



FACULDADE DE VETERINÁRIA

LICENCIATURA EM MEDICINA VETERINÁRIA

DEPARTAMENTO DE SANIDADE E SAÚDE PÚBLICA

TRABALHO DE CULMINAÇÃO DE ESTUDOS

**PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS DA *ESCHERICHIA COLI*
ISOLADA DE FEZES DE BOVINOS EM FARMAS LOCALIZADAS PRÓXIMO AO
PARQUE NACIONAL DE MAPUTO**

TITO DA SILVA JOSÉ ESTRONGOMENE TITO

SUPERVISOR: Prof. Doutor José Manuel Fafetine

CO-SUPERVISORA: dra. Vanessa Alexandra Comé

Maputo, outubro de 2024

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, Tito da Silva José Estrongomene Tito, declaro por minha honra que o presente trabalho com o título “Perfil de sensibilidade a antibióticos da *Escherichia coli* isolada de fezes de bovinos em farmas localizadas próximo ao Parque Nacional de Maputo” é fruto do meu empenho, dedicação, participação em toda as fases de colheita e processamento de dados, e das orientações dos meus supervisores. O seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas estão devidamente mencionadas no texto e nas referências bibliográficas. Este trabalho nunca foi usado para a obtenção de qualquer grau académico nesta ou em qualquer outra instituição de ensino.

Maputo, outubro de 2024

(Tito da Silva José Estrongomene Tito)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Leontina Langa e Raimundo Nhabanga.

Aos meus irmãos Lurdes Mandlate, Bela Estrongomene, Abel e Zita Crisano e Felipe.

AGRADECIMENTOS

À Deus!

Aos meus pais, cujo amor, apoio e incentivo inabaláveis foram fundamentais para minha jornada académica. Sem o apoio deles, nada disso seria possível.

Agradeço também aos meus dedicados supervisores, Prof. Doutor José Fafetine e a dra. Vanessa Comé, por sua orientação valiosa, paciência e inspiração ao longo deste processo. Suas orientações moldaram não apenas meu trabalho, mas também meu crescimento a nível académico.

Quero destacar a amizade e o apoio incondicional dos meus colegas Benjamim e Aik. Sua presença constante e encorajamento foram um farol nos momentos mais desafiadores. Agradeço especialmente a esses amigos que estiveram ao meu lado durante toda essa jornada.

Não poderia deixar de mencionar meus colegas e amigos do Ludo, cujo companheirismo e troca de conhecimento tornaram essa jornada não apenas educativa, mas também incrivelmente divertida.

Ao Centro de Biotecnologia e ao Projecto Italiano BioForMoz, pelo suporte financeiro.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho e para o meu crescimento pessoal e académico. Este é apenas o começo de uma jornada mais longa, e estou profundamente grato por cada pessoa que fez parte dela.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **Ac.-** Ácido
- **ADN-** Ácido desoxiribonucléico
- **AMC** - Amoxiciclina + Ac. Clavulánico
- **ARN** -Ácido ribonucléico
- **ASH** – Água saneamento e hygiene
- **C** - Clorafenicol
- **CIP** - Ciprofloxacina
- **EMB** - Eosin-methylene blue
- **Et al.** -E colaboradores
- **FAO** -Food and Agriculture Organization
- **FOX** – Cefoxitina
- **GARP** - Grupo de Trabalho da Parceria Global da Resistência a Antibióticos
- **GLASS** - Sistema Global de Vigilância da Resistência e Uso de Antimicrobianos
- **IMViC** - Indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato
- **INS** - Instituto Nacional de Saúde
- **MAC** - Ágar MacConkey
- **MRSA** – Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*
- **MTZ** - Metronidazol
- **OT** – Oxitetraciclina
- **P** - Penicilina G
- **PABA** - Ácido paraminobenzoico
- **PBPs** - Proteínas ligadores de penicilinas
- **TE** – Tetraciclina
- **WHO** - World Health Organization
- **µm**- Micrómetro.

LISTA DE SÍMBOLOS

- **°C** -Graus Celcius
- **%**- Percentagem
- **≤** - Menor ou igual
- **≥** - Maior ou igual

LISTA DE FIGURAS:

Figura I. Localização das localidades incluídas do estudo	16
Figura II. Colheita das amostras.....	17
Figura III. Colónias sugestivas de <i>E. coli</i> em agar MacConkey	17
Figura IV. <i>E. coli</i> - coloração de Gram- objectiva 100x.....	18
Figura V. Provas bioquímicas para confirmação da <i>E. coli</i>	18
Figura VI. Placa de Petri com uma cultura de <i>E. coli</i> impregnada com discos de antibióticos no meio Muller.	19

LISTA DE TABELAS:

Tabela I Valor de halos inibitórios esperados para Enterobacteriaceae - Manual de Antibiograma 2019.....	19
Tabela II: Inquérito sobre o uso de medicamentos em 4 criadores próximo do Parque Nacional de Maputo	20
Tabela III: Perfil de sensibilidade a 5 antibióticos de 37 amostras de <i>E. coli</i> isolada de fezes de bovinos de criadores próximo do Parque Nacional de Maputo.....	21
Tabela IV Comparação dos resultados da sensibilidade da <i>E. coli</i> entre os criadores.	21

ÍNDICE

1	RESUMO.....	1
2	INTRODUÇÃO.....	2
3	OBJECTIVOS.....	5
3.1	Objectivo geral.....	5
3.2	Objectivos específicos.....	5
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
4.1	<i>Escherichia coli</i>	6
4.1.1	Habitat.....	6
4.1.2	Características.....	6
4.1.3	Identificação.....	7
4.1.4	Importância da <i>E. coli</i> no estudo da resistência.....	7
4.2	Antibióticos.....	7
4.2.1	Mecanismos de acção.....	8
4.3	Resistência aos antibióticos.....	9
4.3.1	Mecanismos de Resistência.....	10
4.4.	Uso de antibióticos na pecuária.....	13
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
5.1.	Área de estudo.....	16
5.2.	Inquérito.....	16
5.3.	Colheita das amostras.....	16
5.4.	Isolamento de <i>Escherichia coli</i>	17
5.5.	Coloração de Gram.....	18
5.6.	Provas bioquímicas.....	18
5.7.	Antibiograma.....	19
6.	RESULTADOS.....	20

7. DISCUSSÃO.....	23
8. CONCLUSÕES.....	26
9. RECOMENDAÇÕES	27
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
11. ANEXOS	33

1 RESUMO

Os antibióticos vêm sendo utilizados há vários anos para o tratamento de diversas doenças em humanos assim como em animais. Porém, com o passar dos anos, percebeu-se que alguns antibióticos estavam a perder sua eficácia devido a capacidade que os microrganismos adquiriram para resistir-lhes, o que resulta em mortes e em tratamentos mais caros por se recorrer a uma segunda linha de medicamentos ou ainda pelo uso prolongado dos mesmos. Pouco se sabe sobre a taxa de resistência a antibióticos na prática veterinária em Moçambique. O presente trabalho teve como objectivo avaliar a sensibilidade a diferentes antibióticos da *Escherichia coli* isolada de fezes de bovinos pertencentes a criadores de 8 localidades que se encontram em zonas próximas do Parque Nacional de Maputo. Após a colheita das amostras, procedeu-se ao isolamento das bactérias em agar MacConkey e a identificação pela coloração de Gram e testes bioquímicos. A sensibilidade da *E. coli* foi avaliada pelo método de difusão em agar aos antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico, clorafenicol, oxitetraciclina e tetraciclina. De novembro de 2022 a junho de 2023, foram colhidas e analisadas 120 amostras de fezes de bovinos das quais obteve-se 114 culturas de *Escherichia coli*. Destas, 37 foram testadas para a sensibilidade aos antibióticos. A tetraciclina foi o antibiótico mais eficaz (95%) e a amoxicilina com ácido clavulânico, o antibiótico cujas bactérias mostraram maior resistência (8,1%). Segundo os criadores das localidades onde foram colhidas as amostras, a amoxicilina é um dos antibióticos mais utilizados no tratamento dos animais, o que pode explicar a elevada resistência das bactérias a esse antibiótico quando comparada a outros.

2 INTRODUÇÃO

Antibióticos são medicamentos que actuam inibindo a multiplicação das bactérias, destruindo suas paredes celulares e interferindo na síntese de proteínas essenciais o que permite o controle e a eliminação de infecções (Rang *et al.*, 2016).

Foi observado que as bactérias podiam tornar-se resistentes aos antimicrobianos e estirpes resistentes emergiam logo após a introdução de novas drogas, realçando a íntima relação entre o uso de antibióticos e desenvolvimento de resistência. Este fenómeno pode ocorrer de forma intrínseca ou natural decorrente de um factor estrutural ou funcional, associado com espécies bacterianas, um género ou mesmo um grande grupo, como é o caso das bactérias gram-negativas que são intrinsecamente resistentes aos glicopeptídeos, devido a sua membrana externa impermeável a esses antibióticos (Guardabassi e Kruse, 2010).

A resistência adquirida resulta de alterações genéticas no genoma bacteriano, que podem ser uma consequência de mutações ao acaso ou não em genes próprios ou aquisição horizontal de genes exógenos. As bactérias podem adquirir genes de resistência pela captura de ADN (transformação), via bacteriófagos (transdução) ou pela transferência de célula para célula (conjugação). A conjugação é o mecanismo mais importante para a transferência de genes de resistência devido ao seu vasto espectro de hospedeiros e à localização frequente de genes de resistência em elementos conjugativos como plasmídeos e transposons como é observado nas bactérias Gram-negativas. Em alguns casos, a resistência pode também resultar da combinação de eventos de mutação e de transferência de genes tal como a resistência a cefalosporina devido à extensão do espectro da β -lactamase (Guardabassi e Kruse, 2010).

O uso de antibióticos no tratamento ou prevenção de doenças não é a única causa de resistência aos antimicrobianos, pois para muitas bactérias patogénicas, os antimicrobianos usados para tratá-las e os genes que conferem resistência têm origens ambientais e alguns genes de resistência importantes, como as beta-lactamases, têm milhões de anos (Holmes *et al.*, 2016). A resistência antimicrobiana a uma ampla variedade de drogas foi demonstrada em bactérias ambientais isoladas da era pré-antibiótica, bem como de vários locais (por exemplo, cavernas) livres de outras fontes de exposição a antimicrobianos modernos. Por outro lado, a indústria farmacêutica deposita altas concentrações de antimicrobianos nas águas superficiais contribuindo para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos assim como a libertação para o ambiente dos constituintes de esgoto

humano e esterco de gado juntamente com bactérias fecais e genes de resistência (Finley *et al.*, 2013).

A *Escherichia coli* é uma espécie de bactérias pertencente a família Enterobacteriaceae. São bacilos Gram-negativos, de até 3 µm de comprimento, móveis por flagelos peritríquios e frequentemente fimbriada. Esta bactéria tem a capacidade de fermentar a lactose, reduzir nitrato, é oxidase-negativo, catalase-positivo, anaeróbia facultativa e não forma esporos. É encontrada naturalmente nos intestinos de animais de sangue quente e contamina a vegetação, o solo e a água (Quinn *et al.*, 2007).

Quando cultivada no meio agar MacConkey fermenta a lactose e o meio ao redor fica rosa devido a produção de ácido a partir da lactose. Em agar Eosina-azul de metileno [EMB (Eosin-methylene blue)], têm um brilho metálico. Nos testes IMViC (produção de indol, teste do vermelho de metila, teste de Voges-Proskauer e utilização do citrato) forma um grupo de reacções bioquímicas usadas para diferenciar a *E. coli* de outros fermentadores de lactose da família das enterobactérias. A *E. coli* possui antígenos somáticos (O) que são de natureza lipopolissacarídica localizando-se na superfície da parede celular; flagelares (H) de natureza protéica, e, por vezes, capsulares (K) que são compostos polissacarídeos usados para a sua serotipagem. A especificidade desses antígenos é determinada pelas cadeias laterais de carboidratos. As fímbrias (F), antígenos protéicos, agem como adesinas, facilitando a aderência a superfícies mucosas (Quinn *et al.*, 2007).

A colonização do trato intestinal de mamíferos por *E. coli* de fontes ambientais, ocorre logo após o nascimento e esta persiste como membro importante da microbiota normal do intestino por toda a vida. Muitas linhagens de *E. coli* são de baixa virulência mas podem causar infecções oportunistas em localização extra-intestinal, como glândula mamária e trato urinário (Quinn *et al.*, 2007).

O facto da *E. coli* ser habitante natural dos intestinos permite o contacto com diversos antibióticos assim como outras bactérias do ambiente, o que resulta numa interacção constante e pode levar a resistência. Na Bélgica foi observado que a diminuição do uso de antibióticos resultou na diminuição significativa da resistência da *E. coli* a diferentes antibióticos em diversos animais de produção (Callens *et al.*, 2018).

Estudos sobre o uso de antibióticos nos animais em Moçambique são limitados, resultando na escassez de informação sobre a resistência a esses medicamentos. Os dados disponíveis indicam que os antibióticos são frequentemente empregues como

promotores de crescimento em aves, enquanto em outros animais, são usados para tratar doenças sem diagnóstico prévio, o que pode agravar a resistência bacteriana. Além disso, a falta de conhecimento sobre o uso de antibióticos e leis eficazes para regulamentar seu comércio e uso contribuem significativamente para o desenvolvimento da resistência bacteriana (GARP, 2015).

Para lidar com a resistência antimicrobiana, a Food and Agriculture Organization (FAO, 2016) criou cinco pilares:

- Melhorar a conscientização e compreensão da resistência antimicrobiana por meio de comunicação, educação e treinamento eficazes;
- Fortalecer o conhecimento e a base de evidências por meio de vigilância e pesquisa;
- Reduzir a incidência de infecções por meio de saneamento, higiene e medidas eficazes de prevenção;
- Optimizar o uso de medicamentos antimicrobianos na saúde humana e animal;
- Desenvolver o argumento económico para o investimento sustentável que leve em conta as necessidades de todos os países e aumentar o investimento em novos medicamentos, ferramentas de diagnóstico, vacinas e outras intervenções.

A produtividade é um factor muito importante para o desenvolvimento pecuário, sendo importante que os animais estejam saudáveis e quando doentes tratados de forma adequada de modo que se possam reproduzir e produzir carne de qualidade.

A interacção dos animais entre unidades de produção e áreas de conservação pode facilitar a propagação de genes de resistência bacteriana, representando uma ameaça significativa à vida selvagem em reservas naturais e aos esforços de conservação. Além disso, essa interação pode transferir genes de resistência entre animais selvagens e domésticos. O problema da resistência antimicrobiana, especialmente por *E. coli*, está crescendo tanto em animais quanto em humanos, mas é menos documentado em infecções animais. Esse vazio de pesquisa torna essencial este estudo, que visa compreender melhor a situação no país e seu impacto na saúde animal. O presente trabalho teve como objectivo avaliar a sensibilidade a diferentes antibióticos da *E. coli* isolada de fezes bovinas pertencentes a criadores localizados em zonas próximas da área de conservação do Parque Nacional de Maputo de modo a contribuir para o conhecimento da situação da sensibilidade nesta região.

3 OBJECTIVOS

3.1 Objectivo geral

- Avaliar a sensibilidade a diferentes antibióticos da *E. coli* isolada de fezes de bovinos pertencentes a criadores localizados em zonas próximas do Parque Nacional de Maputo.

3.2 Objectivos específicos

- Conhecer os principais antibióticos utilizados e sua frequência de utilização nos bovinos através de um inquérito;
- Isolar e identificar a *E. coli* de amostras de fezes;
- Avaliar a sensibilidade da *E. coli* aos antibióticos através do antibiograma.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* é uma bactéria gram-negativa isolada pela primeira vez em 1885 pelo médico pediatra alemão Theodor Escherich de fezes de humanos saudáveis, a que chamou de *Bacillus coli commune*. Mais tarde em 1918 os médicos Aldo Castellani e Albert John Chalmers sugeriram a mudança do nome para *Escherichia coli*, nome pelo que é designada até os dias atuais (Friedmann, 2014).

O género *Escherichia* pertence a família das *Enterobacteriaceae* e é um género com diversas espécies como a *Escherichia albertii*, *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris* (Trabulsi e Alterthum, 2008).

4.1.1 Habitat

A *E. coli* é normalmente encontrada no intestino de humanos e animais de sangue quente (WHO, 2018). Até 1950, este microrganismo foi considerado como habitante não patogénico do trato entérico do ser humano e dos animais de sangue quente (Wastenson, 2001). É um importante comensal da microbiota intestinal dos mamíferos saudáveis, coexistindo sem causar danos ao hospedeiro (Wu *et al.*, 2008) e pode ser benéfica para os seus hospedeiros ao produzir vitamina K, e impedir que se estabeleçam bactérias patogénicas no trato intestinal (Hudault *et al.*, 2001).

A maioria das estirpes de *E. coli* são inofensivas, mas alguns serotipos podem causar graves intoxicações alimentares nos seres humanos, e são ocasionalmente responsáveis pela recolha de produtos alimentícios devido a sua contaminação (Serapio-Palacios *et al.*, 2022). A identificação das estirpes patogénicas de *E. coli* fundamenta-se, principalmente, na detecção dos genes de virulência associados a cada categoria do enteropatógeno. Para essa análise, utiliza-se métodos moleculares (Nataro e Kaper, 1998).

4.1.2 Características

A *E. coli* é uma bactéria mesófila, com temperatura óptima de crescimento de 37°C e pH ideal de 7 a 7,5 (Tortora *et al.*, 2016). São bacilos Gram-negativos, de até 3 µm de comprimento, móveis por flagelos peritríquios e frequentemente fimbriada. Essas bactérias têm capacidade de fermentar a lactose, reduzem nitrato, são oxidase-negativo, catalase-positivo, anaeróbios facultativos e não formam esporos. É encontrada naturalmente nos

intestinos de animais de sangue quente e contaminam a vegetação, o solo e a água (Quinn *et al.*, 2007; Forsythe, 2013).

4.1.3 Identificação

A *E. coli* pode ser isolada utilizando meios de cultura que contenham lactose, como o ágar MacConkey (MAC). Neste ágar, pela produção de ácido a partir da lactose, as colônias típicas de *E. coli* apresentam coloração roseo-avermelhadas (Koneman, *et al.*, 2012; Quinn *et al.*, 2007) e em agar Eosina-azul de metileno [EMB (Eosin-methylene blue)], têm um brilho metálico (Quinn *et al.*, 2007). Pode-se confirmar a *E. coli* pela realização de testes bioquímicos incluindo os meios de cultura contidos nos testes IMViC (produção de indol, teste do vermelho de metila, teste de Voges-Proskauer e de utilização do citrato). Nestes meios serão avaliadas algumas características como a capacidade de hidrolisar a ureia e a de utilizar o citrato, a presença de gás, a motilidade e a descarboxilação da lisina. Esses testes formam um grupo de reações bioquímicas usadas para diferenciar a *E. coli* de outros fermentadores de lactose da família das enterobactérias (Trabulsi e Alterthum, 2008; Quinn *et al.*, 2007).

4.1.4 Importância da *E. coli* no estudo da resistência

Embora a *E. coli*, seja encontrada naturalmente nos intestinos dos mamíferos sem causar doença, pode actuar como reservatório de genes de resistências a antimicrobianos, que podem ser transmitidos a outras bactérias patogénicas (Siqueira, 2015). Devido às suas características, como facilidade de cultivo, patogenicidade, presença na microbiota normal de animais e humanos, ocorrência no meio ambiente e seu papel na transferência de genes de resistência entre humanos e animais, a *E. coli* é amplamente empregada como indicador de resistência a antimicrobianos em animais de produção e em humanos (Mesa-Verona *et al.*, 2021).

4.2 Antibióticos

Antibióticos são substâncias químicas capazes de inibir o crescimento ou destruir bactérias e outros microrganismos, podendo ser naturais ou sintéticos (Brunton *et al.*, 2006; Tavares, 2014). Estes, são naturalmente produzidos por microrganismos como fungos (por exemplo a penicilina), bactérias (por exemplo a tetraciclina e eritromicina), ou podem ser produzidos de forma sintética (caso das sulfonamidas e fluoroquinolonas) ou ainda semi-sintética (casos da amoxicilina, claritromicina e doxiciclina) (Guardabassi e Kruse, 2010; Tavares, 2014).

4.2.1 Mecanismos de acção

A acção dos antimicrobianos é focada em quatro principais mecanismos biológicos: biossíntese da parede celular, biossíntese de proteína, biossíntese da coenzima folato, e replicação e reparação de ADN (Walsh, 2003). Tavares (2014) descreve cada mecanismo da seguinte forma:

- Biossíntese da parede celular: os antibióticos actuam bloqueando a formação da parede celular bacteriana, composta principalmente de peptidoglicano, interferindo na síntese dos componentes da parede celular e também antagonizam as enzimas envolvidas na formação da parede celular, levando à lise da bactéria. Isso é exemplificado pelas penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos beta-lactâmicos, que inibem a síntese da parede celular, agindo em várias etapas da formação do mucopeptídeo;
- Biossíntese de proteína: os antibióticos interferem na cadeia de formação das proteínas ligando-se irreversivelmente às ARN-polimerases (por exemplo a rifamicina) das bactérias, o que compromete todo o processo da síntese protéica e leva a morte da bactéria pela não renovação de seus constituintes vitais. Exercem acção bacteriostática (tetraciclina e clorafenicol) e a rifamicina pode exercer tanto acção bacteriostática como acção bactericida;
- Biossíntese da coenzima folato: a síntese dos ácidos nucleicos baseia-se numa sequência metabólica de derivados do ácido fólico, da qual participam diferentes redutases e sintetases, que podem ser inibidas por quimioterápicos sulfamídicos e diaminopirimidínicos, como a trimetoprima e a pirimetamina. A maioria das bactérias precisa sintetizar o ácido fólico a partir do ácido paraminobenzoico (PABA) presente na matéria orgânica. Por acção de redutases, o ácido fólico é reduzido a ácido folínico e este passa à sua forma activa, os tetraidrofolatos, que são cofactores para a formação de bases purínicas e pirimidínicas (timina, adenina, guanina e metionina). Estas unem-se a uma pentose (ribose ou desoxirribose) e originam nucleosídeos (timidina, guanosina, adenosina e outros), os quais, ao se ligarem, formarão o ARN e ADN. O mecanismo de acção dos antimicrobianos (exemplo as sulfonamidas e a trimetoprima) consiste em inibir a sequência da síntese de ácidos nucleicos e de proteínas. Como resultado dessas acções, o efeito das sulfonamidas e da trimetoprima é primariamente bacteriostático;
- Replicação e reparação de ADN: O ADN-cromossómico é formado por duas cadeias de nucleotídeos em espiral, que se encontram enroladas e muito

apertadas, a fim de ocuparem o menor espaço na célula. Esta forma do ADN é controlada por acção da enzima topoisomerase II. Na divisão celular, a topoisomerase II provoca uma incisão longitudinal nas cadeias do ADN-cromossómico, que se separam. Por acção de outra enzima, a ADN-polimerase, forma-se uma cadeia de nucleotídeos complementar a cada uma das cadeias antigas, que são ligadas a estas novamente pela acção da topoisomerase II, voltando a ocorrer, a seguir, o superespiralamento do ADN. O superespiralamento e a replicação do ADN-cromossómico também são controlados pela topoisomerase IV e esta última é específica nas bactérias gram-positivas. Um dos antibióticos que agem por este mecanismo são as quinolonas. Por este mecanismo de acção, o ADN tem suas espirais relaxadas, ocupando um espaço maior na bactéria levando o rompimento da célula bacteriana.

4.3 Resistência aos antibióticos

A resistência bacteriana é a insensibilidade desenvolvida por algumas bactérias para não sofrerem acção dos antibióticos (Guardabassi e Kruse, 2010).

A OMS relata que a resistência aos antibióticos é um problema natural que surge ao longo do tempo, muitas vezes devido a mudanças genéticas. Organismos resistentes podem ser encontrados em pessoas, animais, alimentos, plantas e no ambiente (água, solo e ar). Eles podem se espalhar de pessoa para pessoa ou entre pessoas e animais, especialmente através de alimentos de origem animal (WHO, 2021)

Os principais motivos para esse problema incluem o uso inadequado e excessivo de antibióticos; a falta de acesso a água potável; saneamento e higiene (ASH) inadequado tanto para pessoas quanto para animais; práticas de prevenção e controlo de doenças inadequadas em hospitais e fazendas; dificuldades no acesso a medicamentos, vacinas e diagnósticos de qualidade e acessíveis; falta de consciência e conhecimento por parte da população; e a não conformidade com as leis em países que têm regulamentação para controlar o uso de medicamentos (WHO, 2021)

A resistência surge quando bactérias mudam ao longo do tempo e param de responder aos medicamentos, tornando as infecções mais difíceis de tratar e aumentando o risco de propagação de doenças, aparecimento de formas graves de doenças e morte (WHO, 2021). A resistência também pode ser definida como a capacidade da bactéria de

crescer *in vitro* em presença da concentração inibitória que uma droga atinge no sangue Tavares (2014). Esta resistência pode ser:

- Simples: quando a bactéria é resistente a um só antibiótico;
- Múltipla: quando a bactéria é resistente a mais de um antibiótico e
- Cruzada: quando o mecanismo químico para a resistência para um antibiótico é o mesmo para resistir a outro (ou outros) antibiótico.

4.3.1 Mecanismos de resistência

Segundo Tavares (2014), Guardabassi e Kruse (2010) a resistência também pode ser classificada da seguinte forma:

- Natural: caracteriza uma determinada espécie bacteriana e é de carácter hereditário, transmitido verticalmente às células-filhas e determinado por genes cromossómicos, os quais fazem com que na célula bacteriana não haja receptores para a acção dos antibióticos ou determinam a existência de estruturas e mecanismos que impedem a acção do antibiótico. Os bacilos gram-negativos são naturalmente resistentes à penicilina G e esta resistência está relacionada à composição das membranas externas da sua parede celular, que impede o antibiótico de atravessar esta estrutura para ligar-se ao seu receptor. A resistência natural também pode ser devida à produção de enzimas que inactivam o antibiótico;
- Adquirida: é resultado de modificações na estrutura ou no funcionamento da célula bacteriana, decorrentes de factores genéticos adquiridos por mecanismos que alteram o ADN bacteriano ou afectam elementos extra-cromossómicos formados por segmentos de ADN, denominados plasmídeos.

É possível contornar a resistência natural conhecendo o espectro de acção de um antibiótico, mas por outro lado a resistência adquirida é a causa de importantes problemas clínicos, por ser variável. A aquisição de resistência por uma célula bacteriana sensível é sempre decorrente de uma alteração genética que se expressa bioquimicamente (Tavares, 2014).

4.3.1.1. Tipos de resistência Adquirida

Vários são os mecanismos de resistência adquirida nas bactérias e é por isso que fica cada vez mais difícil combater a resistência pois a existência de uma bactéria resistente pode significar proliferação dessa capacidade de resistir a diversas outras quando não

tomadas medidas certa de controlo. Segundo Tavares (2014) os mecanismos de resistência adquirida podem ser divididos da seguinte forma:

- a)** Transformação: ocorre quando uma célula receptora, capta ADN solúvel proveniente de uma parte ou de todo cromossomo ou plasmídeo liberado no meio por uma bactéria doadora, podendo incorporar ao seu cromossoma ou aos seus plasmídeos. Habitualmente, só ocorre entre bactérias da mesma espécie (por exemplo em espécies de bactérias gram-negativas);
- b)** Transdução: consiste na transferência de material genético de uma bactéria para outra, por meio de bacteriófagos. Os bacteriófagos ao utilizarem o ADN bacteriano para sua multiplicação podem incorporar ao genoma das novas bactérias, partículas virais com fragmentos de ADN cromossômico ou plasmídeo da bactéria anteriormente parasitada, contendo genes de resistência. É um mecanismo limitado de transferência de resistência, pois assim como a transformação, só ocorre entre bactérias da mesma espécie;
- c)** Conjugação: consiste na transferência de material genético de uma célula bacteriana viável para outra, através do contato físico entre elas, realizado por uma fímbria sexual, ou diretamente pelo contato célula a célula. A fímbria é formada pela bactéria doadora por um plasmídeo conjugativo, ocorrendo a passagem deste plasmídeo para a célula receptora, sem perda do caráter pela célula doadora, devido à replicação do ADN plasmidial (exemplo dos bacilos gram-negativos). A transferência pelo contato célula a célula é observada entre os cocos Gram-positivos (estreptococos, enterococos e estafilococos), resultante da secreção pela célula doadora de uma feromona, que provoca a adesão e a agregação da célula doadora às células receptoras, possibilitando a transferência dos plasmídeos conjugativos chamados factores R e, que podem apresentar genes de resistência para dois ou três antibióticos;
- d)** Transposição: ocorre quando genes de um plasmídeo são transferidos para outro plasmídeo, para um cromossoma ou para um bacteriófago e também como do cromossoma para plasmídeos, dentro de uma mesma célula. Essa transferência se dá através de transposons;
- e)** Resistência Induzida: é a produção, pela célula bacteriana, de um determinado elemento, quando submetida à acção de outro elemento. É um fenómeno genético resultante da libertação de genes responsáveis por determinadas características da célula que estavam reprimidas por um outro gene produtor de uma substância repressora. A resistência induzida pelos

antibióticos beta-lactâmicos entre os bacilos gram-negativos resulta da indução da síntese de beta-lactamases, conseqüente à interacção entre o antibiótico e o repressor.

4.3.1.2. Mecanismos bioquímicos de resistência

Os vários mecanismos de resistência são codificados geneticamente e podem também manifestar-se bioquimicamente. Segundo Tavares (2014) e Tortora *et al.* (2016) as bactérias podem apresentar os seguintes mecanismos bioquímicos de resistência:

- a) Inativação enzimática: ocorre por meio de um bloqueio ou alteração enzimática da estrutura do antibiótico. É um dos mecanismos mais importantes de resistência bacteriana e tem como exemplo as betalactamases que inactivam os antibióticos beta-lactâmicos. Estas enzimas, hidrolisam os anéis de amida do anel beta-lactâmico, o que causa destruição irreversível do antibiótico.
- b) Efluxo: genes de resistência se manifestam fenotipicamente estimulando a produção de proteínas na membrana citoplasmática responsáveis pelo efluxo (retirada) de antibióticos da célula bacteriana. É um dos principais mecanismos utilizados pelas bactérias gram-negativas entéricas para resistirem as tetraciclina, e, estas obtêm essa capacidade pela existência de plasmídeos R conjugativo;
- c) Alteração do receptor da droga: geralmente adquirida por mutação cromossômica, este mecanismo de resistência caracteriza-se pela modificação do sítio de ligação ou diminuição da afinidade com os antibióticos pelas proteínas ligadores de penicilinas (PBPs) que normalmente é o sítio de ligação dos betalactâmicos. Esta diminuição de afinidade pode resultar na ausência ou diminuição das PBPs, produção amentada de PBPs de menos importância para os antibióticos, produção de uma PBP com pouca afinidade aos antibióticos e modificação na PBP que é o sítio alvo do antibiótico;
- d) Modificação do sistema metabólico activo para o antibiótico e síntese de vias metabólicas alternativas: alguns antibióticos agem inibindo a síntese dos ácidos nucleicos inibido a acção das redutases e sintetases. Algumas bactérias (exemplo as enterobactérias) produzem dihidropteroato-reductase que reduz a sensibilidade as sulfonamidas, diidropteroato- sintetase adicional à normalmente existente que resiste fortemente a inibição das sulfonamidas mantendo o metabolismo dos folatos, dihidrofolato- reductase com menor afinidade pela trimetoprima e síntese de vias metabólicas alternativas com a produção de dois tipos de diidrofolato- reductase, uma das quais não é inativada pela trimetoprima e

passa a comandar a síntese dos tetraidrofolatos quando a outra reage com a droga.

4.4. Uso de antibióticos na pecuária

Em sistemas de criação extensivos, ou intensivos de grande escala em que há mistura de lotes, os animais mais jovens estão mais propensos a doenças, e, para prevenir os danos causados por doenças, os antibióticos são usados terapêuticamente, profilaticamente ou como promotores de crescimento (Wegener 2003; Levy e Marshall, 2004).

Há um aumento frequente no número de bactérias resistentes a antibióticos na microbiota intestinal, e uma das principais fontes é a cadeia alimentar envolvendo animais de produção. Isso ocorre devido ao uso inadequado de antibióticos nos sistemas de produção, o que representa uma falha significativa na prevenção da resistência bacteriana (Ramos *et al.*, 2020).

Pesquisas têm demonstrado que as bactérias têm-se adaptado ao uso prolongado de antibióticos tornando-se resistentes e, podem manter a resistência mesmo na ausência do factor estimulante. Por outro lado alguns estudos também concluíram que ao parar de usar antibióticos como promotores de crescimento, a resistência diminui (de 60 a 80% no caso das tetraciclínas) (Bogaard e Stobberingh, 2000).

Há uma necessidade urgente de controlar a venda e uso de antibióticos pois não só animais domésticos e humanos estão sendo directamente afectados. Estudos têm mostrado que a bactéria MRSA (methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*) está presente em animais selvagens. Isso acontece devido ao contacto cada vez mais frequente entre animais selvagens, outros animais e fontes humanas de resistência bacteriana. Essa interacção crescente pode aumentar os riscos para a saúde humana e dos animais e reduzir todos os esforços de conservação da fauna, tornando-se uma preocupação importante (Sousa, 2015).

Em Moçambique, há escassez de dados precisos sobre o uso de antibióticos. No entanto, é conhecido que os antibióticos são amplamente utilizados como promotores de crescimento, principalmente em aves. Por outro lado, em bovinos, suínos e animais de companhia, os antibióticos são predominantemente empregados para a prevenção e tratamento de infecções, em vez de estimular o crescimento (GARP, 2015).

A falta de leis (ou a sua não implementação), controlo e venda sobre o uso de antibióticos poderá reduzir todos esforços de controlo da desnutrição pois 1,3 mil milhões de

peças dependem da pecuária para a sua subsistência e outros 20 milhões dependem da aquicultura, especialmente em países de baixo e médio rendimento. A propagação de estirpes resistentes de agentes patogénicos afecta inexoravelmente os seus meios de subsistência, aumentando o sofrimento e a perda dos animais. As aplicações em lavouras, bem como o descarte inadequado de medicamentos não utilizados ou vencidos e resíduos de indústrias e comunidades, podem causar contaminação de solos e córregos, espalhando assim o gatilho que causa o desenvolvimento de microrganismos indesejados (WHO, 2021).

O surgimento e a propagação de agentes patogénicos resistentes aos antibióticos que adquiriram novos mecanismos de resistência, levam à resistência aos antibióticos e comprometem a capacidade de tratar infecções comuns. À medida que a resistência aos medicamentos se espalha pelo mundo, os antibióticos tornam-se mais ineficazes, conduzindo a infecções mais difíceis de tratar e ao aumento da mortalidade. Novos antibacterianos são urgentemente necessários, por exemplo, para tratar infecções causadas por bactérias gram-negativas resistentes aos antibióticos carbapenémicos que estão na lista de patógenos prioritários da OMS (WHO, 2018).

A velocidade de surgimento de novas bactérias resistentes aos antibióticos é maior que a produção ou descoberta de novos fármacos que sejam eficazes no tratamento de doenças. A melhor forma de prevenir a resistência é optar por melhorar os sistemas de biossegurança de modo a prevenir desta forma doenças, reduzindo assim a dependência sobre o uso de antibióticos (WHO, 2021).

A OMS apela a todos os países para que reduzam significativamente os níveis de antimicrobianos utilizados nos sistemas alimentares globais. Isto implica interromper a utilização de antimicrobianos importantes do ponto de vista médico para promover o crescimento de animais saudáveis e, em geral, utilizar antimicrobianos de forma mais responsável (WHO, 2021).

Na Namíbia e noutros países que deixaram de utilizar antibióticos rotineiramente para prevenir doenças, os agricultores e as empresas de rações estão a prevenir a propagação de infecções entre os seus animais, melhorando as condições de criação. A prevenção de doenças não se baseia na administração de medicamentos, mas sim no bem-estar e higiene dos animais. Promover o bem-estar animal é sem dúvida vantajoso porque a qualidade da carne é muito superior. Tudo é feito de modo a diminuir o estresse do animal. Quando o animal está estressado, a carne fica escura e pouco atraente para o consumidor e o prazo de validade é muito menor. Outro método seguro, eficaz e acessível

para limitar a necessidade de antibióticos é vacinar os animais contra doenças infecciosas. Em 2016, a Namíbia tornou-se o primeiro país africano autorizado a exportar carne de alta qualidade para os Estados Unidos da América, um mercado com potencial considerável (WHO, 2017).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Área de estudo

O estudo foi realizado no distrito de Matutuíne, nos arredores do Parque Nacional de Maputo, onde foram colhidas amostras em 10 criadores das localidades de Salamanga, Tinonganine, Macassane, Zitundo, Gala, Futi, Guengo e Matchia. Nos distritos de Salamanga e Gala, amostras adicionais foram colhidas em dois criadores, totalizando duas colheitas em cada uma dessas localidades. A selecção dos criadores foi feita por conveniência com base na disposição dos proprietários.

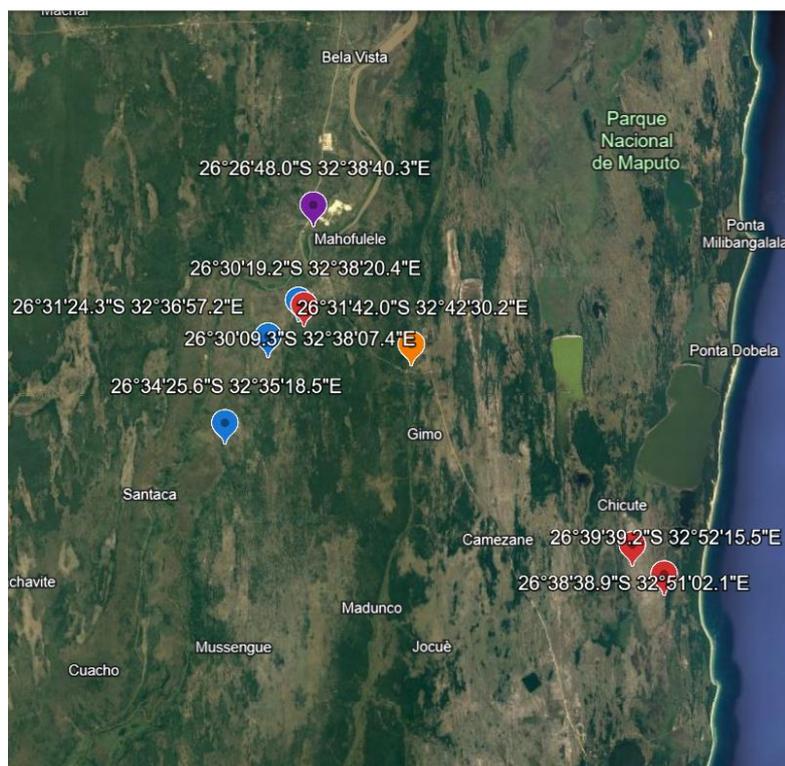


Figura I. Localização das localidades incluídas do estudo

5.2. Inquérito

Para o estudo, foi feito um inquérito individual em cada criador (anexo IV) para identificar, entre outros, o tipo de criação, os antibióticos utilizados e sua frequência de utilização.

5.3. Colheita das amostras.

Em cada criador foram colhidas aleatoriamente, no mínimo 10 amostras de fezes, usando luvas estéreis e lubrificadas, directamente da ampola rectal dos bovinos. No total foram colhidas 120 amostras, que foram acondicionadas em frascos estéreis previamente

identificados e posteriormente encaminhadas numa caixa isotérmica até à Faculdade de Veterinária da Universidade Eduardo Mondlane, onde foram processadas.



Figura II. Colheita das amostras

5.4. Isolamento de *Escherichia coli*

A cultura e isolamento de *E. coli* foram realizadas através da sementeira directa por esgotamento em placas de Petri previamente identificadas contendo Agar MacConkey e incubadas a 37°C, durante 18 – 24h, seguindo a metodologia (anexo I) descrita por Quinn *et al.* (2007).

Após o crescimento inicial, as culturas que apresentaram características morfológicas suspeitas (Figura III) foram seleccionadas para confirmação por meio da coloração de Gram e testes bioquímicos.

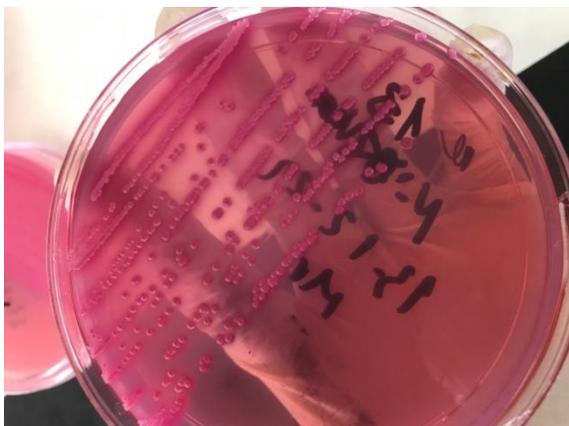


Figura III. Colónias sugestivas de *E. coli* em agar MacConkey

Por questões financeiras, apenas 37 (do total de 114) isolados de *E. coli* provenientes de 4 criadores, foram avaliadas quanto a sensibilidade à antibióticos.

5.5. Coloração de Gram

Passadas 24 horas após a sementeira em Agar MacConkey, foram seleccionadas 2 placas de cada propriedade para confirmação por meio da coloração de Gram seguindo o método descrito por Quinn *et al.* (2007).

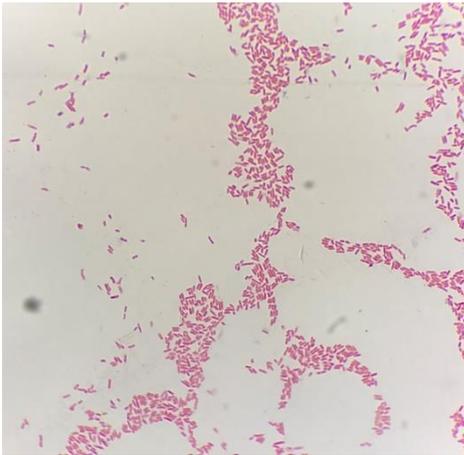


Figura IV. *E. coli* - coloração de Gram- objectiva 100x

5.6. Provas bioquímicas

As colónias com características morfológicas e tintoriais típicas de *E. coli* na coloração de Gram foram submetidas aos testes de motilidade, indol-sulfeto, citrato de Simmons, vermelho metílico e Voges-Proskauer. Adicionalmente, as amostras foram inoculadas para verificar a fermentação da lactose, glucose e a produção de H₂S no meio Agar Kliger, seguindo o método descrito por Quinn *et al.* (2007).



Figura V. Provas bioquímicas para confirmação da *E. coli*.

5.7. Antibiograma

O antibiograma foi realizado segundo a metodologia descrita por Quinn *et al.* (2007), utilizando o método de difusão de discos, no meio Agar Muller Hilton previamente cultivado. Foram impregnados os seguintes antibióticos: amoxicilina + ácido clavulânico, clorafenicol, oxitetraciclina e tetraciclina. A penicilina foi usada como controlo, uma vez que a *E. coli* não é sensível a este antibiótico. A determinação da sensibilidade foi feita com base nos intervalos apresentados na tabela I.

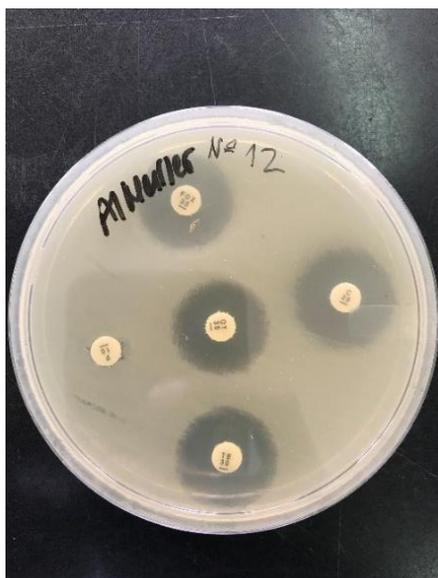


Figura VI. Placa de Petri com uma cultura de *E. coli* impregnada com discos de antibióticos no meio Muller.

Tabela I Classificação da sensibilidade das bactérias aos antibióticos de acordo com o disco e o halo de inibição - Manual de Antibiograma 2019

Antibiótico	Abreviatura	Disco (µg)	Resistente (≤)	Intermediário	Sensível (≥)
Amoxicilina + Ac. Clavulânico	AMC	30	13	14-17	18
Clorafenicol	C	30	12	13-17	18
Oxitetraciclina	OT	30	11	12-14	15
Penicilina G	P	10	-	-	-
Tetraciclina	TE	30	11	12-14	15

6. RESULTADOS

Do inquérito realizado, foi possível constatar que 100% dos criadores usam penicilinas (amoxicilina com ácido clavulânico e/ou Penicilina) e tetraciclina (oxitetraciclina e/ou tetraciclina) para tratar os animais e muitas vezes sem acompanhamento veterinário (Tabela II). Quando questionados sobre outros grupos de antibióticos, não demonstraram ter conhecimento sobre os mesmos.

Tabela II: Inquérito sobre o uso de medicamentos em 4 criadores próximo do Parque Nacional de Maputo

Criador	Tipo de criação	Assistência veterinária		Uso de medicamento		Quem recomenda?	Critério para o uso de antibióticos	Fonte dos antibióticos
		Resp.	(frequência)	Resp.	Quais			
1	Extensivo	Sim	6x/ano	Sim	AMC, TET, OT e P	Iniciativa própria e algumas vezes do técnico de pecuária	Doença	Lojas agrícolas
2	Extensivo	Sim	3x/ano	Sim	AMC, OT e P	Iniciativa própria e algumas vezes do técnico de pecuária	Doença	Lojas agrícolas
3	Extensivo	Sim	5x/ano	Sim	AMC, TET e P	Iniciativa própria e algumas vezes do técnico de pecuária	Doença	Lojas agrícolas
4	Extensivo	Sim	2x/ano	Sim	AMC, OT e P	Iniciativa própria e algumas vezes do técnico de pecuária	Doença	Lojas agrícolas

Das 120 amostras colhidas, foram isoladas 114 culturas com colónias morfológicamente características de *E. coli*, confirmadas pela coloração de Gram e testes bioquímicos. Das 114 culturas somente 37 foram testadas e quanto a sensibilidade à antibióticos.

Os resultados também indicaram que os isolados de *E. coli* obtidos de bovinos de criadores das localidades de Gala, Matchia, Salamanga e Futi mostram uma baixa

percentagem de resistência aos antibióticos. A *E. coli* foi mais sensível á tetraciclina (TE) (95%), e com maior resistência á amoxicilina com ácido clavulánico (8,1%) assim como maior percentagem de valores intermediários (32,4%) (Tabela III).

Tabela III: Perfil de sensibilidade a 5 antibióticos de 37 amostras de *E. coli* isolada de fezes de bovinos de criadores próximo do Parque Nacional de Maputo

Antibiótico	Número de amostras	Resistente (\leq)		Intermediário		Sensível (\geq)	
		N	%	N	%	N	%
Amoxicilina + Ac. Clavulánico	37	3	8,1	12	32,4	22	59,5
Clorafenicol	37	2	5,4	2	5,4	33	89,2
Oxitetraciclina	37	2	5,4	2	5,4	33	89,2
*Penicilina G	37	37	100	-	-	-	-
Tetraciclina	37	2	5,4	-	-	35	95
Total (%)	-	-	6,1	-	10,8	-	83,2

N – número de amostras; % - percentagem de amostras; *Não possui valores de referência pois foi usado como controlo.

Todos os isolados de *E. coli* foram 100% resistentes à penicilina G, o que era esperado, pois este antibiótico foi utilizado apenas como controlo (Tabela III).

Ao analisar os resultados, observou-se que todos os criadores apresentaram um isolado de *E. coli* resistente a pelo menos uma das classes de antibióticos testadas. Os isolados obtidos das amostras dos criadores 2 e 4 foram os mais sensíveis e houve maior resistência nos isolados do criador 3 (Tabela IV).

Tabela IV Comparação dos resultados da sensibilidade da *E. coli* entre os criadores.

Criador	Amostras avaliadas	Perfil de Sensibilidade			
		Antibióticos	Sensível (%)	Intermediário (%)	Resistente (%)
Criador 1	9	AMC	55,5	33,3	11,1
		C	88,8	-	11,11

		OT	100	-	-
		TE	100	-	-
		P	-	-	-
Criador 2	9	AMC	100	-	11,1
		C	88,8	-	
		OT	100	-	
		P	-	-	
		TE	100	-	
Criador 3	10	AMC	60	30	10
		C	100	-	
		OT	80	-	20
		P	-	-	-
		TE	80	-	20
Criador 4	9	AMC	22,2	66,6	11,1
		C	77,8	22,2	-
		OT	77,8	22,2	-
		P	-	-	-
		TE	100	-	-

NB: Os resultados acima não incluem a penicilina.

7. DISCUSSÃO

Do inquérito feito neste estudo, foi possível observar que assim como na pesquisa feita no distrito de Moamba para avaliar o conhecimento sobre resistência antimicrobiana e uso de antibióticos por criadores de gado (INS, 2021), todos os criadores usam penicilinas e tetraciclina para tratar seus animais quando doentes, porém, segundo os pastores e criadores, só são administrados antibióticos quando os animais estão doentes ou mostram algum sintoma de doença, facto que pode explicar a baixa resistência.

No presente trabalho, a *E. coli* foi encontrada em 95% (114/120) das amostras analisadas, valor inferior ao encontrado por Nascimento (2022), que obteve positividade para *E. coli* em 100% das amostras de fezes de bovinos provenientes de sistemas de criação intensivo e extensivo, e superior ao encontrado por Gameda (2023), que isolou culturas de *E. coli* em 86,6% das amostras de fezes de bovinos provenientes de sistemas de criação extensivo. A menor taxa de positividade de *E. coli* observada em comparação ao estudo de Nascimento (2022) pode ser explicada possivelmente pela quantidade insuficiente da bactéria nas amostras colhidas, e também pelo uso prévio de antibióticos nos animais, o que pode ter suprimido ou eliminado a *E. coli* presente (McElvania e Singh, 2022).

Apenas 37 das 114 (32,4%) das culturas de *E. coli* pertencentes a 4 criadores foram avaliadas quanto a sensibilidade à antibióticos. Destas, 6,1% dos isolados de *E. coli* demonstraram resistência a pelo menos 1 antibiótico, um índice menor se comparado ao estudo de Gameda (2023), que encontrou 51,9% de resistência em sua pesquisa sobre a *E. coli* isolada de fezes de bovinos criados em sistemas extensivos na Etiópia e também menor quando comparado ao estudo de Nascimento (2022), que obteve uma resistência de 97,5% nas amostras obtidas de bovinos (fezes ou carcaças) criados em sistemas extensivos e intensivos em seu estudo sobre resistência em Minas Gerais (Brasil). A baixa resistência observada no presente estudo, quando comparada ao estudo realizado por Nascimento (2022) deve-se provavelmente as diferenças entre os sistemas de criação, frequência de utilização de antibióticos e ao tipo de amostra.

A amoxicilina com ácido clavulânico (AMC) foi o antibiótico mais resistente, com uma taxa de resistência de 8,1% (Tabela III). Estes resultados coincidem com o estudo de Nascimento (2022) e Gameda (2023) que encontraram uma resistência alta (93,7%) e (25,8%) respectivamente, para a amoxicilina em sua pesquisa sobre a resistência da *E. coli* em fezes de bovinos provenientes de bovinos em sistema de criação extensivo e intensivo. O baixo custo das penicilinas (amoxicilina), falta de supervisão veterinária e seu amplo

espectro de acção, leva ao seu uso frequente por criadores intensivos e extensivos, e pode contribuir para o desenvolvimento de maior resistência (INS, 2021).

A resistência da amoxicilina com ácido clavulánico, pode indicar uma relação entre o uso de antibióticos e o desenvolvimento de resistência. Esse fenómeno é corroborado pelo estudo de Schwarz e Chaslus-Dancla (2001), que destaca o uso de antibióticos com maiores taxas de resistência, facto que também observou no seu estudo, pois os criadores que usavam mais frequentemente antibióticos, são os que demonstraram maiores taxas de resistência. Além disso, os antibióticos são vendidos sem uma prescrição veterinária, contribuindo assim para o aumento do desenvolvimento e disseminação da resistência aos antibióticos (INS, 2021).

Neste estudo, não foi possível identificar o motivo das diferenças observadas nos resultados entre os criadores, pois não havia grandes diferenças entre os sistemas de criação e os antibióticos utilizados por cada criador tem mecanismos de acção e resistência parecidos (Tabela II). Todos criadores afirmaram só usar antibióticos quando os animais estão doentes e param quando observam alguma melhora (Tabela II).

A ocorrência de resistência a antibióticos em *E. coli* isolada de bovinos tem sido relatada em diversos países. No entanto, devido às diferenças nas estratégias de amostragem, nos métodos de isolamento e nos métodos de determinação da resistência, é difícil fazer comparações directas entre os estudos.

A presença de genes de resistência e bactérias resistentes em animais selvagens geralmente reflete poluição humana, e estes podem actuar como bioreatores para a transferência horizontal de genes entre diferentes bactérias, incluindo patógenos humanos (Laborda *et al.*, 2022). Além disso, moscas e baratas em fazendas podem servir como vectores entre ambientes agrícolas e urbanos, e abutres e morcegos, alimentando-se de carcaças de gado e de animais vivos, respectivamente, podem ingerir e disseminar bactérias resistentes presentes nesses ambientes, incluindo cepas de *E. coli* preocupantes em contextos hospitalares (Zurek e Ghosh, 2014; Benavides *et al.*, 2022, citados por Laborda *et al.*, 2022). Portanto, a fauna selvagem representa um elo importante na cadeia de transmissão de resistência a antibióticos entre seres humanos e animais de criação, funcionando como uma ponte entre ecossistemas desconectados e potencialmente agravando a disseminação de resistência em escala global (Aarestrup, 2005, citado por Laborda *et al.*, 2022).

Estudos têm mostrado que a bactéria MRSA (methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*) está presente em animais selvagens e isso se deve a proximidade dos animais selvagens com outros animais e o homem (Sousa, 2015). O estudo próximo a um parque de animais selvagens destaca a importância do controle sobre o uso de antibióticos em áreas limítrofes para evitar a disseminação da resistência e limitando assim os esforços de conservação dos animais selvagens.

8. CONCLUSÕES

Os criadores limitam a administração de antibióticos aos seus animais somente em situações de doença, recorrendo ao uso das penicilinas e tetraciclina. A resistência aos antibióticos testados para *E. coli* no geral foi baixa, com maior resistência a amoxicilina com ácido clavulânico, seguida pelo clorafenicol e oxitetraciclina. O uso frequente dessas substâncias pelos criadores sem acompanhamento de um veterinário pode estar associado a esta resistência.

9. RECOMENDAÇÕES

Colher mais amostras e incluir criadores de diferentes regiões para obter resultados mais representativos;

Utilizar técnicas moleculares para confirmar as espécies *E. coli* e caracterizar o tipo de resistência;

Incluir amostras de ambientes não impactados pela actividade humana que permitirá uma comparação mais precisa e melhor compreensão da influência da poluição antrópica na resistência bacteriana; e

Conscientizar os criadores sobre práticas responsáveis para prevenir o desenvolvimento e disseminação da resistência aos antibióticos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L. (2006). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. McGraw-Hill Companies. Nova York. 11^a ed. pp. 1095-1132.
2. Bogaard, A.E.; Stobberingh, E.E. (2000). **Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and human**. International Journal of Antimicrobial Agents. Volume. 14, pp. 327-335.
3. Callens, B.; Sarrazin, S.; Cargnel, M.; Welby, S.; Dewulf, J.; Hoet, B.; Vermeersch, K.; Wattiau, P. (2018). **Associations between a decreased veterinary antimicrobial use and resistance in commensal *Escherichia coli* from Belgian livestock species (2011–2015)**. Preventive Veterinary Medicine, Amsterdam. DOI: 10.1016. pp. 52 – 57.
4. Croxen, M.A.; Finlay, B.B. (2010). **Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity**. Nature Reviews Microbiology, DOI:org/10,1038/nrmicro2265,. Volume 8, pp.26-37.
5. Ercumen, A.; Pickering, A. J.; Kwong, L. H.; Arnold, B.F.; Parvez, S.M.; Alam, M.; Sen, D.; Islam, S.; Kullmann, C.; Chase, C.; Ahmed, R.; Unicomb, L.; Luby, S.P.; Colford, J.M.J. (2017). **Animal feces contribute to domestic fecal contamination: evidence from *E. coli* measured in water, hands, food, flies, and soil in Bangladesh**. Environmental Science & Technology, Volume 51, nº 15, pp.8725–8734.
6. Finley, R.L.; Collignon, P.; Larsson, D.G.J.; McEwen, S.A.; Li, X.-Z.; Gaze, W.H.; Reid-Smith, R.; Timinouni, M.; Graham, D.W.; Topp, E. (2013). **The Scourge of Antibiotic Resistance: The Important Role of the Environment**. Clinical Infectious Diseases. DOI: 10.1093/cid/cit355, Volume. 57, pp. 704 – 710.
7. Food and Agriculture Organization (FAO). (2016). **The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020**; Food and Agriculture Organization: Rome, Italy.
8. Forsythe, S.J. (2013). **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2. ed. Artmed. Porto Alegre. pp.60.
9. Friedmann, H.C. (2014). ***E. coli*, Salmonella and the Enterobacteriales**. EcoSal Plus, American Society for Microbiology. Volume 6, nº 1.
10. GARP. (2015). **Moçambique. Análise Situacional e Recomendações: Uso e Resistência aos Antibióticos**. Washington, DC e Nova Deli Centro para estudo de Dinâmica de Doenças, Economia e Política (CDDEP). pp. 9 – 15.

11. Gameda B.A., Wieland B., Alemayehu G, Knight-Jones T.J.D., Wodajo H.D., Tefera M., Kumbe A., Olani A., Abera S., Amenu K. (2023) **Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolates from Livestock and the Environment in Extensive Smallholder Livestock Production Systems in Ethiopia.** Antibiotics (Basel). doi: 10.3390/antibiotics12050941.
12. Guardabassi, L.; Kruse, H. (2010). **Princípios da utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais.** In: Guardabassi, L.; Jensen, L. B.; Kruse, H. Guia de antimicrobianos em veterinária. Ed. Artmed. Porto Alegre.
13. .Hendrix, C. M. (2005) **Procedimentos laboratoriais para técnicos veterinários.** Ed. Oliveira. Roca. São Paulo.
14. Hitchins, A.D.; Feng, P.; Watkins, W.D. Chandler, L. (1995). ***Escherichia coli* and the coliform bacteria.** In: Bacterological Analytical Manual. 8^a ed. Gaithersbrug: AOAC International. pp. 3 -11.
15. Holmes, A.H.; Moore, L.S.P.; Sundsfjord, A.; Steinbakk, M.; Regmi, S.; Karkey, A.; Guerin, P.J.; Piddock, L.J. (2016) **Understanding the Mechanisms and Drivers of Antimicrobial Resistance.** DOI: 10.1016/S0140-6736 (15) 00473-0. pp. 14 – 22.
16. Hudault S, Guignot J, Servin AL. (2001). ***Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection.** doi: 10.1136/gut.49.1.47. pp.47-55.
17. Instituto Nacional de Saúde (INS). (2021). **Revista Moçambicana de Ciências de Saúde.** Maputo. Volume 7, nº 1. ISSN 2311-3308.
18. Khoneman, E.; Washington, W. Jr.; Sthepen, A.; Janda, W.; Gary, P.; Schreckenberber, P.; Woods, G. (2012). **Diagnóstico microbiológico: Texto e Atlas Colorido.** 6^o ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, pp.434.
19. LABORCLIM. (2011). **Manual para Antibiograma Difusão em Disco (Kirby & Bauer).** Disponível em: <https://docplayer.com.br/149642867-Manual-de-antibiograma-2019-laborclin-produtos-para-laboratorios-ltda.htm> Acesso em 25 de maio de 2023.
20. Laborda P.; Sanz-García F.; Ochoa-Sánchez L.; Gil-Gil T.; Hernando-Amado S.; Martínez J. (2022). **Wildlife and Antibiotic Resistance.** Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, DOI=10.3389/fcimb.2022.873989, Volume. 12.
21. Levy SB, Marshall B. (2004). **Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses.** Nature Medicine doi: 10.1038/nm1145. PMID: 15577930.

22. Marinho, C.A.M. (2013). **Resistência a antibióticos em *Enterococcus spp* . e *Escherichia coli* de equinodermes : um problema ambiental e de saúde pública**. Dissertação de mestrado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real-Portugal, pp. 76.
23. McElvania, E.; Singh, K. (2022). **Specimen Collection, Transport, and Processing: Bacteriology**. Manual of clinical microbiology. ISBN: 9781683670438. Pp. 274- 375. Volume 12^a ed.
24. Mesa-Verona O.; Boone I.; Flor M.; Eckmanns T.; Kaspar H.; Grobber M.; Tenhagen B.A. (2021). **Comparison of Consumption Data and Phenotypical Antimicrobial Resistance in *E. coli* Isolates of Human Urinary Samples and of Weaning and Fattening Pigs from Surveillance and Monitoring Systems in Germany**. *Antibiotics*, Volume 11, pp.28.
25. Nascimento, Y. F. (2022). **Perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *escherichia coli* isoladas de bovinos oriundos de sistemas de criação intensivo e extensivo**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo.
26. Nataro JP.; Kaper JB. (1998). **Diarrheagenic *Escherichia coli***. *Clinical Microbiology Reviews*. doi: 10.1128/CMR.11.1.142. pp. 142-201.
27. Quinn, P.J.; Markey, B.K.; Carter, M.E.; Donnelly, W.J.C; Leonard, F.C. (2007). **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**.. Wiley Blackwell. Iowa. 2^a ed.
28. Ramos, S., Silva, V., Dapkevicius, M. D. L. E., Caniça, M., Tejedor-Junco, M. T., Igrejas, G., & Poeta, P. (2020). ***Escherichia coli* as commensal and pathogenic bacteria among food-producing animals: Health implications of extended spectrum β -lactamase (ESBL) production**. *Animals*, 10(12), 2239. <https://doi.org/10.3390/ani10122239> .
29. Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. (2016). **Farmacologia**. Tradução Gea Consultoría Editorial. Rio de Janeiro. 8^a ed. Pp. 1455 - 1491
30. Schwarz S, Chaslus-Dancla E. (2001). **Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance**. *Veterinary Research*. 32(3-4):201-25. doi: 10.1051/vetres:2001120. PMID: 11432414.
31. Serapio-Palacios, A., Woodward S.E., Vogt S.L., Deng W., Creus-Cuadros A., Huus K.E., Cirstea M., Gerrie M., Barcik W., Yu H., Finlay B.B. (2022). **Type VI secretion systems of pathogenic and commensal bacteria mediate niche occupancy in the gut**. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110731.
32. Siqueira, G.L.C. (2015). **Indicadores de qualidade microbiológica da água de consumo, fatores de virulência e condições sanitárias dos povos indígenas Maxakali, Pataxó e xakriabá, aldeados em Minas Gerais**.. 126 p. Dissertação de doutorado. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG.

33. Sousa, M. (2015) **MRSA em animais selvagens. Implicações em saúde pública.** SP. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/317687630_MRSA_em_animais_selvas_Implicacoes_em_saude_publica Acesso em 10 de outubro de 2023.
34. Souto, M. S. M. (2011). **Sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* patogênica e *Salmonella* spp. isoladas de fezes de bezerros do Centro Oeste e Alto Paranaíba de Minas Gerais.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais.
35. Tavares, W. (2014). **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico.** 3ª ed. São Paulo: Atheneu, pp.686 -746.
36. Tortora, J. G.; Funke, R. B.; Case, L.C. (2016). **Microbiologia.** Artmed. Porto Alegre, 12ª ed.
37. Trabulsi, L.R.; Alterthum, F. (2008). **Microbiologia.** Atheneu. São Paulo, 5ª ed. Pp. 760.
38. Walsh, C. (2003) **Antibiotics: action, origins, resistance.** American Society for Microbiology. Washington, DC. pp.335.
39. Wasteson, Y. (2001) **Zoonotic *Escherichia coli*.** Acta Veterinaria Scandinavica, Vanlose, n. 95, p. 79-84.
40. Wegener HC. (2003). **Antibiotics in animal feed and their role in resistance development.** Current Opinion in Microbiology. 6:439-45.
41. World Health Organization (WHO). (2015). **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance.** WHO: Geneva, Switzerland. Disponível em: http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf. Acesso em 30 de setembro de 2023.
- World Health Organization (WHO). (2017). **La prohibición de administrar antibióticos a los animales sanos impulsa las exportaciones de carne de Namibia.** Fact Sheets-- <https://www.who.int/es/news-room/feature-stories/detail/namibia-s-ban-on-antibiotics-in-healthy-animals-drives-meat-exports.--> Acesso em 30 de setembro de 2023.
42. World Health Organization (WHO). 2018. Fact Sheets – *E. coli*. disponível em <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> - Acesso em 30 de setembro de 2023.
43. World Health Organization (WHO). (2021). **El Plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos.** WHO: Roma, Itália. Disponível em <https://doi.org/10.4060/cb5545es> - **PLANO FAO 2021-2025** Acesso em 30 de setembro de 2023.

44. Wu, S.; Chouliara, E.; Jensen, L.B. (2008). **Evaluation of petrifilmTM select *E. coli* count plate medium to discriminate antimicrobial resistant *Escherichia coli***. Acta Veterinaria Scandinavica. Volume 50, nº. 38, pp.1-7.

11. ANEXOS

Anexo I - Isolamento, identificação e teste de sensibilidade aos antibióticos

Isolamento de *Escherichia coli*

Para o isolamento foi feita sementeira directa por esgotamento de cada amostra em placas de Petri previamente identificadas contendo agar MacConkey seguindo a metodologia descrita por Quinn *et al.* (2007).

Após o crescimento inicial as culturas que apresentaram características morfológicas suspeitas (colónias de cor rosa e secas) foram seleccionadas para a confirmação através da coloração de GRAM e testes bioquímicos.

Coloração de GRAM

Passadas 24h depois da sementeira em Agar MacConkey, foram seleccionadas 2 placas de cada propriedade para confirmação através da coloração de Gram. O teste foi realizado segundo o método descrito por Quinn *et al.* (2007).

Para o teste retira-se a colónia suspeita com ajuda de uma alça metálica previamente esterilizada e mistura-se suavemente a amostra em uma gota de solução salina sobre a lâmina previamente esterilizada na chama. Após o material ter secado sobre a lâmina, passa-se a lâmina através da chama duas vezes, com a amostra virada para cima e prossegue-se com os seguintes passos:

- Coloca-se a lâmina em uma estante de coração sobre uma pia;
- Corar com a solução de violeta cristalizada por 60 segundos;
- Lavar com esguicho de água destilada;
- Cobrir com iodo de Gram ou Lugol por 60 segundos;
- Lavar com esguicho de água destilada;
- Descorar com álcool por 5 segundos;
- Lavar com esguicho de água destilada;
- Corar com Safranina por 60 segundos;
- Lavar com esguicho de água destilada;

- Secar o esfregaço ao ar e observar ao microscópio com a lente de imersão em óleo de 100x.

Foram consideradas positivas as lâminas que apresentaram bastonetes Gram negativos pequenos.

Provas bioquímicas

Foram seleccionadas 3 placas de cada propriedade para confirmação através dos seguintes testes bioquímicos: motilidade indol-sulfeto; citrato de Simmons Vermelho metílico e Voges-Proskauer. As amostras foram igualmente inoculadas para verificar a fermentação da lactose e glucose a produção de H₂S no meio Agar Kliger seguindo a metodologia descrita por Quinn *et al* (2007)

- Motilidade indol-sulfeto- No tubo de meio de motilidade indol- sulfeto foi inocul-se com ajuda de uma alça de inoculação a amostra até a profundidade de 2,5cm e incuba-se a 37°C por 24h. Depois das 24h adiciona-se 5 gotas de reagente de Kovac e verifica-se se haverá formação de um anel vermelho na parte superior do meio, sugerindo produção de indol como é característico da *E. coli*;
- Tubo de citrato de Simmons- Com ajuda de uma alça tira-se uma amostra da placa, faz-se estrias no tubo contendo o meio citrato de Simmons para verificar o uso de citrato e incuba-se a 37°C por 24h, no dia seguinte observa-se o tubo que não deve ter alteração da cor como acontece com a *E. coli* pois esta não utiliza citrato;
- Vermelho metílico e Voges-Proskauer- Inocula-se no meio de peptona-fosfato-glicose uma amostra e incuba-se a 37°C por 24h. No dia seguinte divide-se a cultura em dois tubos contendo volumes iguais e inocula-se num dos tubos cinco gotas do reagente vermelho metílico e o meio deve tornar-se imediatamente vermelho sugerindo produção de ácidos como é característico da *E. coli*. O teste de Voges-Proskauer foi realizado por falta de reagente mas conclui-se que é negativo se o vermelho metílico for positivo pois a maioria das enterobactérias positivas no teste vermelho de metilo são negativas ao teste Voges-Proskauer como acontece com a *E. coli*;
- Agar Kliger- Com ajuda de uma alça tira-se uma amostra, faz-se estrias no tubo contendo o meio Kliger e incuba-se a 37°C por 24h. No dia seguinte, verifica-se se há mudança de cor para amarelo característico da *E. coli*

Todos os testes que apresentarem o resultado IMVIC (+++-) e no Agar Liger serão consideradas como *E. coli*

Antibiograma

Para testar a susceptibilidade dos isolados positivos de *E. coli* aos antibióticos recorreu-se ao método de difusão de discos descrito por Quinn *et al* (2007), usando os seguintes antibióticos: amoxicilina + ácido clavulânico, clorafenicol, oxitetraciclina e tetraciclina. A penicilina foi usada para controlo pois a *E. coli* não é sensível a este antibiótico. A determinação da sensibilidade baseou-se na tabela do anexo III e seguiu-se os seguintes passos:

- Retirar as placas e os discos do congelador 30 minutos antes para que adquiram a temperatura ambiente;
- Com uma alça bacteriológica tocar na colónia a ser testada, (transferir para o meio Muller), semear em seguida de forma suave em pelo menos 5 direções na placa abrangendo toda a superfície;
- Aguardar aproximadamente 10 a 15 minutos para a superfície do ágar secar;
- Com auxílio de uma pinça flambada e resfriada colocar os discos sobre a superfície do meio inoculado exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão dos discos;
- Incubar a placa com os discos em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas; e
- Após incubação de 18 horas, medir o tamanho de cada halo e o resultado pesquisado em tabelas apropriadas segundo a espécie bacteriana em análise.

Anexo II - Valor de halos inibitórios esperados para Enterobacteriaceae - Manual de Antibiograma

Antibiótico	Abreviatura	Disco (µg)	Resistente (≤)	Intermediário	Sensível (≥)
Amoxiciclina + Ac. Clavulânico	AMC	30	13	14-17	18
Clorafenicol	C	30	12	13-17	18
Oxitetraciclina	OT	30	11	12-14	15
Penicilina G	P	10	-	-	-
Tetraciclina	TE	30	11	12-14	-

Anexo III - Perfil de resistência de *Escherichia coli* isolados de fezes de bovino provenientes de diferentes criadores ao redor do Parque Nacional de Maputo.

Criador	Amostras avaliadas	Perfil de Sensibilidade			
		Antibióticos	Sensível (%)	Intermediário (%)	Resistente (%)
Criador 1	9	AMC	55,5	33,3	11,1
		C	88,8	-	11,11
		OT	100	-	-
		TE	100	-	-
		P	-	-	100
Criador 2	9	AMC	100	-	-
		C	88,8	-	11,1
		OT	100	-	-
		P	-	-	100
		TE	100	-	-
Criador 3	10	AMC	60	30	10
		C	100	-	-
		OT	80	-	20
		P	-	-	100
		TE	80	-	20
Criador 4	9	AMC	22,2	66,6	11,2
		C	77,8	22,2	-
		OT	77,8	22,2	-
		P	-	-	-
		TE	100	-	-

Anexo IV - Questionário sobre o uso de antibióticos em zonas próximo das áreas de conservação da Reserva especial de Maputo.

1. Identificação

Distrito: _____ Localidade _____

Proprietário: _____ Escolaridade _____

Nome da propriedade _____

Data da visita ___/___/___

2. Caracterização da propriedade

- a) Tipo de exploração: corte () leite () mista ()
- b) Tipo de criação: intensivo () extensivo () semi-intensivo ()
- c) Raça predominante:
- d) Numero de bovinos na exploração:

	Meses			
Sexo	0-6	7-12	13-24	>24
Fêmeas				
Machos				

- e) Assistência veterinária: sim () não ()
- f) Frequência da assistência: Semanal () quinzenal () trimestral () semestral ()
- g) Tipo de instalações: chão batido () ripado () cimentado () pedras ()
- h) É realizada limpeza das instalações? Sim () não ()
- i) Frequência da limpeza das instalações: diariamente () 1 vez por semana () 2-3 vezes por semana () ≥ 4 vezes
- j) Tipo de limpeza realizada: catação () lavagem () varreção ()
- k) Produtos utilizados na limpeza: _____

3. Caracterização do uso de medicamentos veterinários

- a) Usam medicamentos? Sim () não ()
- b) Quem recomenda o seu uso? Iniciativa própria () veterinário () lojista () tratador ()

- c) Critério para utilizar antibiótico:
 Apresenta algum quadro clínico () entrada e saída das água ()
 entrada e saída das água na estação seca () secagem das vacas ()
 somente nas estação seca () não utiliza () outro:_____
- d) Para tratamento de quais doenças o senhor utiliza antibióticos?
 Mastite () anemia () intoxicações () diarreia () carraças () problemas nos
 cascos () pneumonias () outras:_____
- e) Qual(is) o(s) princípio(s) activos utilizados?
 Amox. + ác. Clavurónico () Enrofloxacina () Norfloxacina () Oxacilina ()
 Sulfazotrim () etraticlina () Penicilina () Gentamicina () Cefalexina ()
 Florfenicol () Amoxicilina () e eفالوتينا () outro (nome
 comercial)_____
- f) Com que frequência são administrados os antibióticos no tratamento de alguma
 doença?
 1 () 2-3 () 4-5 () >5 ()
- g) Separa o animal em tratamento? Sim () não ()
- h) Quem administra?
 Veterinário () tratador () o proprietário ()
- i) Como determinam a dose?
 Olha a bula (), estima ()
- j) Onde adquirem os medicamentos?
 Na farmácia () com o veterinário () no mercado () noutros lugares ()