%) em amostras de alface irrigada com diferentes fontes de água (Quarcoo *et al.*, 2022) e na Nigéria, também notificou-se *E. coli* resistente a amoxicilina-ácido clavulânico e ceftazidima em amostras de água de rio (Olawale *et al.*, 2023).

Na Índia, foi relatada a *E. coli* resistente a cefepima (uma cefalosporina da quarta geração) em estudos que envolviam a análise de ambientes aquáticos de utilização mista (Diwan *et al.*, 2018).

Na Bélgica, um estudo feito incluindo isolados de amostras de alface e água, mostrou baixas frequências de resistência aos antibióticos testados, sendo a maior resistência observada para ampicilina com 15%, muito abaixo dos resultados obtidos neste estudo (Holvoet *et al.*, 2013). Estes resultados mostram a diferença do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *E. coli* sugerindo uma baixa contaminação por bactérias de origem antrópica potencialmente patogênicas e resistentes.

Os isolados de *E. coli* obtidos em amostras de água e alface neste estudo, apresentaram altas frequências de sensibilidade a classe dos carbapenêmicos, com uma média de 100% para o imipenem e meropenem respectivamente. Adicionalmente, em isolados obtidos em amostras de alface, foi observada uma alta frequência de sensibilidade para a gentamicina (100%) e ceftriaxona (77%), divergindo dos resultados reportados em estudos anteriores no Gana onde observou-se uma frequência elevada de resistência a ceftriaxona (95%) e ao meropenem (92%), mostrando a variação geográfica de resistência e a necessidade de contínua vigilância (Appau & Ofori, 2024).

No Vale de Infulene, estudos anteriores feitos incluindo amostras de alface, reportaram altas frequências de susceptibilidade de *E. coli* para imipenem, ertapenem e meropenem (67%), considerados antibióticos de reserva para tratamento de infecções multidroga-resistente (Salvador *et al.*, 2016; WHO, 2018).

Ainda no Vale de Infulene, um estudo realizado incluindo amostras de alface também reportou baixas taxas de *E. coli* resistente a ampicilina, imipenem, cefotaxima e piperacilina-tazobactam, variando de 9% a 18%, e com susceptibilidade total a gentamicina e ciprofloxacina (João *et al.*, 2021).

Em outros países como África do Sul, *E. coli* isolada de amostras de vegetais incluindo alface e águas de irrigação apresentou maior susceptibilidade ao imipenem (100%) e gentamicina (93%) (Ratshilingano *et al.*, 2021). Na Nigéria, isolados de *E. coli* obtidos de amostras vegetais e seu ambiente de cultivo (incluindo água de irrigação) foram 100% susceptíveis ao imipenem, meropenem e ertapenem (Igbinosa *et al.*, 2023). Na Tailândia, foram relatados isolados de *E. coli* obtidos de vegetais crus altamente susceptíveis ao imipenem (Romyasamit *et al.*, 2021).

Todavia, a presença de estirpes resistentes aos antibióticos da primeira linha para o tratamento de infecções em água e alimentos constitui um risco para a saúde pública, devido à possibilidade de contaminação humana no contexto de saúde única. Estudos anteriormente feitos incluindo isolados de *E. coli* obtidos de infecções humanas têm demonstrado elevadas frequências de resistência aos antibióticos. No HCM, um estudo envolvendo pacientes internados e no ambulatório mostrou altas frequências de *E. coli* resistente a cefalosporinas da 3ª geração (ceftazidima 49%, ceftriaxona 50,3% e cefotaxima 43,4%) (Langa *et al.*, 2018). Adicionalmente, *E. coli* resistente a ampicilina (97,8%), tetraciclina (68,3%), cloranfenicol (28,4%), ácido nalidíxico (19,5%) e gentamicina (14,4%) foi reportada em amostras de crianças dos 0 aos 14 anos de idade num programa de vigilância de diarreia nas províncias de Maputo, Sofala, Zambézia e Nampula (Manhique-Coutinho *et al.*, 2020).

Outrossim, isolados de *E. coli* obtidos de hemoculturas de pacientes com infecções extraintestinais no HCM, demonstraram elevadas frequências de resistência à Sulfametoxazol-trimetoprim e amoxicilina-ácido clavulânico (83%), cefotaxima e ceftazidima (67%), gentamicina (58%), ciprofloxacina (50%) e piperacilina-tazobactam (33%) (Santona *et al.*, 2022), o que mostra que há circulação dessas estirpes de *E. coli* resistentes, podendo contaminar a água incluindo dos rios e posteriormente a alface irrigada com esta água, havendo necessidade de contínua vigilância no Vale do Infulene.

Estes resultados sugerem a gestão adequada e uso racional de antibióticos de reserva, meropenem, imipenem e ertapenem na produção animal, considerando que o estrume de

animais, incluindo galinhas é usado para adubar os campos no Vale de Infulene. Todavia, os isolados de *E. coli* obtidos de amostras de água apresentaram frequências altas de resistência aos antibióticos quando comparados com os isolados *E. coli* obtidos de amostras de alface. Estes resultados evidenciam uma contaminação da água do Vale do Infulene por várias fontes, incluindo humanas, o que constitui um risco para a saúde pública porque esta água é posteriormente usada para irrigação de alface e outras hortícolas (Salvador *et al.*, 2016; Nhantumbo *et al.*, 2023).

8.4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Klebsiella pneumoniae*, isolados de amostras de água e alface

No presente estudo, os isolados de *K. pneumoniae* obtidos em amostras de água, apresentaram altas frequências de resistência para a maior parte dos antibióticos testados, tendo sido ampicilina (100%), sulfametoxazol-trimetoprim e ciprofloxacina (93%), amoxicilina-ácido clavulânico (87%), ceftriaxona, ceftazidima, amicacina e aztreonam (80%), cefepime (73%), gentamicina (67%) e tetraciclina (60%) enquanto, em amostras de alface, altas frequências de resistência foram observadas apenas para três antibióticos: ampicilina (100%), ciprofloxacina (33%) e amicacina (20%). Estes antibióticos constituem a primeira linha para o tratamento de várias infecções humanas e animais, representando preocupação para a saúde pública (WHO, 2018).

A ocorrência de *K. pneumoniae* resistente a antibióticos da primeira linha para o tratamento em isolados obtidos de amostras de água e vegetais incluindo alface vem sendo relatada em África. Em Gana, *K. pneumoniae* isolada em vegetais comumente consumidos frescos que incluem alface, foi altamente resistente a ampicilina e cefuroxima (87,5%), tetraciclina (62,5%), cotrimoxazol e gentamicina (37,5%), cloranfenicol e cefotaxima (62,5%) e ceftriaxona (50%) na metrópole de Kumasi (Kwaku *et al.*, 2016).

Na Nigéria, foram reportados isolados de *K. pneumoniae* obtidos de amostras de diferentes rios com altas frequências de resistência a polimixina B (100%), colistina (100%), cefotaxima (98,67%), ceftazidima (98,67%), ciprofloxacina (86,67%), tetraciclina (84%), meropenem (78,67%), imipenem (64%) e gentamicina (41,33%) em isolados obtidos (Onu *et al.*, 2023). Ademais, em África, na Argélia, foi reportada a

ocorrência de *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas da 3ª geração isolada em frutas e vegetais frescos (Zekar *et al.*, 2020).

Similarmente a este estudo, na Sérvia, foi reportada uma frequência de 100% de resistência a ampicilina em isolados de *K. pneumoniae* obtidos em amostras de água e susceptibilidade para os antibióticos que incluem o grupo das penicilinas, cefalosporinas da 3ª e 4ª geração, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfonamidas (Dobrijevic *et al.*, 2017).

Na Tailândia, foi notificada *K. pneumoniae* resistente a ampicilina (86%), meropenem (21%), aztreonam (29%), cefotaxima (64%), ceftriaxona (36%), ceftazidima (64%), ampicacina (43%) e tetraciclina (21%) em isolados de vegetais frescos (Romyasamit *et al.*, 2021), mostrando uma semelhança do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *K. pneumoniae* de vários países.

Os isolados de *K. pneumoniae* neste estudo, foram mais sensíveis ao imipenem e meropenem com uma frequência de 73%. Resultados similares foram reportados na Tailândia, onde todos isolados de *K. pneumoniae* obtidos em amostras de vegetais foram sensíveis aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) (Romyasamit *et al.*, 2021).

Na Sérvia e Paquistão isolados de *K. pneumoniae* obtidos de amostras de água de superfície e fontes alimentares também mostraram altas frequências de sensibilidade para imipenem e meropenem (100%) (Dobrijevic *et al.*, 2017; Junaid *et al.*, 2021).

Entretanto, na última década a resistência aos carbapenêmicos, considerados antibióticos de reserva vêm aumentando, especialmente em estirpes de *Enterobacteriaceae*, tornando-se um problema de saúde global. Registos de isolados de *K. pneumoniae* com frequências elevadas de resistência ao imipenem (64%) e meropenem (67%) obtidos de amostras do rio foram confirmados na Nigéria (Onu *et al.*, 2023). Ademais, na Etiópia isolados de *K. pneumoniae* obtidos de vegetais mostraram altas frequências de resistência aos antibióticos imipenem e meropenem (89%) (Yigrem *et al.*, 2021). Na África do Sul também já foram reportadas altas frequências de resistência para imipenem (51%) e meropenem (34%) em isolados de *K. pneumoniae* obtidos de amostras de nichos ambientais, mostrando a necessidade de contínua vigilância (Ebomah & Okoh, 2020).

O imipenem e meropenem pertencentes a classe dos carbapenêmicos, são considerados antibióticos de reserva no tratamento de infecções multidroga-resistentes, o que pode

explicar a elevada frequência de sensibilidade de *E. coli* e *K. pneumoniae* a estes antibióticos (WHO, 2018).

Entretanto, as diferenças observadas em relação aos outros estudos, podem ser explicadas pelos métodos utilizados, o tamanho amostral, localização geográfica e outros factores relacionados com a actividades antrópicas nos locais de estudo (Holvoet *et al.*, 2013; Onu *et al.*, 2023; Apau & Ofori, 2024).

A contaminação de água e alimentos por estirpes bacterianas resistentes pode ocorrer através de diversas fontes, incluindo dejectos humanos, mostrando a necessidade de abordagem de saúde única (Quarcoo *et al.*, 2022).

Em Moçambique, estirpes de *K. pneumoniae* resistentes aos antibióticos da primeira linha, à semelhança do perfil observado no presente estudo têm sido reportados em infecções humanas e produção animal (Montso *et al.*, 2019; Sumbana *et al.*, 2023), o que pode sugerir uma pressão selectiva em diversas fontes. Por exemplo, um estudo anterior feito no HCM incluindo pacientes internados e no ambulatório, mostrou altas frequências de *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas da 3ª geração (ceftazidima 59,5%, ceftriaxona 59,2% e cefotaxima 65,6%) (Langa *et al.*, 2018). Ainda no HCM, isolados de *K. pneumoniae* obtidos de hemoculturas apresentaram 100% de resistência à cefotaxima, ceftazidima, cefepime e 69,2% à meropenem (Sufiana *et al.*, 2021).

Adicionalmente, um estudo feito recentemente no HCM em isolados de *K. pneumoniae* obtidos de amostras de sangue, pús e líquido cefalorraquidiano reportou altas frequências de resistência á amoxicilina-ácido clavulânico (82,8%), cefotaxima, ceftazidima e sulfametoxazol-trimetoprim (77%), gentamicina (74,3%), piperaciclina-tazobactam e ciprofloxacina (71,4%) (Sumbana *et al.*, 2023). Essas estirpes de *K. pneumoniae* resistentes devido a pressão selectiva, podem contaminar a água e alface evidenciando a necessidade de vigilância contínua da resistência antimicrobiana no Vale de Infulene.

O padrão de resistência a antibióticos observado neste estudo principalmente em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* sugere a existência de uma relação genética entre os isolados obtidos de amostras de água e alface devido a similaridades no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos observado nos mesmos pontos de colheita de amostras. Resultados similares foram também relatados na África do Sul, em estudos incluindo águas de

irrigação e alface, que também sugeriram uma similaridade genética entre isolados de *E. coli* de água de irrigação e isolados de vegetais (Njage & Buys, 2015; Jongman & Korsten, 2016; Ratshilingano *et al.*, 2021). Nossos resultados corroboram com outros estudos que indicam que a água e a alface podem ser vias para a difusão rápida de genes de resistência a antibióticos na comunidade (Njage & Buys, 2015; Romyasamit *et al.*, 2021; Igbinosa *et al.*, 2023).

Os resultados deste estudo revelam a presença de *E. coli* e *K. pneumoniae* multidroga-resistentes em água e alface cultivada nas machambas do Vale do Infulene. A presença dessas bactérias multidroga-resistentes coloca o produtor e o consumidor em risco de contrair infecções resistentes, sugerindo o uso adequado dos medicamentos, incluindo os de reserva, controlo das fontes de contaminação, e reforço das regras de higienização da alface, bem como das mãos dos manipuladores, durante a preparação para o consumo, como formas de impedir a emergência de altas frequências de estirpes resistentes de *E. coli* e *K. pneumoniae* (João *et al.*, 2021; Onu *et al.*, 2023; Apau & Ofori, 2024).

9. Conclusão

Com o presente estudo conclui-se que:

- Os produtores de alface no Vale de Infulene usam o estrume de galinha para a fertilização.
- As amostras de água e alface do Vale de Infulene estão contaminadas por *E. coli* e *K. pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos.
- Os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentam altas frequências de resistência para a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, amicacina, gentamicina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, aztreonam e ciprofloxacina e uma alta sensibilidade para o imipenem e meropenem.
- Os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* obtidos em amostras de água mostram altas frequências de resistência aos antibióticos testados comparativamente aos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* obtidos em amostras de alface.

10. Limitações

Relutância de alguns produtores em fornecer os dados sócio-demográficos bem como amostras de alface, temendo perder os seus campos de produção após análise da alface.

11. Recomendações

Aos produtores e consumidores

- Adopção de boas práticas durante a produção colheita e comercialização da alface.
- Adopção e reforço dos métodos de higienização durante a preparação da alface para a redução da carga microbiana.

Aos investigadores

- Vigilância contínua de resistência em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* obtidos em amostras de alface e água;
- Estudos adicionais sobre a ocorrência e perfil de resistência de *E. coli* e *K. pneumoniae* no estrume utilizado para a fertilização para comparação de resultados;
- Caracterização molecular de isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* em amostras de água e alface de forma a identificar a ocorrência de genes de resistência e virulência, para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência e na sua disseminação.

12. Referências bibliográficas

1. Abdulsattar B. O., J. O. Abdulsattar, K. H. Rasool, A. A. Abdulhussein and M. H. Abbas (2020). Study of Antimicrobial Resistance Pattern of *Escherichia coli* and *Klebsiella* Strains and Multivariate Analysis for Water Quality Assessment of Tigris River, Baghdad, Iraq. *Nature Environment and Pollution Technology*, 19 (3): 1327-1334.
2. Adelowo O.O., S. Caucci, O. A. Banjo, O. C. Nnanna, E. O. Awotipe, F. B. Peters, O. E. Fagade and T. U. Berendonk (2018). Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-producing bacteria isolated from hospital wastewaters, rivers and aquaculture sources in Nigeria. *Environmental Science and Pollution Research*, 25:2744–2755.
3. Aly M, M., S. Khalil, A. Metwaly (2014). Isolation and Molecular Identification of *Klebsiella* Microbe Isolated from Chicks. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 43: 97-103.
4. Amarasiri, M., D. Sano, S. Suzuki (2019). Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(19): 2016-2059.
5. Amoah P., P. Drechsel, M. Henseler and R. C. Abaidoo (2007). Irrigated urban vegetable production in Ghana: microbiological contamination in farms and markets and associated consumer risk groups. *Journal of Water and Health*.
6. Antwi-agyei, P., J. Ensink (2016). Wastewater Use for Vegetable Farming and Post-Harvest Health Risk Management in Ghana- A Policy Brief. *London School of Hygiene and Tropical Medicine*, London, 1-11.
7. Appau A. A. A. and L. A. Ofori (2024). Antibiotic Resistance Profile of *E. coli* Isolates from Lettuce, Poultry Manure, Irrigation Water, and Soil in Kumasi, Ghana. *International Journal of Microbiology*.
8. Aromolaran O. and A. Amodu (2021). Antibiotic susceptibility pattern of *Klebsiella pneumoniae* and *pseudomonas aeruginosa* isolated from some drinking wells in Ondo town southwest Nigeria. *J. Appl. Sci. Environ. Manage*, 25 (1): 59-63.
9. Aworh M. K., J. Kwaga, E. Okolocha, L. Harden, D. Hull, R. S. Hendriksen and S. Thakur (2020). *Escherichia coli* produtora de β -lactamase de espectro estendido entre humanos, galinhas e ambientes avícolas em Abuja, Nigéria. *Uma perspectiva de saúde*, 2:8.

10. Bahia, Márcia de Nazaré (2011). *Caracterização Molecular de Vibrio cholerae O1 Sacarose Negativa de Isolados Clínicos e Ambiente na Amazônia Brasileira*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará.
11. Banu R. A., J. M. Alvarez, A. J. Reid, W. Enbiale, A. K. Labi, E. D. O. Ansa, E. A. Annan, M. O. Akrong, S. Borbor, L. A. B. Adomako, H. Ahmed, M. B. Mustapha, H. Davtyan, P. Owiti, G. K. Hedidor, G. Quarcoo, D. Opere, B. Kikimoto, M. Y. Osei-Atwenebanoa and H. Schmitt (2021). Extended Spectrum Beta-Lactamase *Escherichia coli* em águas fluviais coletadas de duas cidades em Gana. *TropicalMed*, 6(2):105.
12. Baptista, M. G. F. M. (2013). *Mecanismos de Resistência aos Antibióticos*. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa.
13. Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris and M. Turck (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4): 493-496.
14. Biratu, G. K., E. Elias, P. Ntawuruhunga and G. Sileshi (2018). Cassava response to the integrated use of manure and NPK fertilizer in Zambia. *Heliyon*, 4.
15. Blair, J.M., M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu and L. J. Piddock (2015). Molecular Mechanisms of Antimicrobial Resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, 13: 42-51.
16. Callejón, R. M., M. I. Rodríguez-Naranjo, C. Ubeda, R. Hornedo-Ortega, M. C. Garcia-Parrilla and A. M. Troncoso (2015). Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and European Union: Trends and Causes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12 (1).
17. Caumo, K., M. Duarte, S.T. Cargnin, V. B. Ribeiro, T. Tasca, A. J. Macedo (2010). Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. *Revista Liberato*, 11 (16): 89-188.
18. Célio, A., G. Nchowela, I. Muchanga, A. Nharrave, Y. Mussa and J. Macuácuá (2021). Parasitological Assessment of Lettuce Quality in the Maxixe City Markets, Mozambique. *J Bacteriol Parasitol*, S8 (002): 1-4.
19. Chhay, C., M. Sadiq, T. Cho, A. Anal (2018). Prevalence and Analysis of Antibiotic Resistant Genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* Isolates from Green Leaf Lettuce. *Chiang Mai Journal of Science*, 45: 1-13.

20. Chibantão, Gil Virgílio Guilherme (2012). *Controlo da Qualidade da Água do rio Infulene para fins de Irrigação*. Tese de Licenciatura em Química, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.
21. Chissaque, A., N. de Deus, D. Vubil and I. Mandomando (2018). The Epidemiology of Diarrhea in Children Under 5 Years of Age in Mozambique. *Current Tropical Medicine Reports*, 5: 115-124.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th Edition. CLSI Informational Supplement. M100
23. Costa, A. L. P. (2016). *Resistência Bacteriana aos Antibióticos: Uma Perspectiva Do Fenômeno Biológico, Suas Consequências e Estratégias de Contenção*. Tese de Licenciatura em Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP.
24. Costa, A. L. P. e A. C. Silva Junior (2017). Resistência Bacteriana aos Antibióticos e Saúde Pública: Uma Breve Revisão de Literatura. *Estação Científica - UNIFAP*, 7 (2): 45-57.
25. Croxen, M., R. J. Law, R. Scholz, K. M. Keeney, M. Wlodarska, B. B. Finlay (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia Coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26 (4): 822-880.
26. Cunha, F. P., M. L. Vilela, T. Maximiano, T. M. Barbosa, D. A. Guimarães, R. C. Toledo (2017). *Shigella* sp: Um problema de Saúde pública. *Higiene Alimentar*, 31.
27. Dabrowska, B. W., M. Zaczek, M. Lobočka, M. Lusiak-Szelachowska, Owczarek, B.; Orwat, F.; Łodej, N.; Skaradzińska, A.; Łaczmanski, Ł.; D. Martynowski (2023). Characteristics of Environmental *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* Bacteriophages and Their Therapeutic Applications. *Pharmaceutics*, 15: 434.
28. Das, B., J. Verma, P. Kumar, A. Ghosh and T. Ramamurthy (2020). Antibiotic resistance in *Vibrio cholera*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine*, 38: 83-92.
29. Datta, S., M. Ishikawa, S. Chudhakorn, T. Charaslertrangsi (2024). Prevalence and Antimicrobial Characteristics of *Escherichia coli* in Selected Vegetables and Herbs in Bangkok, Thailand. *Journal of Food Protection*.
30. Diaz R. T., D. P. Osorio, E. M. Hernández, M. M. Pallares, F. A. Canales, A. C. Paterninad and A. Echeverría-González (2022). Socioeconomic Determinants that

- Influence the Agricultural Practices of Small Farm Families in Northern Colombia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 21: 440-451.
31. Diwan V., N. Hanna, M. Purohit, S. Chandran, E. Riggi, V. Parashar, A. J. Tamhankar, C. Lundborg (2018). Seasonal Variations in Water-Quality, Antibiotic Residues, Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes of *Escherichia coli* Isolates from Water and Sediments of the Kshipra River in Central India. *Int J Environ Res Public Health*, 15 (6): 1281.
 32. Dobrijević, D., A. Trudic, V. Borčić and M. Bekut (2017). Antibiotic susceptibility profile of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from drinking and surface water. *Rational Therapy*, 9: 1-13.
 33. Dong N., X. Yang, E. W. Chan, R. Zhang, S. Chen (2022). *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *EBioMedicine*.
 34. Dzidic, S., J. Suskovic, B. Kos (2008). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology and Biotechnology*, 46 (11): 11-21.
 35. Ebomah, Kingsley and Anthony Okoh (2020). Detection of Carbapenem-Resistance Genes in *Klebsiella* Species Recovered from Selected Environmental Niches in the Eastern Cape Province, South Africa. *Antibiotics*, 9 (7): 425.
 36. Enukeje, Emmanuel (2013). Response of watermelon to five different rates of poultry manure in asaba area of Delta state, Nigeria. *IORS Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 5: 45-50.
 37. Epan, R. M., C. Walker, R. F. Epan, N. A. Magarvey (2016). Molecular Mechanisms of Membrane Targeting Antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858 (5): 980-987.
 38. European Food Safety Authority-EFSA (2014a). Update on EFSA's activities on Emerging Risks 2012–2013. *EFSA Supporting Publication*, 11(4).
 39. European Comitee on Antimicrobial Susceptibility- EUCAST (2023). *Antimicrobial Susceptibility Testing: EUCAST Disk Diffusion Method*.
 40. Fraser J. L., Y. H. Alimi, J. K. Varma, T. Muraya, T. Kujinga, V. K. Carter, C. Schultsz e V. J. Vilas (2021). Antimicrobial resistance control efforts in Africa: a survey of the role of Civil Society Organisations. *Global Health Act*, 14:1.
 41. Grupo de Trabalho da Parceria Global da Resistência a Antibióticos - GARP - Moçambique (2015). *Análise Situacional e Recomendacoes: Uso e Resistência aos*

- Antibióticos*. Washington, DC e Nova Deli, Centro para estudo de Dinâmica de Doenças, Economia e Política (CDDEP).
42. Gekenidis M. T., W. Qi, J. Hummerjohann, R. Zbinden, F. Walsh and D. Drissner (2018). Antibiotic- resistant indicator bacteria in irrigation water: High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 13 (11).
 43. Gomez-Simmonds A., A. C. Uhlemann (2017). Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Infectious Disease*, 215.
 44. Hartantyo, S. H., M. L. Chau, T. H. Koh, M. Yap, T. Yi, D. Y. Cao, R. A. Gutiérrez, L. C. Ng (2020). Foodborne *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Potential, Antibiotic Resistance, and Risks to Food Safety. *Journal of Food Protection*, 83 (7): 1096-1103.
 45. Hasan, M., A. K. Tahsin, M. N. İslam, A. Ali, J. Uddain (2017). Growth and Yield of Lettuce (*Lactuca Sativa* L.) Influenced as Nitrogen Fertilizer and Plant Spacing. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 10 (6): 62-71.
 46. Health Canada (2012). *Guidelines for Canadian Recreational Water Quality*.
 47. Hendrik T. C., A. F. Voorintholt, M. C. Vos (2015). Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase- producing *Klebsiella* spp: a systematic review and meta-analyses. *PLoS One*, 10:1-23.
 48. Holanda, C. M., D. S. Arimateia, R. M. Neto (2017). *Manual de Bacteriologia e Entoparasitos*. Natal, EDUFRN.
 49. Holvoet, K, I. Sampers, B. Callens, J. Dewulf, M. Uyttendaele (2013). Moderate prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from lettuce, irrigation water, and soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(21)
 50. Hu, Y. Y., J. C. Cai, H. Zhou, D. Chi, X. Zhang, W. Chen, R. Zhang, G. Chen (2013). Molecular Typing of CTX-M-Producing *Escherichia coli* Isolates from Environmental Water, Swine Feces, Specimens from Healthy Humans, and Human Patients. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19):5988-5996.
 51. Igbinosa E. O., A. Beshiru, I. H. Igbinosa, G. S. Cho, C. M. Franz (2023). Multidrug-resistant extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* from farm produce and agricultural environments in Edo State, Nigeria. *PLoS ONE*, 18 (3).
 52. Instituto Nacional de Estatística- INE (2020). *Indicadores Básicos do Ambiente - Moçambique*.

53. Instituto Nacional de Saúde- INS (2023). *Atualização sobre a situação da cólera em Moçambique*. Comunicado de Imprensa.
54. Islam, R., A. Solaiman, M. D. Kabir, H. Arefin, O. Azad, M. H. Siddiquee, B. Alsanius and T. Naznin (2021). Evaluation of Lettuce Growth, Yield, and Economic Viability Grown Vertically on Unutilized Building Wall in Dhaka City. *Frontiers in Sustainable Cities*, 3.
55. Jay, M. J. (2005). *Gastrenterites de Origem Alimentar Causadas por Salmonella e Shigella*. *Microbiologia de Alimentos*.
56. João, E., J. Singo, A. Muchongo, J. Sacarlal e J. Sumbana (2021). Emergência de *Escherichia coli* multirresistentes Produtoras de β -lactamases (blaTEM) em Alface cultivada no Vale do Infulene, Cidade da Matola. *Livro de Resumos da XI Conferência Científica da Uem*.
57. José, Eufrásia de Arminda (2019). *Estratégias de Reprodução Social Entre um Grupo de Produtores: Uma Análise a partir de Produtores no Vale de Infulene, Província de Maputo*. Tese de Licenciatura, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.
58. Junaid K., H. Ejaz, S. Younas, A. Alanazi, H. Yasmeen and A. Rehman (2022). Detection of *Klebsiella pneumoniae* antibiotic-resistant genes: An impending source of multidrug resistance dissemination through raw food. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29 (5): 3347-3353.
59. Khoza, T., G. Senyolo, V. Mmbengwa, P. Soundy and D. Sinnett (2019). Socio-economic Factors Influencing Smallholder Farmers Decision to Participate in Agro-processing Industry in Gauteng Province, South Africa. *Cogent Social Sciences*, 5(1).
60. Kim H. S., J. Chon, Y. Kim, D. Kim, M. Kim, K. Seo (2015). Prevalence and characterization of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in ready-to-eat vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 207: 83-86.
61. Kimera, Z. I., F. X. Mgaya, S. E. Mshana, E. D. Karimuribo, and M. N. Matee (2021). Occurrence of Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) Producers, Quinolone and Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated from Environmental Samples along Msimbazi River Basin Ecosystem in Tanzania. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18 (16): 8264.
62. Kumar, S., M. F. Varela (2013). *Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents*. Formatex Research Center.

63. Kwaku, G. M., S. P. Samson and M. F. Charles (2016). Resistance of Bacteria Isolates from Cabbage (*Brassica oleracea*), Carrots (*Daucus carota*) and Lettuce (*Lactuca sativa*) in the Kumasi Metropolis of Ghana. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 5 (4): 297-303.
64. Langa, Jéssica (2022). *Avaliação Da Qualidade Da Água Para O Consumo Humano Na Região Da Bacia Do Rio Infulene*. Tese de Licenciatura, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.
65. Langa, J. C., T. Zimba e A. Chaúque (2018). Padrão de Sensibilidade da *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* às cefalosporinas da 3ª geração. *Livro de Resumos da X Conferência Científica da Uem*.
66. Lee D., J. M. Gibson, J. Brown, J. Habtewold, H. M. Murphy (2023). Burden of disease from contaminated drinking water in countries with high access to safely managed water: A systematic review. *Water Res.*, 242.
67. Lochan H., V. Pillay, C. Bamford, J. Nuttall, B. Eley (2017). Bloodstream infections at a tertiary level paediatric hospital in South Africa. *BMC Infectious Disease*, 17:1-9.
68. Machado, O. V. O., M. C. A. Patrocínio, M. S. Medeiros e T. J. P. G. Bandeira (2019). *Antimicrobianos: Revisão Geral para Graduandos e Generalistas*. Fortaleza, EdUnichristus.
69. Magiorakos, A. P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas and C. G. Giske (2012). Multidrug-resistant, Extensively Drug-resistant Bacteria: Na International Purposal for Interim Standard Definition for Acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infections*, 18 (3).
70. Manhique-Coutinho, L., P. Chiani, V. Michelacci, E. Taviani, A. Bauhofer, A. Chissaque, I. Cossa-Moiane, J. Sambo, J. Chilaúle, E. Guimarães, J. Salência, M. Cassocera, D. Bero, J. Langa, and N. de Deus (2022). Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from children with diarrhea: A cross-sectional study in four provinces of Mozambique: Diarrheagenic *Escherichia coli* in Mozambique. *International Journal of Infectious Diseases*, 121: 190-194.
71. Martínez, José Luis e Fernando Baquero (2014). Emergence and spread of antibiotic resistance: Setting a parameter space. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 68-77.
72. Martins, Joana Cláudia (2021). *Detecção e Caracterização Molecular de Isolados de Enterobactérias Resistentes a Antibióticos em Produtos Frescos Prontos a Consumir*.

- Dissertação de Mestrado de Segurança Alimentar e Microbiologia Alimentar, Universidade de Coimbra, Coimbra.
73. Massinga, A., M. Garrine, A. Messa, N. Nobela, N. Boisen, S. Massora, A. Cossa, R. Varo, A. Siteo, J. Hurtado, J. Ordi, H. Mucavele, T. Nhampossa, R. Breiman, C. Whitney, D. Blau, Q. Bassat and I. Mandomando (2021). *Klebsiella* spp. cause severe and fatal disease in Mozambican children: antimicrobial resistance profile and molecular characterization. *BMC Infectious Disease*, 21: 526.
 74. Mesbah, Z. F., S. A. Granier, M. Marault, L. Yaici, B. Gassilloud, C. Manceau, A. Touati and Y. Millemann (2017). From Farms to Markets: Gram-Negative Bacteria Resistant to Third Generation Cephalosporins in Fruits and Vegetables in a Region of North Africa. *Front Microbiol*, 8:1569.
 75. MISAU- Ministério da Saúde e MASA- Ministério da Agricultura e Segurança Alimentar (2019). *Plano Nacional de Acção Contra a Resistência Antimicrobiana 2019-2023*. Maputo.
 76. Montso, K. P., S. B. Dlamini, A. Kumar and C. N. Ateba (2019). Antimicrobial Resistance Factors of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Cattle Farms and Raw Beef in North-West Province, South Africa. *BioMed research international*.
 77. Ngogang, M., T. Ernest, J. Kariuki, M. Mouiche, J. Ngogang, A. Wade, and M. Sande (2021). Microbial Contamination of Chicken Litter Manure and Antimicrobial Resistance Threat in an Urban Area Setting in Cameroon. *Antibiotics*, 10(1): 20.
 78. Nhantumbo, C., N. C. Vaz, M. Rodrigues, C. Manuel, S. Rapulua, J. Langa, H. Nhantumbo, D. Joaquim, M. Dosse and J. Sumbana (2023). Assessment of Microbial Contamination in the Infulene River Basin, Mozambique. *Water*, 15 (2): 219.
 79. Nhantumbo, Dércio Duarte (2016). *Impacto Sócio-económico das Associações Agrícolas: O Caso das Associações Ligadas a União das Cooperativas Agrícolas de Marracuene*. Tese de Licenciatura, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.
 80. Nikaido H, J. M. Pagès (2012). Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.*, 36(2):340-63.
 81. Njage P. M. and E. M. Buys (2015). Pathogenic and commensal *Escherichia coli* from irrigation water show potential in transmission of extended spectrum and AmpC β -lactamases determinants to isolates from lettuce. *Microb Biotechnol.*, 8 (3): 462-73.

82. Nogueira, H. S., A. R. Xavier, M. A. Xavier, A. A. Carvalho, G. A. Monção, N. A. Barreto (2016). Antibacterianos: Principais Classes, Mecanismos de Ação e Resistência. *Unimontes Científica*, 18(2).
83. Normanno, G., M. Corrente, G. La Salandra, A. Dambrosio and N. C. Quaglia (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 117(2).
84. Okafor N. (2011). Environmental Microbiology of Aquatic and Waste Systems. *Springer*, New York, 307.
85. Olawale S. I., A. O. Catherine, A. I. Olakunle, A. Z. Biola, O. O. Iyiola and M. Mariam (2023). Water Quality Assessment, Antibiotic Resistance and Plasmid Profiles of Bacteria Isolated from Asa River, Ilorin, Nigeria. *Iraqi Journal of Science*, 64 (12): 6148- 6157.
86. Oliveira, M., I. Viñas, J. Usall, M. Anguera, and M. Abadias (2012). Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *International journal of food microbiology*, 156(2): 133-140.
87. Oliveira, Junior e Wanda Reygaert (2024). Gram-Negative Bacteria. *StatPearls Publishing*.
88. Omole D. O., e E. O. Longe (2008). An Assessment of the Impact of Abattoir Effluents on River Illo, Ota, Nigeria. *Journal of Environmental Science and Technology*, 1 (2): 54-56.
89. Onu, O. S., C. I. Chikwendu and C. O. Nweke (2023). Antibiotic Resistance Profile of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Nworie River, Owerri, Imo State, Nigeria. *Journal of Advances in Microbiology*, 23 (7), 32-39.
90. Organização das Nações Unidas- ONU (2022). *Soma das Dimensões Ambientais da ONU para Resistência Antimicrobiana para os formuladores de políticas*. <https://www.unep.org/resources/report/summary-policymakers-environmental-dimensions-antimicrobial-resistance>.
91. Paczosa, M. K. e J. Meccas (2016). *Klebsiella pneumoniae*: indo para o ataque com uma defesa forte. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 80(3):629–661.
92. Pinto, António (1996). Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. *Millenium*, 4: 91-100.
93. Pires A.F., J. Stover, E. Kukielka, V. Haghani, P. Aminabadi, T. Ramos, M.T. Jay-Russell (2020). *Salmonella* and *Escherichia coli* prevalence in meat and produce sold

- at farmers' markets in Northern California. *Journal of Food protection*, 83(11): 1934-1940.
94. Pui, C. F., W. C. Wong, L. C. Chai, E. Nillian, F. M. Ghazali, Y. K. Cheah, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi and S. Radu (2011). Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella Typhi* and *Salmonella Typhimurium* in sliced fruits using multiplex PCR. *Food Control*, 22: 337-342.
 95. Quarcoo, G., L. A. B. Adamako, A. Abrahamyan, S. Armoo, A. A. Sylverken, M. G. Addo, S. Alaverdyan, N. S. Jessani, A. D. Harries and H. Ahmed (2022). What Is in the Salad? *Escherichia coli* and Antibiotic Resistance in Lettuce Irrigated with Various Water Sources in Ghana. *International Journal Environmental Resource and Public Health*.
 96. Ratshilingano M. T., E. M. du Plessis, S. Duvenage and L. Korsten (2021). Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Two Commercial Lettuce and Spinach Supply Chains. *Journal of Food Protection*, 85 (1): 122-132,
 97. Resende, J.A., V. L. Silva e C. G. Diniz (2020). Aquatic environments in the One Health context: modulating the antimicrobial resistance phenomenon. *Acta Limnológica Brasiliensia*, 32(10): 1-10.
 98. Reygaert Wanda (2018). An overview of the Antimicrobial Resistance Mechanisms of Bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3):482-501.
 99. Ribeiro, Sthefanie Da Silva (2016). *Padronização De PCR em Tempo Real Para Detecção KPC Bactérias de Carbapenemases Dos Tipos e NDM Produzidas Por Gram-Negativas*. Dissertação de Mestrado em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
 100. Richter, L., E. M. du Plessis, S. Duvenage and L. Korsten (2019). Occurrence, Identification, and Antimicrobial Resistance Profiles of Extended-Spectrum and AmpC β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* from Fresh Vegetable Retailed in Gauteng Province, South Africa. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16 (6): 421-427.
 101. Romyasmit C., P. Sornsenee, S. Chimplee, S. Yuwalaksanakun, D. Wongprot and P. Saengsuwan (2021). Prevalence and characterization of extended-spectrum-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from raw vegetables retailled in Southern Thailand. *PeerJ*, 9.

102. Roth, N., A. Käsbohrer, S. Mayrhofer, U. Zitz, C. Hofacre and K. Domig (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry science*, 98(4): 1791-1804.
103. Said, L. B., A. Jouini, N. Klibi, R. Dziri, C. A. Alonso, A. Boudabous, K. B. Slama, C. Torres (2015). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*.
104. Salvador, E., A. Chaúque, T. Irá e L. Monteiro (2016). Potential Risk for Spread Multidrug Resistant Enterobacteriaceae through *Lactuca sativa* (Alface) and *Allium fistulosum* L.(cebola galesa) do Vale do Infulene. *Jornal de Microbiologia Aplicada e Ambiental*, 4 (1): 21-24.
105. Santona A., J. Sumbana, M. Fiamma, M. Deligios, E. Taviani, S. Simbine, T. Zimba, J. Sacarlal, S. Rubino and B. Paglietti (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.
106. Sieber, G., D. Beisser, C. Bock and J. Boenigk (2020). Protistan and fungal diversity in soils and freshwater lakes are substantially different. *Scientific Reports*, 10 (1): 1-11.
107. Silva, M. M. e D. T. A. Araujo (2019). Análise De Sensibilidade/Resistência Microbiana: Resistência Microbiana Em Infecções Primárias Do Trato Respiratório E Urinário Confirmadas Laboratorialmente Associadas À Internação Da Clínica Médica Hospitalar E Sensibilidade Microbiana Da Parte Física De Setores Do Hospital. *Congresso Mineiro de Epidemiologia*.
108. Szekeres, E., A. Baricz, C. Chiriac, A. Farkas, O. Opriş, M. Soran, A. Andrei, K. Rudi, J. Balcazar, N. Dragos and C. Coman (2017). Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals. *Environmental Pollution*, 225.
109. Souza, J. B., K. S. Lima, L. V. Melo, W. V. Souza e J. I. F. Jesus (2022). Uso de Antimicrobianos Na Pecuária e a Resistência Microbiana Em Humanos. *IX Congresso Interdisciplinar- Mulher na Ciência Brasileira*, 9 (1).
110. Sufiana, M. V., J. J. Sumbana, J. C. Langa e T. Zimba (2021). Emergência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de Betalactamases de amplo espectro no Hospital Central de Maputo. *Livro de Resumos da XI Conferência Científica da Uem*.

111. Sultan, I., S. Rahman, A. T. Jan, M. T. Siddiqui, A. H. Mondal and Q. M. Haq (2018). Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1-16.
112. Teixeira, A. R., A. F. Figueiredo e R. F. França (2019). Resistencia Bacteriana relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos. *Revista Saúde em Foco*, 11.
113. Tejada, Natalia (2018). Women in farmer-led irrigation development: the case of Infulene Valley, Maputo- Mozambique. *Revista de Conflictos Sociales Latinoamericanos*, 7: 31-43
114. Tortora, G. J., B. R. Funke e C. L. Case (2012). *Microbiologia*. 10a ed., 967pp. Porto Alegre, Artmed.
115. Tortora, G. J., B. R. Funke e C. L. Case (2017). *Microbiologia*. 12a ed., 962pp. Porto Alegre, Artmed.
116. Varma, J. K., J. Oppong-Otoo, P. Ondo, O. Perovic, B. J. Park, R. Laxminarayan, R. W. Peeling, C. Schultsz, H. Li, C. Ihekweazu, A. A. Sall, B. Jaw e J. N. Nkengasong (2018). Africa Centres for Disease Control and Prevention's framework for antimicrobial resistance control in Africa. *Afr J Lab Med.*, 7(2):830.
117. Vieira, P. N. e SL Vieira (2017). Uso Irracional e Resistência a Antimicrobianos em Hospitais. *Arquivo de Ciência da Saúde*, 3: 209-212.
118. World Health Organization- WHO (2017). *Relatório anual sobre resistência*.
119. World Health Organization- WHO (2018). *Guidelines on sanitation and health*.
120. World Health Organization- WHO (2022). *Antimicrobial resistance TrACSS Mozambique country profile*.
121. Wyres K. L., M. M. Lam, K. E. Holt (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*, 18(6):344–359.
122. Yakoot, M., S. Helmy and K. Fawal (2011). Pilot study of the efficacy and safety of lettuce seed oil in patients with sleep disorders. *Int. J. Med.*, 4:451.
123. Ye Q., Q. Wu, S. Zhang, J. Zhang, G. Yang, J. Wang, L. Xue, M. Chen (2018). Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae from Retail Food in China. *Frontiers in Microbiology*, 9:1709.
124. Yigrem, C., R. Fisseha and B. Eribo (2021). Characterization of Carbapenem and β -lactam Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Associated with Leafy Vegetables and Clinical Isolates from Gondar, Ethiopia. *Journal of Microbiology Research*, 11 (1): 21-32.

125. Zekar, F. M., S. A. Granier, A. Touati and Y. Millemann (2020). Occurrence of Third-Generation Cephalosporins-Resistant *Klebsiella pneumonia* in Fresh Fruits and Vegetables Purchased at Markets in Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 26 (4): 353-359.

13. Anexos



Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas



Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de Bactérias Gram-Negativas isoladas em Amostras de Alfaces (*Lactuca sativa*) e Água do Vale de Infulene, cidade da Matola

Questionário Sobre os Dados Demográficos dos produtores participantes e condições de cultivo na produção de alface

Caro produtor, o presente questionário serve de instrumento para desenvolver a pesquisa supracitada, cujo o objectivo é avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas em amostras de alfaces (*Lactuca sativa*) e água do Vale de Infulene, cidade da Matola. Para o alcance dos objectivos, solicitamos a sua pronta colaboração para o preenchimento do questionário, fornecendo respostas, para as questões apresentadas. Desde já, agradecemos pela colaboração.

Nome do produtor: _____

Código do produtor: _____

I. Identificação do participante

1. Sexo:

A. Masculino ()

B. Feminino ()

2. Idade? |____| |____|

3. Residência:

Província: _____

Distrito: _____

Bairro: _____

II. Condições de cultivo

4. Utiliza algum tipo de estrume?

A. Sim ()

B. Não ()

5. Que tipo de estrume utiliza?

A. Fezes bovinas ()

B. Fezes de aves (galinha) ()

C. Serradura de madeira ()

D. Serradura de madeira com fezes bovinas ()

E. Serradura de madeira com fezes de galinha ()

F. Outro () _____

6. Fonte primária do estrume (vendedores do estrume)

A. Capoeiras ()

B. Currais ()

C. Carpintarias ()

D. Outra () _____