

MESTRADO EM CONTROLO DE QUALIDADE
ÁGUA E ALIMENTOS

Caracterização de *Enterococcus* resistentes a
antibióticos oriundos de alimentos para
animais de estimação

Liliana Barroso Finisterra

M

2020



Este trabalho foi financiado pela **Unidade de Ciências Biomoleculares Aplicadas-UCIBIO** financiada por fundos nacionais através da FCT (**UIDB/04378/2020**).



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Liliana Barroso Finisterra

**Caracterização de *Enterococcus*
resistentes a antibióticos oriundos de
alimentos para animais de estimação**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de
Mestre em Controlo de Qualidade

Trabalho realizado sob a orientação:

Doutora Ana R. Freitas

Professora Doutora Carla Novais

Novembro 2020

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Liliana Barbosa Finisterra

Agradecimentos

À minha orientadora Doutora Ana Freitas quero expressar o meu sincero e profundo agradecimento pela sua orientação, acompanhamento, incentivo, disponibilidade, paciência, apoio e ajuda na elaboração desta dissertação, sem a sua preciosa ajuda não teria conseguido. E também pela oportunidade de integrar a sua equipa de trabalho para a realização da minha dissertação de mestrado, que marcou e marcará o meu futuro profissional.

À minha co-orientadora Professora Doutora Carla Novais pelo acompanhamento, disponibilidade e incentivo ao longo da realização deste trabalho. E também pela oportunidade de integrar a sua equipa de trabalho para a realização da minha dissertação de mestrado, que marcou e marcará o meu futuro profissional.

À Bárbara pelo acompanhamento, ajuda, apoio e disponibilidade demonstrado ao longo da realização de todo o trabalho laboratorial.

À Professora Doutora Luísa Peixe pela oportunidade de me deixar ingressar no seu grupo de investigação, para a realização da minha dissertação.

À Cristina, colaboradora do laboratório, pela prontidão em ajudar sempre que necessitava, bem como pelas palavras amigas.

Às minhas companheiras de bancada Sofia, Anícia e Marisa pela ajuda e momentos de distração ao longo do trabalho laboratorial.

Aos meus pais, pela oportunidade que me deram de continuar a investir na minha educação, pelo carinho, incentivo e apoio ao longo desta jornada académica sem eles este percurso não seria possível.

Ao meu irmão pelo apoio, companhia e momentos de distração.

A todos que de alguma forma me apoiaram na realização desta dissertação o meu sincero

Muito Obrigada!

Resumo

O aumento do número de animais de estimação nos últimos anos tem-se traduzido no crescimento exponencial do setor industrial alimentar animal. A procura crescente por produtos inovadores, tendencialmente mais naturais, tem sido acompanhada por novos problemas de segurança alimentar com um aumento de surtos e de recolhas de lotes devido à presença de bactérias patogénicas. Assim, foi objetivo geral deste trabalho investigar se os alimentos para cães comercialmente disponíveis em Portugal são também um veículo de *Enterococcus* resistentes a antibióticos. Foram colhidas 55 amostras (23 marcas; 22 húmidas, 14 cruas congeladas, 8 secas, 7 guloseimas e 4 semi-húmidas) em 9 superfícies comerciais da região do Porto entre setembro de 2019 e janeiro de 2020. O processamento das amostras (25 g) incluiu pré-enriquecimento e enriquecimento em meios de cultura sem/com antibióticos, sendo depois semeadas em meio seletivo sem/com os mesmos antibióticos. A suscetibilidade foi estudada para 13 antibióticos (difusão com disco; Etest; microdiluição) de acordo com normas internacionais (EUCAST/CLSI). A identificação de espécies (*E. faecium-Efm* e *E. faecalis-Efs*), genes de resistência a antibióticos (*vanA*, *optrA*, *poxtA*) e de virulência (*ptsD*) clinicamente relevantes foi feita por PCR. Outras espécies de *Enterococcus* foram identificadas por MALDI-TOF MS. A clonalidade foi estabelecida por MLST em isolados representativos. Trinta amostras (54%) continham *Enterococcus* (7 espécies; >85% *Efm* e *Efs*) que expressavam resistência à eritromicina (73%), tetraciclina (63%), quinupristina-dalfopristina (60%), estreptomicina (53%), cloranfenicol (50%), ampicilina e ciprofloxacina (47% cada), gentamicina (40%), linezolid (23%; *optrA* e/ou *poxtA*), vancomicina e teicoplanina (2% cada; *vanA*). Isolados multirresistentes, incluindo a antibióticos de última linha na medicina humana (vancomicina/linezolid), foram obtidos em 31% das amostras na maioria de alimentos crus, também húmidos ou guloseimas, e de amostras suplementadas com antibióticos. *ptsD* foi associado à resistência à ampicilina em 48% dos casos. Foi observada uma diversidade de clones, na mesma ou em amostras diferentes, previamente detetados em hospitais (*E. faecium* ST80; *E. faecalis* ST40), em animais de produção e animais de estimação. Este estudo mostra que os alimentos para cães podem ser reservatórios/veículos de bactérias/genes de resistência aos antibióticos com impacto clínico, reforçando a importância deste nicho no contexto de Uma Só Saúde. O contato próximo de humanos com rações, cães ou suas fezes (diretamente ou através do ambiente), e a comercialização das marcas estudadas em diferentes países, podem representar um risco para a Saúde Pública.

Palavras-chave: *Enterococcus*; alimentos; cães; resistência; antibióticos; *vanA*; *optrA*; *poxtA*

Abstract

The increase in the number of pets in recent years has been followed by an exponential growth of the industrial pet food sector. The growing demand for innovative products, which tend to be more natural, has been accompanied by new food safety risks with an increase in outbreaks and pet food recalls due to the presence of pathogenic bacteria. Therefore, the general goal of this study was to investigate whether dog food commercially available in Portugal is also a reservoir of antibiotic resistant *Enterococcus*. Fifty-five samples (23 brands; 22 wet, 14 raw frozen, 8 dry, 7 treats and 4 semi-wet) were collected on 9 commercial surfaces in the Porto region between September 2019 and January 2020. Sample (25 g) processing included pre-enrichment and enrichment steps in culture media without/with antibiotics, and then plating into selective media without/with the same antibiotics. Susceptibility was studied for 13 antibiotics (disk diffusion; Etest; microdilution) according to international standards (EUCAST/CLSI). Clinically-relevant species (*E. faecium*-*Efm* and *E. faecalis*-*Efs*), antibiotic resistance (*vanA*, *optrA*, *poxtA*) and virulence (*ptsD*) genes were identified by PCR. Other species of *Enterococcus* were identified by MALDI-TOF MS. Clonality was established by MLST in selected isolates. Thirty-samples (54%) contained *Enterococcus* (7 species; > 85% *Efm* and *Efs*) that expressed resistance to erythromycin (73%), tetracycline (63%), quinupristin-dalphopristin (60%), streptomycin (53%), chloramphenicol (50%), ampicillin and ciprofloxacin (47% each), gentamicin (40%), linezolid (23%; *optrA* and/or *poxtA*), vancomycin and teicoplanin (2% each; *vanA*). Multidrug-resistant isolates, including last resort antibiotics in human medicine (vancomycin/linezolid), were obtained in 31% of the samples from most raw foods, also moist or treats, and mainly from samples supplemented with antibiotics. *ptsD* was associated with ampicillin resistance in 48% of cases. A diversity of clones was observed, in the same or in different samples, that were previously detected in hospitals (*E. faecium* ST80; *E. faecalis* ST40), in farm animals and pets. This study shows that dog food can be a reservoir/vehicle of bacteria and/or antibiotic resistance genes with clinical impact, reinforcing the importance of this niche in the One Health context. The close contact of humans with dogs, their food or their feces (directly or through the environment), and the commercialization of the brands in different countries, may pose a Public Health risk.

Keywords: *Enterococcus*; dog food; antibiotics; resistance; *vanA*; *optrA*; *poxtA*

ÍNDICE

1.	Introdução	13
1.1.	Alimentos para animais de estimação.....	13
1.1.1.	Tipos de alimentos.....	17
1.2.	Fontes de contaminação dos alimentos para animais de estimação.....	19
1.3.	Perigos microbiológicos associados aos alimentos para animais de estimação e sua implicação para a saúde animal e humana	23
1.3.1.	Bactérias patogênicas	24
1.3.2.	Bactérias resistentes a antibióticos.....	27
1.4.	<i>Enterococcus spp.</i>	32
1.4.1.	Importância clínica e resistência a antibióticos	32
1.4.2.	Presença de <i>Enterococcus</i> na cadeia alimentar	38
2.	Objetivos	40
3.	Materiais e métodos	41
3.1.	Seleção e processamento das amostras	41
3.2.	Confirmação do género <i>Enterococcus</i> e identificação ao nível da espécie	42
3.3.	Estudo da suscetibilidade a antibióticos.....	44
3.3.1.	Método de difusão em agar com discos.....	44
3.3.2.	Método de difusão em agar com tiras (E-test)	46
3.3.3.	Microdiluição.....	46
3.4.	Deteção de genes de resistência e virulência.....	47
3.5.	Estudo da clonalidade por MLST	47
4.	Resultados e Discussão	51
4.1.	Diversidade Bacteriana por tipo de amostra	51
4.2.	Estudo da suscetibilidade a antibióticos.....	57
4.2.1.	Resistência à vancomicina	61
4.2.2.	Resistência à ampicilina	62
4.2.3.	Resistência à linezolidina	64
5.	Conclusões.....	68

6.	Referências Bibliográficas	69
7.	Anexos	82
7.1.	Caraterísticas dos meios de cultura usados neste trabalho.	82
7.2.	Comunicação em forma de resumo submetida ao <i>European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i> (ECCMID 2020).	83
7.3.	Comunicação em forma de “ <i>press release</i> ” internacional	84

Índice de Figuras

Figura 1. Principais dados informativos sobre as tendências de mercado e população a nível Europeu acerca dos animais de estimação no ano de 2019.	13
Figura 2. Classificação dos subprodutos e derivados de origem animal.	16
Figura 3. Distribuição de empresas produtoras de alimentos para animais de estimação na Europa em 2013 (em %).	17
Figura 4. Representação das várias etapas da cadeia de produção alimentar para animais de estimação em que pode ser provável ocorrer contaminação microbiológica.	23
Figura 5. Vias de transmissão ao homem e animais de bactérias resistentes a antibióticos.	28
Figura 6. Representação esquemática do processamento das amostras de alimentos para cães.	43
Figura 7. Distribuição das diferentes espécies de <i>Enterococcus</i> (n=184 isolados) pelos diferentes tipos de alimentos para cães (em %).	55
Figura 8. Distribuição das resistências a antibióticos pelas diferentes espécies de <i>Enterococcus</i> e pelo tipo de alimento analisados. A distribuição das resistências pela espécie é dada em percentagem.	59
Figura 9. Distribuição dos genes de resistência à linezolida (<i>optrA</i> e <i>poxtA</i>) pelas diferentes espécies obtidas (em número de isolados).	66

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais antibióticos usados no tratamento de infecções por <i>Enterococcus</i> ou importantes na sua epidemiologia.	35
Tabela 2. Condições de amplificação para as diferentes reações de PCR.	49
Tabela 3. Constituição e distribuição das amostras analisadas consoante o tipo de alimento (húmida, seca, semi-húmida, guloseima e crua).	52
Tabela 4. Perfis de resistência de <i>Enterococcus</i> aos diferentes antibióticos testados de acordo com o meio de origem.	60
Tabela 5. Caracterização de isolados representativos de <i>Enterococcus</i> recuperados de amostras provenientes de rações para cães comercializadas	65

Lista de Abreviaturas

AmpR- Resistência à Ampicilina

aw- atividade em água

BHI- *Brain Heart Infusion*

CLSI- *Clinical Laboratory Standards Institute*

CMI- Concentração Mínima Inibitória

ERV- *Enterococcus* resistentes à vancomicina

E.U.A- Estados Unidos da América

EUCAST- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

MALDI-TOF MS- *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*

MLST- *Multilocus sequence typing*

OMS- Organização Mundial de Saúde

PCR- *Polymerase Chain Reaction*

UE- União Europeia

1. Introdução

1.1. Alimentos para animais de estimação

A alimentação para animais de estimação tem ganho um grande destaque ao longo dos últimos anos e sofrido alterações ao nível da produção. Na base desta mudança está a forma de pensar da sociedade que passou a considerar o animal de estimação como um elemento essencial do seio familiar (1) e, como tal, digno de uma alimentação equilibrada, de qualidade e segura, garantindo o seu bem-estar (2). De facto, o número de animais de estimação, em particular cães e gatos, teve um aumento exponencial na última década a nível global. Portugal, em particular, ocupa um lugar de destaque entre os países da União Europeia (UE), pois dentro dos 24 países analisados encontra-se, respetivamente, no 8º e 12º lugares ao nível do número de cães e gatos (3).

O número de famílias com animais de estimação atingiu 85 milhões no ano de 2019 em toda a Europa (Figura 1) (4). Consequentemente, houve um grande aumento na procura de diversos produtos destinados a animais de estimação como brinquedos, cuidados de higiene, consultas veterinárias, entre outros, mas o setor alimentar é o que mais se destaca.

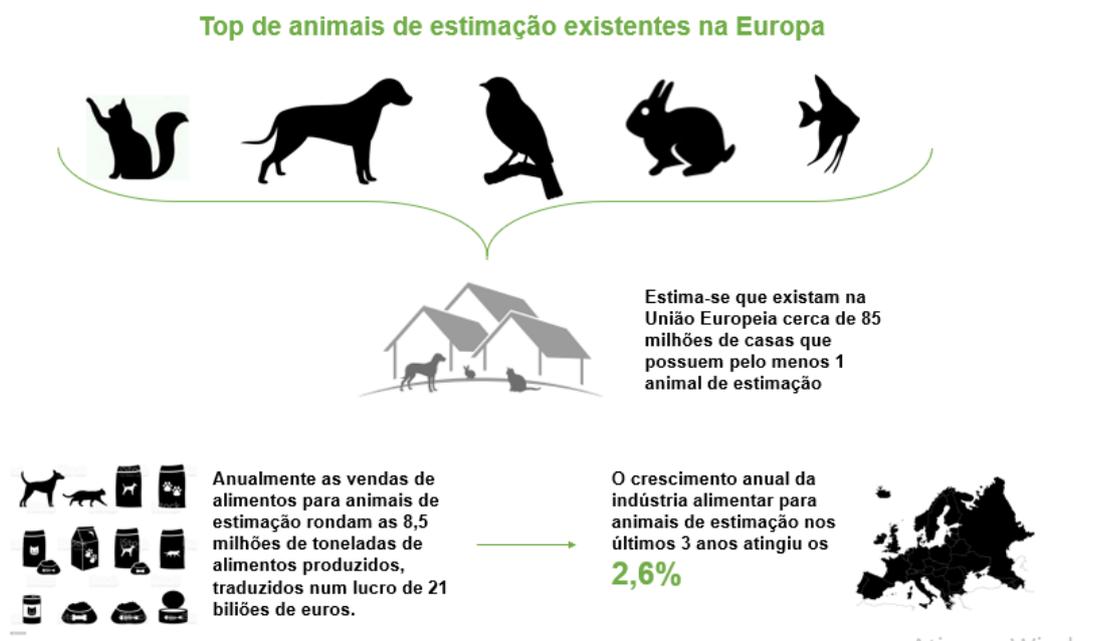


Figura 1. Principais dados informativos sobre as tendências de mercado e população a nível Europeu acerca dos animais de estimação no ano de 2019 [Adaptado de dados da *European Pet Food Industry* (4)].

O volume de negócios de alimentos para animais de estimação foi, em 2019, de 21 biliões de euros e, só na Europa, foram vendidas 8.5 milhões de toneladas de produtos alimentares para animais de estimação, o que denota a dimensão deste mercado (Figura 1) (4). A taxa de crescimento anual Europeia da indústria alimentar neste setor foi de 2.6% em 2019 e é expectável que continue a crescer significativamente nos próximos anos quer na Europa, quer nos Estados Unidos da América (E.U.A) esperando-se um aumento anual a rondar os 2.8% (5).

Os alimentos para animais de estimação são maioritariamente constituídos por matérias-primas provenientes da indústria alimentar humana, ou seja, **subprodutos de origem animal que não se destinam ao consumo humano** (por exemplo carcaças e partes de animais que por motivos comerciais não são utilizadas para consumo humano ou rejeitadas na inspeção veterinária; penas, peles, sangue, etc. que não apresentem sinais clínicos de doença; matérias animais derivadas do fabrico de produtos destinados ao consumo humano como ossos desengordurados, etc.) (6). Os subprodutos animais surgem principalmente do abate de animais para consumo humano (matadouros), durante a produção de géneros alimentícios (produtos lácteos e produtos transformados à base de carne) e durante a eliminação de animais que morreram nas instalações pecuárias ou que foram abatidos para controlo de doenças transmissíveis (6). A eliminação dos subprodutos de origem animal e seus derivados não é uma hipótese economicamente viável para a indústria alimentar. Como são caracterizados pelo alto potencial nutricional, a sua transformação em matérias primas de valor significativo permite a sua utilização em diversos setores, como por exemplo, para a produção de rações para animais, na indústria farmacêutica, como fertilizantes ou na produção de biodiesel, permitindo elevar o seu valor económico (7) e contribuindo também para a redução da poluição ambiental (8). No setor alimentar para animais de estimação a utilização de subprodutos e derivados torna-se benéfica pelo fornecimento dos nutrientes adequados para os animais, como por exemplo proteínas, minerais e vitaminas, e pela sua boa digestibilidade (7). Contudo, estes subprodutos podem representar um perigo para a saúde pública e animal e para o ambiente quando associados à transmissão e propagação de doenças para os animais e humanos, como por exemplo encefalopatia espongiforme bovina (EEB), ou também pelo aparecimento de contaminantes químicos (por exemplo dioxinas) que colocam em risco a segurança alimentar. Dado o elevado risco que este tipo de alimentos pode desencadear para a saúde do seu consumidor é necessário que o seu uso seja devidamente regulamentado.

Na UE o uso dos subprodutos de origem animal e seus derivados é fortemente regulamentado, e a legislação atualmente em vigor relativa ao controlo deste tipo de

produtos é considerada a mais severa e rigorosa de todo o mundo, implementando regras para a colheita, transporte, armazenamento, manuseio, importação e exportação dos subprodutos e seus derivados (9). O desenvolvimento de legislação iniciou-se no século XXI, com a criação e aplicação do Regulamento (CE) nº 1774 de 2002 que definiu regras sanitárias comunitárias aplicáveis aos subprodutos animais não destinados ao consumo humano (10), o qual foi alterado e revogado em 2009 através do Regulamento (CE) nº 1069 de 2009 (11), com o intuito de melhorar as regras até à data impostas relativas aos subprodutos animais (6,7). Neste setor, e apesar do regulamento anterior ser o mais relevante e o principal no controlo deste tipo de alimentos, também se destaca o Regulamento (CE) nº 142 de 2011 que auxilia o regulamento anterior (12); o Regulamento (CE) nº 999 de 2001 que estabelece as regras para a prevenção, controlo e erradicação de determinadas encefalopatias espongiformes (BSE) transmissíveis (13), e o Regulamento (CE) nº 183 de 2005 relativo à higiene alimentar para animais (14). Os subprodutos animais são classificados em três categorias (1, 2 e 3) tendo em conta o seu perigo na cadeia alimentar e para a saúde dos seus consumidores (Figura 2). Os subprodutos da categoria 1 são considerados os de elevado risco, sendo utilizados essencialmente fora da cadeia alimentar, como por exemplo produção de combustível; os subprodutos de categoria 2 são considerados de risco intermédio e são utilizados para o fabrico de fertilizantes ou de combustível; e os subprodutos de categoria 3 são considerados de baixo risco sendo utilizados para o fabrico de alimentos para animais de criação e de estimação, de fertilizantes orgânicos e combustível (11).

Após tratamento dos subprodutos animais, por eliminação ou por processo de transformação em subprodutos derivados que não ponham em causa a saúde humana ou animal (em que o mais comum a nível nacional é o processo de esterilização sobre pressão; consiste na redução dos subprodutos animais a partículas de baixas dimensões, que são aquecidas até atingir uma temperatura superior a 133 °C, durante 20 minutos a uma pressão 3 bar), os produtos finais (essencialmente gorduras animais e farinhas de carne e osso) podem ser utilizados para o fabrico de alimentos para animais de estimação (6). Todos os ingredientes utilizados nos diferentes tipos alimentares para animais de estimação são cuidadosamente selecionados tendo em conta o tipo de alimentos a confeccionar, garantindo uma constituição nutricional completa e adequada para os animais a que se destinam. A grande maioria dos ingredientes utilizados no fabrico de alimentos para animais de estimação são descritos como subprodutos ou derivados de origem animal (carne ou peixe) que, por norma, são boas fontes de proteínas, ácidos gordos essenciais, ferro, cálcio, fósforo e algumas vitaminas, sendo responsáveis pelo aumento da palatabilidade dos alimentos. Para além destes, há uma tendência crescente na adição de

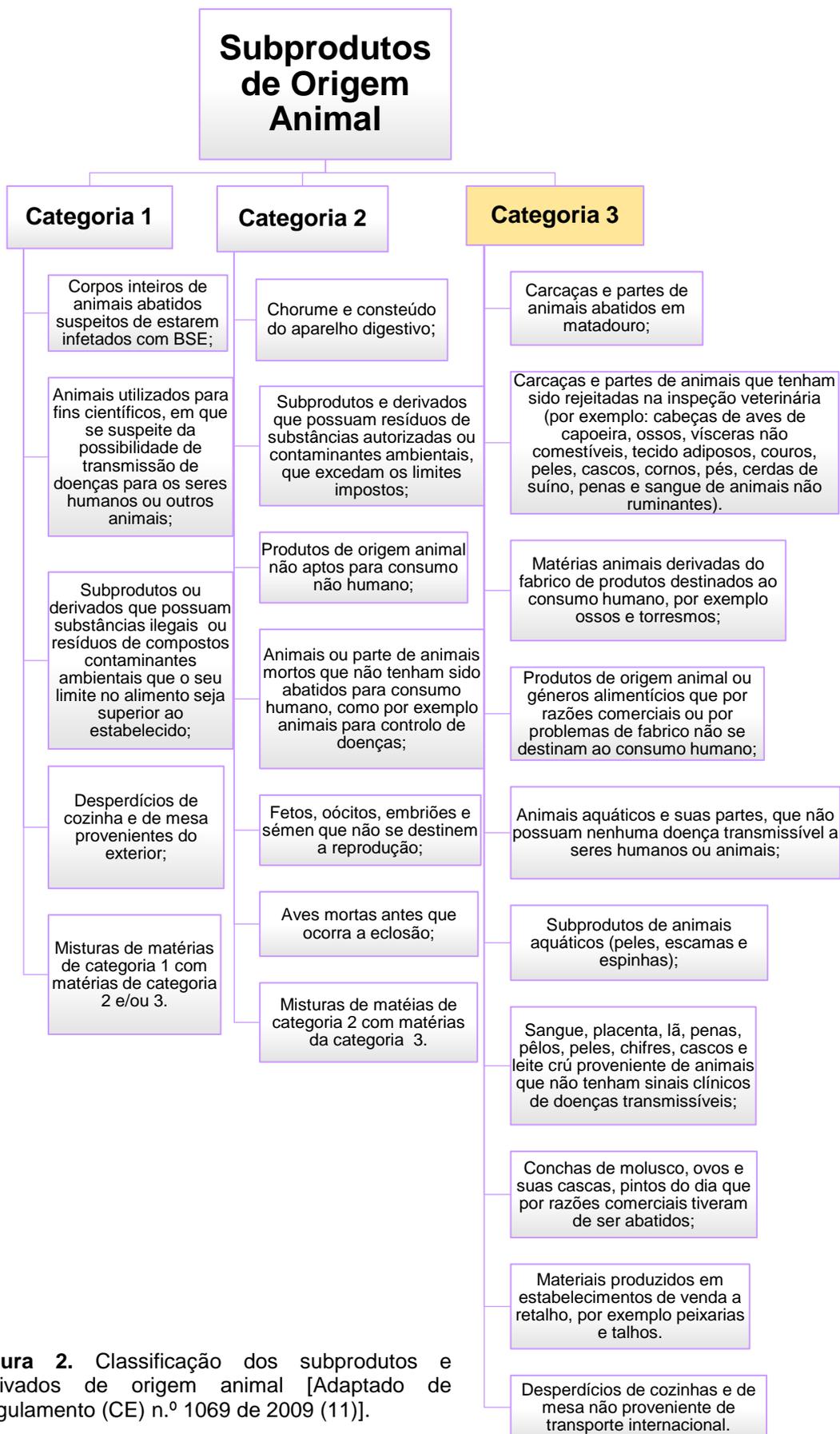


Figura 2. Classificação dos subprodutos e derivados de origem animal [Adaptado de Regulamento (CE) n.º 1069 de 2009 (11)].

outros produtos tais como cereais, vegetais, açúcares variados provenientes de matérias primas naturais (tais como frutas), aditivos, conservantes, vitaminas, antioxidantes e corantes.

1.1.1. Tipos de alimentos

Com a mudança de mentalidade e a humanização dos animais de estimação o mercado alimentar para animais de estimação tem aumentado significativamente a sua produção ao longo das últimas décadas. Este aumento está relacionado com a necessidade que os donos de animais de estimação sentem em fornecer aos seus animais produtos mais saudáveis, nutritivos e naturais. Desta forma, e tendo em conta os diversos tipos de alimentos produzidos para animais de estimação, a *Pet Food Industry* analisou os dados de um conjunto de 102 empresas a nível mundial e, com base na produção anual de alimentos, realizou um estudo de mercado com o objetivo de verificar que tipo de alimentos para animais de estimação é mais produzido. Desta forma, e analisando o gráfico da Figura 3, verifica-se que os alimentos secos para cães e gatos são os mais produzidos, seguidos das guloseimas/snacks para cães e dos alimentos húmidos para os dois tipos de animais de estimação. Apesar da produção dos alimentos crus ainda ser baixa, a sua oferta e diversidade têm vindo a aumentar em anos recentes e prevê-se que constitua um nicho em expansão no mercado da indústria alimentar para animais de estimação.

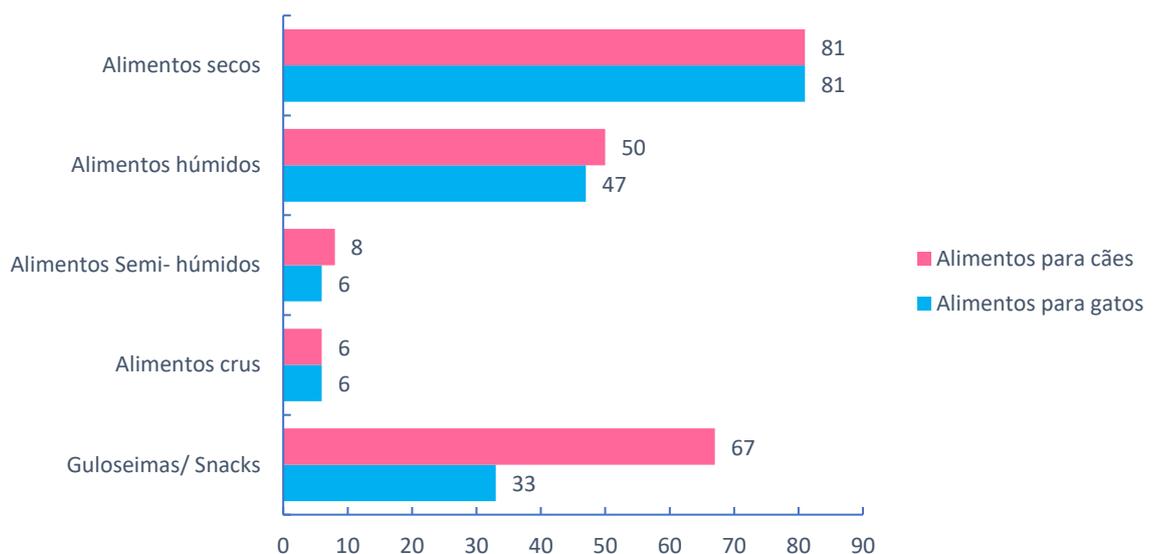


Figura 3. Distribuição de empresas produtoras de alimentos para animais de estimação na Europa em 2013 (em %) (Adaptado de: <https://www.petfoodindustry.com/articles/5319-how-the-pet-food-industrys-top-companies-meet-the-challenge>).

A procura por uma alimentação mais adequada e adaptada a novos conceitos e ideologias dos tempos modernos tem originado uma grande diversificação dos tipos alimentares disponíveis com diferentes sabores, texturas e formatos (15). Existem quatro categorias de alimentos disponíveis para animais de estimação: **secos**, **húmidos**, **semi-húmidos** e **crus** que diferem fundamentalmente no teor de humidade, tipo de processamento e conservação a que são sujeitos (16–18).

Os **alimentos secos** são caracterizados por um baixo teor de humidade na sua constituição (<14%), por uma elevada quantidade de matéria seca e por um valor de atividade em água (a_w) baixo compreendido entre 0.25 e 0.50 (16,19). Os ingredientes utilizados para o seu fabrico encontram-se por norma no formato seco, sendo comum o uso de farinhas originadas a partir dos subprodutos animais referidas anteriormente, também podem ser adicionados outros ingredientes tais como cereais, grãos e vegetais na forma seca. A mistura de ingredientes é condicionada no interior de uma extrusora, onde ocorre o processamento do alimento através do método de extrusão, que consiste num processo em que ocorre um conjunto de operações, provocando alterações químicas e físicas no alimento. Estas operações ocorrem a elevadas temperaturas (120°C a 200°C) e durante um curto intervalo de tempo (270 segundos). O ar quente presente na extrusora permite não só a redução da humidade presente no alimento mas também a esterilização do produto, prevenindo o desenvolvimento de microrganismos (20). Após o processamento os alimentos são arrefecidos e é adicionada uma mistura de ingredientes termolábeis (ex: aromatizantes) que têm como função fornecer sabor ao alimento e evitar a sua degradação (21).

Os alimentos **semi-húmidos** são processados pelo método de extrusão como acontece com os alimentos secos, mas ao contrário destes a percentagem de humidade é maior, estabelecida entre 14% e 60%, e o a_w entre 0.6 e 0.8 (19), porque são adicionados compostos humectantes (ex. glicerina ou o xarope de milho) que impedem a perda de água nos alimentos durante a sua confeção. Também são adicionados compostos inibidores do desenvolvimento de microrganismos deterioradores ou patogénicos, tais como o sorbato de potássio que é um sal que atua como inibidor do desenvolvimento de bactérias e fungos, ou de agentes acidificantes no alimento.

Os **alimentos húmidos**, ao contrário dos anteriores, possuem um elevado teor de humidade ($\geq 60\%$) e um elevado $a_w \geq 0.85$ (19). Este tipo alimentar é caracterizado pelo seu método de processamento que consiste no acondicionamento dos produtos derivados dos subprodutos animais que se encontram na forma fresca ou congelada. Estes são triturados e misturados com outros ingredientes (ex., cereais que atuam como uma fonte de energia, grãos e vegetais) em recipientes adequados (latas e sacos) e selados na parte superior

através de um vapor quente que vai provocar a deslocação do ar presente no interior para o exterior do recipiente gerando um ambiente anaeróbio (16). Após a selagem, a embalagem com o alimento é sujeita a um método de processamento térmico no interior de uma retorta ou autoclave durante 3 minutos a 121°C (16), onde vai ocorrer esterilização e eliminação de microrganismos que possam estar presentes no alimento ou na embalagem (22). Este tipo de processamento contribui para o aumento do tempo de prateleira e vida útil do alimento e evita a sua deterioração precoce (23).

Os **alimentos crus**, conhecidos pelo seu termo inglês **raw food**, consistem num tipo alimentar baseado unicamente na utilização de subprodutos de origem animal de categoria 3, tais como carne, osso, músculos e vísceras de diferentes animais (peixes, vaca, porco, aves). São muitas vezes adicionados vegetais, frutas, cereais e, seguidamente, tudo é misturado e triturado, não havendo qualquer tipo de processamento térmico a quente. Os produtos são apenas refrigerados ou congelados para garantir a preservação dos ingredientes (24). Este tipo alimentar também pode ser comercializado sob a forma liofilizada, que é um método utilizado para remover a água presente nos alimentos através de um processo de sublimação da água, ou seja, inicialmente o alimento é congelado e posteriormente a água passa do estado sólido ao gasoso (25). Desde a sua comercialização, no início do século XXI, que este tipo de alimentação tem despertado o interesse dos donos de animais de estimação, notando-se um aumento crescente da sua popularidade em anos recentes devido a uma tendência pela procura de dietas mais naturais tal como acontece com a alimentação humana. Distingue-se dos restantes tipos alimentares por ter a possibilidade de produção caseira (24,26).

Adicionalmente também são produzidas **guloseimas** ou **snacks** que ao contrário dos anteriores alimentos, não fornecem a quantidade de nutrientes essenciais e sendo utilizados como um complemento alimentar, uma recompensa ou um extra para o animal com o intuito de provocar uma sensação de prazer (17,18). As guloseimas comercializadas podem ser de três tipos: seca, semi-húmida ou crua, e normalmente são caracterizadas pelo seu sabor intenso.

1.2. Fontes de contaminação dos alimentos para animais de estimação

Com o aumento do número de animais de estimação há uma maior preocupação em fornecer aos animais uma alimentação não só satisfatória a nível nutricional, mas também segura e de qualidade de modo a que não coloque em causa a saúde e o bem-estar dos mesmos. Tal tem-se traduzido num aumento crescente da procura por diferentes tipos de

alimentos comercializados, sendo do interesse da indústria alimentar animal que os produtos fabricados sejam seguros e livres de qualquer perigo, contribuindo para melhorar não só a dieta dos animais, como também a sua saúde. Este objetivo definido pela indústria alimentar para animais de estimação aplica-se a todo o processo de fabrico, desde a seleção de matérias-primas, fabrico e obtenção do produto acabado, à embalagem, armazenamento, transporte e comercialização, até ao consumidor final (27).

Uma vez que os alimentos para animais de estimação são maioritariamente constituídos por produtos e subprodutos de origem animal, espera-se nestes uma microbiota abundante e diversa, nomeadamente por contaminação de microrganismos patogénicos oriundos da produção primária. Apesar da existência de medidas e processos que garantam a segurança e qualidade dos alimentos ao longo da cadeia de produção, a demanda pela sua procura originou um aumento significativo na produção o que, conseqüentemente, levou a uma maior exposição dos alimentos aos diversos perigos alimentares associados a cada etapa de produção. Assim, o principal requisito da indústria alimentar é conhecer devidamente todas as características e etapas do fabrico deste tipo de alimentos, pois os diversos tipos de alimentos para animais de estimação comercializados diferem entre si não só no tipo de processamento a que são sujeitos, mas também no tipo de preparação a que as matérias-primas utilizadas na sua constituição são sujeitas. Desta forma, antes de serem enviados para a linha de produção, os ingredientes são frequentemente submetidos a tratamentos com o objetivo de reduzir a contaminação microbiana, para além desta etapa, os alimentos são produzidos em condições de segurança sanitária. O processo de renderização (tratamento industrial de subprodutos animais em materiais mais úteis) permite separar os sólidos da humidade e da gordura de forma a produzir farinhas proteicas, gorduras e óleos de animais, através da utilização de temperaturas elevadas. Para tal as gorduras são filtradas e a mistura de carne e ossos é seca e transformada naquilo a que chamamos de “farinha de carne” utilizada essencialmente nos alimentos secos. Apesar da carne ser historicamente considerada o ingrediente de maior risco de contaminação microbiológica, outros ingredientes como o trigo e a farinha de trigo, por vezes são utilizados como ingredientes nos alimentos para animais de estimação, podem veicular bactérias importantes como por exemplo *Salmonella* e *Escherichia coli* (28). A re-contaminação dos ingredientes, previamente sujeitos a altas temperaturas aquando do tratamento dos subprodutos animais, pode acontecer novamente antes da ocorrência do processamento do alimento seco na extrusora. De certa forma a exposição dos alimentos secos a perigos microbiológicos não acaba no momento da extrusão, podendo ocorrer ao longo do seu circuito de confeção (contaminação de equipamentos, recipientes e superfícies, dos trabalhadores, poeiras, etc.). Isto porque após

a remoção dos alimentos secos do interior da extrusora, estes são arrefecidos à temperatura ambiente num local adequado, onde são adicionados compostos termolábeis (aromatizantes por exemplo) e só após este processo é que o alimento é armazenado e selado em embalagens próprias e disponibilizados para comercialização. Como estas etapas ocorrem por norma à temperatura ambiente e sem nenhum controlo térmico, os alimentos são vendidos sem haver a garantia da sua esterilidade na totalidade, havendo a possibilidade, ainda que reduzida devido ao seu baixo aw, de um eventual crescimento microbiano (29). Durante toda a cadeia de produção dos alimentos secos, diferentes medidas são implementadas de forma a minimizar o risco de contaminação do produto final, sendo as superfícies da cadeia de produção, assim como o produto final, rotineiramente testados para possíveis contaminantes, principalmente *Salmonella* e *Enterobacteriaceae* (27). Mesmo com todos os cuidados e tratamentos industriais ao longo do processo de fabrico, existe sempre a possibilidade dos animais da produção primária que dão origem às matérias-primas estarem contaminados e os tratamentos a que estas são sujeitas (temperaturas baixas por exemplo) não serem suficientes para a eliminação ou redução de multiplicação de microrganismos.

No caso dos alimentos húmidos, como são selados hermeticamente numa embalagem própria e sujeitos a um processamento térmico que contribui para o aumento do seu tempo de vida útil, a sua segurança e qualidade microbiológica estão por norma asseguradas. Todavia a parte selada da sua embalagem pode perder a sua integridade com o passar do tempo, expondo o alimento ao meio ambiente e, conseqüentemente, a possíveis contaminações que possam existir no local de armazenamento onde a embalagem se encontra ou até mesmo na sua superfície (29). Além disso, após abertura, estes alimentos podem ser contaminados por exemplo por fómites ou mãos do consumidor, sendo que o alto aw característico dos alimentos húmidos pode favorecer o crescimento microbiano se o produto não for adequadamente refrigerado.

Por razões óbvias, os alimentos crus são os mais propensos a contaminação pois não são sujeitos a qualquer tipo de tratamento térmico. *Salmonella* é um contaminante comum de carne crua, mas este patogénico alimentar também tem sido observado em carne seca à base de produtos não cozidos como orelhas de porco e guloseimas para mastigar, ou até mesmo em alimentos tratados termicamente como os alimentos secos (30,31), o que aumenta a complexidade da origem destes contaminantes. No fabrico de alimentos crus para animais de estimação devem-se ter em atenção as condições de armazenamento destes produtos, de modo a evitar o desenvolvimento de bactérias, como é o caso da *Listeria monocytogenes*, bactéria psicrófila que consegue proliferar a temperaturas de refrigeração e sobreviver sob temperaturas de congelação (32).

De uma forma geral, o circuito de produção destes alimentos deve ser projetado de forma a que os produtos que sofreram tratamento de descontaminação não entrem em contacto com os equipamentos, ingredientes e outros produtos crus de modo a evitar possíveis re-contaminações. Desta forma as instalações deverão garantir que o processo de receção e armazenamento das matérias-primas não seja o mesmo do armazenamento dos alimentos prontos para serem comercializados, garantindo também que as operações efetuadas nos locais designados para armazenamento e o local de produção sejam realizadas de forma segura e em condições de higiene. Aquando da receção das matérias-primas, estas devem ser inspecionadas de forma a garantir que não há embalagens danificadas, que os materiais perecíveis ou congelados foram transportados em condições de temperatura e armazenamento adequadas, e também os veículos em que foram transportados se encontravam devidamente higienizados. Ao longo da cadeia de produção deve ser garantida a existência de contentores adequados e devidamente identificados que permitam a recolha, remoção e descarte dos resíduos produzidos ao longo da confeção do alimento de forma a evitar uma potencial contaminação dos produtos na fase de processamento; desta forma estes contentores devem estar localizados num local adequado tendo em conta a instalação dos equipamentos. Os contentores devem ser mantidos fechados e deve ser estabelecida a frequência do seu esvaziamento de maneira a não se tornar num local propício ao desenvolvimento de possíveis contaminantes, como por exemplo pragas. A remoção dos contentores deve ser feita de forma eficaz, controlada e num local apropriado (27).

Entre outras possíveis fontes de contaminação dos produtos alimentares destacam-se pequenos eventos localizados, como por exemplo: a presença de gotículas de água nas tampas dos reatores que possam conter microrganismos, estabelecendo muitas vezes um local propício para o seu desenvolvimento; os equipamentos (por exemplo, extrusoras e fornos) e as superfícies em que a limpeza e desinfeção nem sempre é possível na totalidade constituindo um local propício para a presença e proliferação de microrganismos patogénicos; ou as poeiras que se acumulam esporadicamente no chão da fábrica apesar de não estarem em contacto permanente com os alimentos, através do fluxo de ar formado pelo ar condicionado e pela circulação dos trabalhadores, podem ser facilmente transportadas para os locais de confeção dos alimentos, sendo assim necessário garantir uma limpeza regular do local onde se acumulam com facilidade. As más práticas de higiene exercidas pelos trabalhadores, como por exemplo falta de hábito de correta higienização das mãos, podem ser também uma forma de transmissão de microrganismos; também as instalações de higiene pessoal (casas de banho e balneários) utilizadas pelos trabalhadores devem estar devidamente higienizadas e limpas de forma evitar a ocorrência

de potenciais riscos que comprometam a segurança alimentar, e também não devem estar diretamente ligadas a uma área de produção (27). Resumindo, as fontes de contaminação dos alimentos para animais de estimação podem ocorrer pela introdução de matérias-primas contaminadas, durante o transporte e recepção das mesmas, no processo de fabrico, embalagem, transporte do produto finalizado e comercialização (Figura 4).

Finalmente, a contaminação dos alimentos para animais de estimação pode ocorrer em ambiente doméstico, por exemplo se após abertura de um alimento húmido enlatado este não for devidamente refrigerado até ser finalizado, ou durante o manuseamento dos alimentos sem as condições apropriadas de higiene.



Figura 4. Representação das várias etapas da cadeia de produção alimentar para animais de estimação em que pode ser provável ocorrer contaminação microbiológica. (Adaptado de: https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/investigating-outbreaks/figure_food_production.html)

1.3. Perigos microbiológicos associados aos alimentos para animais de estimação e sua implicação para a saúde animal e humana

A contaminação microbiológica dos alimentos para animais de estimação é muito comum, podendo ocorrer quer nas matérias-primas usadas no processamento alimentar, quer durante a manipulação, processamento, ou transporte e armazenamento dos alimentos através de contaminação cruzada com manipuladores e superfícies contaminadas, tal como já referido na secção anterior. Nos perigos biológicos estão incluídos bactérias, vírus, parasitas, fungos e protozoários, mas um dos mais importantes

e comuns é a presença de bactérias patogénicas (33). Ainda que em menor grau, existem descrições de vírus (ex.: hepatite E) ou protozoários (ex.: *Toxoplasma gondii* responsável pela toxoplasmose) em alimentos destinados a animais de estimação; por exemplo, van Bree *et al.* (2018) analisaram 35 amostras cruas variadas de cães e gatos de oito marcas distintas e detetaram *T. gondii* em duas amostras (34).

A ingestão de alimentos contaminados com bactérias patogénicas ou produtos do seu metabolismo (toxinas) pode estar na origem do desenvolvimento de doenças microbianas. No caso dos alimentos para animais de estimação, o risco para o Homem é indireto e os perigos microbiológicos podem ser os mesmos dos géneros alimentícios destinado ao consumo do Homem (35). Quando ingeridos podem desencadear doenças microbianas de origem alimentar e o grau de gravidade provocado pela ingestão destes perigos pode ser diferente no homem e nos animais. De facto, os animais tendem a ser mais resistentes à ação de alguns patogénicos, não manifestando sintomatologia na maior parte dos casos, servindo muitas vezes de reservatório e vetores de alguns microrganismos (35,36). Outro perigo, ainda pouco explorado neste tipo de amostras, mas muito atual e importante, é a possibilidade destes alimentos para animais de estimação também poderem ser veículos de bactérias resistentes a antibióticos (patogénicas ou não).

1.3.1. Bactérias patogénicas

As bactérias patogénicas mais frequentemente associadas aos alimentos para animais de estimação são *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Clostridium* produtoras de toxinas, *Yersinia* e *Campylobacter*. Estas bactérias podem estar associados a quadros de toxi-infeção ou infeção alimentar, de acordo com a produção de toxinas no intestino do hospedeiro ou se a doença não está associada à produção de toxina, respetivamente (32). Apesar do número de surtos humanos associados a alimentos para animais de estimação contaminados com bactérias patogénicas ser baixo nos países com sistemas de vigilância, tem-se verificado um aumento do registo de surtos humanos e de recolha de lotes de rações em grande escala. Estes envolveram casos em que foi possível associar a doença/surto nos donos ao consumo de rações e petiscos por parte dos seus cães ou gatos. O impacto destes eventos para a Saúde Pública é preocupante devido ao grande número de pessoas infetadas e tem gerado preocupação entre consumidores e produtores.

A detecção de bactérias patogénicas nos diversos tipos alimentares destinados a animais de estimação é crescentemente frequente em anos mais recentes. Por exemplo, em 2005, Weese *et al.*, analisaram um total de 25 amostras cruas para animais de estimação encontrando-se a *S. Typhimurium* variante monofásica em 20% das amostras (à base de bovino, galinha e avestruz) analisadas (37). Nemser *et al.*, em 2014, analisaram 196 amostras de alimentos crus para cães e gatos das quais 15 amostras encontravam-se contaminadas com *Salmonella* - neste estudo também analisaram alimentos secos para cães e gatos e, em contraste, apenas detetaram uma amostra contaminada com *Salmonella* (31). Hellgren *et al.* em 2019 analisaram 60 amostras cruas para cães das quais 4 amostras (à base de bovino e peru) testaram positivo para a presença de *Salmonella* de diferentes serótipos (*S. Rissen*, *S. Typhimurium* variante monofásica, *S. Leeuwarden*) (38). O primeiro surto por alimentos secos para cães foi associado a *Salmonella* Schwarzengrund nos E.U.A entre 2006-2008, tendo infetado 79 pessoas das quais 30 crianças (39). Em 2012 foi reportado novamente um surto associado a alimentos secos para cães e envolvendo contaminação por *Salmonella*, provocado neste caso por *S. Infantis* através do contacto direto com os alimentos e infetando um total de 47 pessoas dos E.U.A e Canadá (39). Variantes de *E. coli* patogénicas já foram detetadas em diferentes estudos, nomeadamente por Nemser *et al.*, em 2014, em que reportaram a presença de *E. coli* não-O157:H7 produtoras de toxina Shiga em alimentos crus e guloseimas para animais (31). Em agosto de 2017, foram reportados 4 casos de infeção humana causada por *E. coli* STEC O157, sendo que os isolados obtidos produziam um subtipo de toxina *stx2a*, associada ao desenvolvimento de doença grave. Dos 4 casos relatados 3 contactaram com animais alimentados à base de alimentação crua, mais especificamente à base de tripas cruas. Apesar deste estudo não ter conseguido isolar dos alimentos crus analisados a mesma estirpe causadora de doença nos humanos, permitiu concluir que os alimentos para animais de estimação crus, neste caso tripa, podem ser uma potencial via de transmissão de bactérias patogénicas para os humanos colocando em risco a sua saúde (40). Nemser *et al.*, em 2014, analisaram 576 diferentes tipos de amostras que incluíam alimentos crus, secos e guloseimas. Destas, apenas 32 amostras cruas foram positivas para *L. monocytogenes* (31). van Bree *et al.*, em 2018, analisaram 35 amostras cruas variadas para cães e gatos de oito marcas distintas. Das amostras analisadas 3 estavam contaminadas com *L. monocytogenes* (34). Bottari *et al.*, em 2020, analisaram 21 amostras de alimentos crus de diferentes marcas e tipos de carne, comercializadas em três lojas online muito populares em Itália, das quais 90% estavam contaminadas com *L. monocytogenes* (41).

A descrição deste tipo de microrganismos patogénicos nos alimentos para animais de estimação é preocupante, principalmente nos alimentos crus por não serem sujeitos a um processamento térmico capaz de os eliminar. O seu consumo deve ser acompanhado do reforço em cuidados de higiene na manipulação dos alimentos e no contato direto com os animais. Mesmo tendo em conta todos estes fatores de contaminação e perigos associados, há ainda poucas evidências de avaliação de risco de alimentos para animais de estimação como veículos de microrganismos patogénicos com implicação direta na saúde dos próprios animais ou indiretamente para a saúde do Homem.

As empresas do setor alimentar para animais de estimação têm adotado uma política de segurança alimentar ao longo do processo de fabrico através da implementação da legislação nacional e da UE, do estabelecimento de boas práticas de fabrico, bem como do desenvolvimento de medidas preventivas de maneira a antecipar a ocorrência de alguma situação que possa colocar em causa a segurança do alimento.

Os alimentos para animais de estimação são regulamentados por uma legislação da UE que também abrange o setor de alimentos destinados ao consumo por parte de animais produtores de géneros alimentícios. Da legislação comunitária aplicável às empresas de produção alimentar para animais de estimação destacam-se as seguintes: Regulamento (CE) nº 178 de 2002 que estabelece as normas gerais da legislação alimentar (42); Regulamento (CE) nº 183 de 2005 que estabelece as normas de higiene no fabrico de alimentos para animais de estimação de modo a garantir a proteção do consumidor animal (14); o Regulamento (CE) nº 1069 de 2009 (11) e o Regulamento (CE) nº 142 de 2011 que estabelece as regras sanitárias acerca dos subprodutos animais e produtos derivados não destinados ao consumo humano e a sua implementação (o mencionado na secção anterior) (12); e o Regulamento (CE) nº 767 de 2009, alterado pelo Regulamento (CE) nº 2279 de 2017 que define as regras de fabrico, rotulagem e colocação no mercado dos alimentos (43). A alimentação para animais de estimação é representada a nível europeu pela *European Pet Food Industry Federation* (FEDIAF) e a nível nacional pela Associação Portuguesa dos Alimentos Compostos (IACA), ambas responsáveis pela publicação e atualização das leis impostas pela UE que regulamentam os alimentos para animais de estimação, bem como pelo desenvolvimento de guias de boas práticas associadas ao fabrico, armazenamento, distribuição e marketing, não atuando assim na elaboração de regulamentos e leis, os quais são elaborados pela Comissão Europeia (44).

A monitorização da presença de possíveis contaminantes microbiológicos durante o fabrico de alimentos para animais de estimação deve incluir amostras ambientais, da linha de produção e do produto embalado pronto a ser comercializado (27). No caso de rações secas, cruas e alimentos de mastigar para cães feitos à base de subprodutos animais,

devem ser colhidas amostras aleatórias durante a produção e produto acabado para verificar a conformidade com os critérios microbiológicos que incluem pesquisa de *Salmonella* e contagem de *Enterobacteriaceae* (Regulamento (CE) n.º 142 de 2011). Deve ser garantida a ausência de *Salmonella* em 25 gramas dos alimentos crus e transformados de forma a serem classificados como seguros. No caso dos alimentos crus, a contagem de *Enterobacteriaceae* pode ocorrer até ao valor limite de 10 ufc/g ou entre >10 e 5000 ufc/g no máximo de 2 amostras em 5 testadas do mesmo lote (nível aceitável marginal). Nos alimentos transformados a contagem de *Enterobacteriaceae* é aceitável até ao valor limite de 10 ufc/g ou entre >10 e 300 ufc/g no máximo de 2 amostras em 5 testadas do mesmo lote (12). Para alimentos enlatados ou acondicionados em recipientes hermeticamente fechados e tratados termicamente, a pesquisa de *Salmonella* e contagem de *Enterobacteriaceae* não são necessárias (45).

1.3.2. Bactérias resistentes a antibióticos

Nas últimas décadas tem-se assistido a um aumento de bactérias resistentes a antibióticos não só a nível hospitalar, mas também na comunidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a disseminação de bactérias resistentes a antibióticos é um problema de extrema importância a nível mundial, tendo sido considerada uma das dez ameaças globais para a saúde pública em 2019 (46). As bactérias resistentes a múltiplos antibióticos são responsáveis por cerca de 700.000 mortes por ano e só na UE estimam-se 33.000 mortes com custos de 1.5 biliões de euros por ano em saúde e perdas de produtividade (47). O uso inadequado e em grande escala de antibióticos quer no Homem quer nos animais tem contribuído para a seleção de bactérias resistentes a antibióticos que, quando envolvidas em infeções humanas, são frequentemente associadas a contextos terapêuticos ineficazes, ou de difícil tratamento, aumentando a taxa de mortalidade e de custos hospitalares (47).

A resistência a antibióticos é um fenómeno complexo e multifatorial. As bactérias resistentes aos antibióticos já não se restringem exclusivamente ao meio hospitalar com o ambiente, os animais e os alimentos a assumirem um papel crescente na disseminação da resistência na comunidade (Figura 5). A cadeia alimentar tem-se revelado uma importante via na transmissão de bactérias resistentes a antibióticos aos humanos devido ao uso abusivo de antibióticos na produção animal que levou à seleção e dispersão de bactérias resistentes na cadeia alimentar. O ambiente de produção animal é assim considerado um reservatório importante destes microrganismos que podem ser transmitidos ao Homem

pelo contato direto com animais, ambiente e/ou cadeia alimentar. Também a contaminação ambiental (solos, águas) com bactérias provenientes das águas residuais de esgotos hospitalares e municipais e dos sistemas de produção animal contribuem para a disseminação de bactérias resistentes a antibióticos. Assim, a promoção da Saúde Pública no que diz respeito ao flagelo da resistência aos antibióticos está intimamente ligada ao sucesso de políticas de “Uma só saúde” que promovem de uma forma indissociável a saúde humana, ambiental e animal (48–50).



Figura 5. Vias de transmissão ao homem e animais de bactérias resistentes a antibióticos (Retirado de: <https://amr.biomerieux.com/en/challenges/from-farm-to-food-to-people-one-health/>).

O papel dos animais de estimação na propagação de resistência aos antibióticos tem vindo a assumir maior destaque em anos recentes. Os animais de estimação são considerados um reservatório de bactérias que por vezes não desencadeiam doença neles próprios, mas que podem ser transferidos para os seus donos através do contacto próximo entre animais e humanos, principalmente entre os animais e as crianças, ou pela partilha do ambiente doméstico. Além disso, os animais de estimação, especialmente cães e gatos, também tomam antibióticos com alguma frequência para tratamento de infeções bacterianas e em intervenções cirúrgicas. A nível Europeu, as famílias de antibióticos mais utilizadas nos animais de estimação incluem por ordem decrescente as penicilinas, as

cefalosporinas de 1ª e 2ª geração, os macrólidos, as sulfonamidas e outras que variam de país para país (aminoglicosídeos, polimixinas, etc.), as tetraciclina e as fluoroquinolonas (51,52). Grande parte destes antibióticos é comum aos usados na medicina humana (53), podendo assim a seleção de bactérias resistentes a antibióticos ser favorecida oportunamente tanto nos animais de estimação como no Homem.

À semelhança do que acontece com as bactérias patogénicas ou qualquer outro contaminante, também as bactérias resistentes aos antibióticos podem ter origem na produção primária e vão resistindo aos diferentes tratamentos durante o fabrico dos alimentos. Embora existam muito poucos estudos que incluam a caracterização bacteriana no que toca à suscetibilidade a antibióticos, os poucos estudos disponíveis mostram a presença de bactérias (fundamentalmente *Salmonella* e *Enterobacteriaceae*) com perfil de resistência a antibióticos, incluindo de multirresistência.

Um estudo realizado na Holanda, em 2017, que utilizou vários tipos alimentares (crus, secos e húmidos) para gatos reportou a presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro alargado (ESBL) em isolados de *E. coli* apenas nos alimentos crus (54). Em 2018, diferentes espécies produtoras de ESBL da ordem *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter braakii* e *Raoultella planticola*) foram detetadas em 60.8% das amostras de alimentos crus em que a fonte proteica era proveniente de diferentes países (55). Neste mesmo estudo os investigadores também analisaram a suscetibilidade dos isolados obtidos a outros antibióticos para além de beta-lactâmicos, tendo verificado que 62.7 % das amostras possuíam isolados multirresistentes; também detetaram que dois isolados *E. coli* eram portadores do gene *mcr-1* que codifica para resistência à colistina, um antibiótico de alta prioridade para a medicina humana segundo a OMS (55).

No ano de 2003, no Canadá, Pitout JDD *et al.* estudaram a possibilidade de transmissão de isolados de *S. Newport* multirresistentes através do manuseio de guloseimas ou snacks para animais de estimação, visto que guloseimas como orelhas de porco para cães têm sido sugeridas como uma fonte de transmissão de *Salmonella* para humanos. Foi então analisada uma amostra de guloseima (hambúrguer de carne de vaca seca) na qual foi detetada a presença de *S. Newport* PT 14 resistente a múltiplos antibióticos (cloranfenicol, ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefoxitina, cefepima ceftazidima). Paralelamente, analisaram uma amostra das fezes do paciente em que os resultados obtidos foram positivos para a presença de *S. Newport* 14 com um perfil de suscetibilidade a antibióticos igual ao do isolado proveniente da guloseima para cães. Desta forma a possibilidade de transmissão deste tipo de bactérias através de guloseimas para animais não deve ser descartada (56). Entre 2005 e 2006, Wong TI *et al.* analisaram

um conjunto de isolados de *Salmonella* obtidos a partir de 300 amostras de snacks ou guloseimas para animais de estimação importadas de diferentes países (Austrália, China, Índia e Tailândia) e de produção nacional da Nova Zelândia. As amostras importadas analisadas eram essencialmente cruas (couro de porco, vaca e de origem animal não especificada) e a presença de *Salmonella* de diferentes serótipos (*S. London*, *S. Kentucky*, *S. Borreze*, *S. Aberdeen*, *S. Infantis*, *S. Havana*, *S. Montevideo*, *S. Orion* e *S. Senftenberg*) foi verificada em 5,3% das amostras analisadas. Neste estudo a presença de isolados resistentes a antibióticos só foi estudada nas amostras importadas: 18,8% apresentaram resistência à ampicilina e gentamicina, 12,5% ao ácido nalidíxico e 6,3% à estreptomicina (30). Finley R *et al.* analisaram em 2008 um conjunto de isolados de *Salmonella* (serótipos *S. Hadar*, *S. Heidelberg* e *S. Infantis*) obtidos a partir de amostras cruas (especialmente à base de galinha) para animais de estimação de três regiões do Canadá e verificaram a presença de isolados resistentes a diferentes antibióticos, tais como, ampicilina, canamicina, cefalorina, cefoxitina, ceftiofur, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, sulfametoxazol, tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol. As resistências mais comuns foram à ampicilina na região de Mississauga (94% dos isolados) e Calgary (100% dos isolados), e à tetraciclina na região de Guelph (76% dos isolados) (57). Os mesmos autores analisaram noutro estudo um conjunto de isolados provenientes de amostras de snacks ou guloseimas de orelha de porco adquiridas em duas regiões do Canada onde foram identificados diferentes serótipos de *Salmonella* (*S. Bovismorbificans*, *S. Give*, *S. Derby*, *S. Manhattan*, *S. Worthington*, *S. Agona*, *S. London* e II:ROUGH-O) resistentes a diferentes antibióticos destacando-se a resistência à tetraciclina e sulfametoxazol (58).

O único estudo que também caracterizou *Enterococcus*, uma bactéria de Gram-positivo patogénica oportunista, analisou 420 amostras comerciais de alimentos não enlatados e guloseimas nos E.U.A., tendo reportado 3% de multirresistência e os maiores níveis de resistência registados (>10%) foram para a ciprofloxacina e tetraciclina (59). Neste estudo também foram detetados isolados multirresistentes de *E. coli*, com maior incidência para a tetraciclina, antibiótico frequentemente usado na produção animal. Apesar do número limitado de estudos, as evidências sugerem que os alimentos para animais de estimação podem ser veículos de bactérias com perfis de multirresistência a antibióticos. O facto de em poucos estudos já terem sido identificados genes de resistência ou bactérias que expressam níveis de resistência clínica a antibióticos considerados como críticos (ex.: gentamicina, cefalosporinas de 3ª geração, ampicilina, colistina) (60) na medicina humana é particularmente preocupante e alerta para a necessidade de mais estudos de vigilância que incluam este tipo de amostras. Curiosamente, há já vários anos se sabe que os cães podem ser um reservatório de *Enterococcus* multirresistentes, e com uma resistência de

alto nível à ampicilina em particular, incluindo estirpes simultaneamente encontradas em cães e pacientes hospitalizados (61). Mais recentemente, a toma de antibióticos e o consumo de carne crua pelos cães foram reconhecidos como fatores de risco para a ocorrência de *Enterococcus* resistentes à ampicilina em cães (62). No entanto, ainda não foram realizados estudos que analisem *Enterococcus* em amostras de rações comercializadas cruas de forma a perceber a extensão desta questão. No entanto, tendo em consideração as matérias-primas usadas na produção de alimentos para animais de estimação, é de realçar que inúmeros estudos de diferentes países já reportaram a presença de *Enterococcus* resistentes à ampicilina e a outros antibióticos clinicamente relevantes (ex., vancomicina ou linezolida) em amostras de carne crua de matadouro ou supermercado (63–66).

As bactérias podem apresentar resistências naturais ou intrínsecas a um ou mais antibióticos, ou adquirir mutações genéticas, elementos genéticos móveis de outras bactérias que lhes conferem novos fenótipos a determinados antibióticos quando comparadas a outras estirpes da mesma espécie (resistências adquiridas) (67). A disseminação de genes de resistência a antibióticos entre bactérias pode ser facilitada por mecanismos de transferência genética horizontal que envolvem elementos genéticos móveis (ex.: plasmídeos, transposões). Neste sentido, o mais provável é que os genes de resistência já identificados em bactérias obtidas de alimentos para animais de estimação estejam incorporados em elementos genéticos móveis que frequentemente contêm mais genes que conferem resistência a diversas classes de antibióticos clinicamente relevantes, favorecendo eventos de co-seleção. Desta forma, o uso de um único antibiótico pode selecionar não só isolados resistentes a esse antibiótico, como também isolados resistentes a outros antibióticos, aumentando assim a oportunidade de transmissão de bactérias multirresistentes.

Um dos géneros bacterianos que apresenta resistência intrínseca a vários antibióticos assim como uma propensão especial em adquirir e acumular genes de resistência a antibióticos através do intercâmbio de elementos genéticos com outras bactérias do mesmo ou de diferentes géneros, é *Enterococcus*. Esta característica, aliada à sua distribuição ubíqua na natureza (incluindo na cadeia alimentar) e à sua importância atual como agente de infeções humanas muitas vezes difíceis de tratar, justificam o seu estudo particular nesta tese.

1.4. *Enterococcus spp.*

Enterococcus são bactérias Gram-positivas que pertencem à família *Enterococcaceae* e ao filo *Firmicutes*, fazendo parte de um grande grupo de bactérias ácido-lácticas usadas na indústria alimentar (68). São conhecidas atualmente mais de 50 espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* que se caracterizam por serem bactérias anaeróbias facultativas e fermentadoras da glucose através da formação de ácido láctico, catalase negativo, não formadoras de esporos, oxidase negativa e capazes de hidrolisar a esculina na presença de sais biliares a 40% (69,70). São classificadas como bactérias mesófilas, em que a sua temperatura de crescimento pode variar entre os 10°C a 45°C, com temperatura ótima de crescimento estabelecida nos 35°C, no entanto algumas estirpes conseguem sobreviver a temperaturas de 60°C durante um intervalo de tempo de 30 minutos. Podem crescer em ambientes com intervalos de pH grandes (4.4-9.6) e crescem em meios que contêm 6,5% NaCl (69–72). Assim, *Enterococcus* têm uma grande capacidade de adaptação a ambientes adversos e as condições extremas a que podem sobreviver, possibilitam a sua distribuição ubíqua na natureza e conseqüente colonização de diversos nichos ecológicos e hospedeiros. O seu principal reservatório é o trato gastrointestinal de humanos e animais (73), mas podem ser então detetados nos solos, águas, esgotos, plantas, produtos alimentares, mamíferos, pássaros e insetos (74).

1.4.1. Importância clínica e resistência a antibióticos

Até aos anos 80, *Enterococcus* eram considerados microrganismos com baixo impacto clínico e pouco patogênicos. No entanto, este paradigma foi alterado nas últimas décadas, sendo atualmente considerados patogênicos oportunistas importantes e uma causa proeminente de uma variedade de infeções hospitalares, tais como infeções do trato urinário, dos tecidos moles, bacteriemias, endocardites, infeções cirúrgicas, entre outras (75). Estas infeções hospitalares ocorrem fundamentalmente em condições em que o hospedeiro se encontra frágil ou perturbado, bem como determinadas condições contribuem para o aumento do risco de desenvolvimento de infeções enterocóccicas invasivas, como por exemplo as hospitalizações prolongadas, pacientes imunodeprimidos, idosos, tratamentos com dispositivos médicos invasivos, ou terapias antimicrobianas de largo espectro e por longos períodos (69). Devido às suas características intrínsecas, *Enterococcus* têm a capacidade de sobreviver por longos períodos em equipamentos médicos, nas superfícies das camas, portas, etc., o que explica a sua persistência no

ambiente hospitalar. Infecções por *Enterococcus* (ex.: infecções urinárias) na comunidade também são comuns, mas geralmente de fácil tratamento e resolução, ao contrário das infecções hospitalares, frequentemente severas e de difícil tratamento.

As espécies bacterianas com maior impacto na saúde humana e de relevância clínica são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, atualmente considerados agentes líder hospitalares (76). Outras espécies tais como *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus raffinosus* já foram associadas ao desenvolvimento de infecções em humanos, mas em muito menor número (69). *E. faecalis* sempre foi a espécie de *Enterococcus* predominantemente associada a infecções humanas, mas com o virar do século *E. faecium* foi ganhando um papel de destaque fazendo atualmente parte da lista de espécies bacterianas mais problemáticas e difíceis de tratar (77). *Enterococcus* são atualmente resistentes a inúmeras famílias de antibióticos, quer por mecanismos de resistência intrínseca ou natural (ex., cefalosporinas, aminoglicosídeos), quer por resistência adquirida (β -lactâmicos, aminoglicosídeos, glicopéptidos, quinolonas, macrólidos, tetraciclina, oxazolidinonas, gliciliclinas, lipopéptidos). A disseminação e o uso global e massivo de antibióticos em diferentes nichos ecológicos têm conduzido ao aumento alarmante e diversificação de mecanismos de resistência adquirida nas últimas décadas (78). A Tabela 1 inclui as famílias de antibióticos importantes no tratamento de infecções causadas por *Enterococcus* e/ou que são relevantes no estudo da epidemiologia deste gênero por serem muito usados nos animais e haver a possibilidade de transferência de resistência a partir de fontes não humanas (60).

O termo resistência **intrínseca** refere-se à capacidade conferida por genes geralmente presentes no cromossoma, o que significa que é comum entre estirpes da mesma espécie. São exemplos as espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* que contêm sempre os genes *vanC₁* e *vanC₂*, respectivamente, que codificam para resistência à vancomicina. Também *E. faecium* apresenta uma suscetibilidade diminuída aos β -lactâmicos uma vez que expressa uma PBP com uma baixa afinidade intrínseca para esta classe de antibióticos, a PBP5 (*Penicillin Binding Protein 5*), às quais os β -lactâmicos se ligariam para inibir a síntese do peptidoglicano da parede celular (78). Os aminoglicosídeos isoladamente não são eficazes contra *Enterococcus*, uma vez que não são capazes de atingir os ribossomas bacterianos devido à incapacidade de *Enterococcus* gerar energia suficiente associada à cadeia transportadora de elétrons para os bombear para o citoplasma. Apesar da resistência natural a aminoglicosídeos, a associação de um aminoglicosídeo (ex. gentamicina) e um inibidor da síntese da parede celular (ex. β -lactâmico como a ampicilina, ou um glicopéptido como a vancomicina) é sinérgica e frequentemente usada no tratamento de infecções

invasivas quando não há resistência adquirida a nenhuma destas classes de antibióticos (79).

Por outro lado, a resistência **adquirida** pode resultar de mutações no cromossoma ou da aquisição de novos genes de resistência a partir de DNA exógeno (de plasmídeos por exemplo) de estirpes da mesma espécie, ou de espécies de géneros diferentes. Tal é particularmente crítico em *Enterococcus* devido à facilidade em adquirir múltiplas resistências, acumulando novos genes e elementos genéticos com genes de resistência ou genes que codificam para virulência, etc. (78). *Enterococcus*, e principalmente *E. faecium*, são frequentemente resistentes a antibióticos clinicamente relevantes (ex.: ampicilina e vancomicina) através de mecanismos de resistência adquirida, sendo necessário o uso de antibióticos de última linha como a linezolida ou daptomicina. Nos seguintes parágrafos descrevem-se alguns dos mecanismos de resistência a antibióticos críticos no tratamento de infeções enterocócicas e que se conseguem identificar na cadeia alimentar.

A resistência de alto nível às **aminopenicilinas** (ex. ampicilina, amoxicilina) deve-se à aquisição de mutações específicas que conduzem a uma menor afinidade entre o antibiótico e a PBP5 ou à sobreexpressão de *pbp5*, gene que codifica para a PBP5 (78), estando a sua transferência já reportada (80). A resistência de alto nível à ampicilina é atualmente muito frequente em *E. faecium* hospitalares a nível global, incluindo a Europa (>75%) e Portugal (85%) (<https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Instance=GeneralAtlas>). Esta resistência é menos prevalente em isolados provenientes da comunidade, nomeadamente em ambientes de produção animal, alimentos e humanos saudáveis (geralmente <30%) (63,81,82). Recentemente, a resistência à ampicilina (AmpR) em *E. faecium* foi fortemente associada à presença do gene *ptsD* que parece ser um bom marcador de isolados AmpR obtidos do meio hospitalar ou de diferentes fontes na comunidade (83). Além disso, este gene está envolvido numa melhor colonização intestinal principalmente quando *E. faecium* é sujeito a tratamento com antibiótico (84).

E. faecium resistentes à vancomicina são atualmente microrganismos prioritários para a OMS pela sua frequente associação a infeções multirresistentes com opções limitadas de tratamento (85,86). Até à data, foram descritos 8 genótipos (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN*) de resistência adquirida aos **glicopéptidos** (vancomicina e teicoplanina), em que *vanA* e *vanB* são os mais prevalentes globalmente, tanto a nível hospitalar como na comunidade, nomeadamente na produção animal. Embora a avoparcina, glicopéptido usado como promotor de crescimento na Europa tenha sido

Tabela 1. Principais antibióticos usados no tratamento de infecções por *Enterococcus* ou importantes na sua epidemiologia.

Classe de antibiótico (exemplos)	Importância na medicina humana (OMS) ^b	Uso na medicina veterinária ^c	Mecanismo de ação	Mecanismos de resistência adquirida principais / co-seleção com outras classes
Glicopéptidos (vancomicina, teicoplanina)	1. <u>Maior prioridade</u> , criticamente importantes	Não	Inibição da formação do peptidoglicano e síntese da parede celular	-Produção de novos precursores de peptidoglicano com reduzida afinidade para os glicopéptidos; – Há oito operões de genes conhecidos mas os mais disseminados são <i>vanA</i> e <i>vanB</i> (em animais em particular predomina <i>vanA</i>)
Oxazolidinonas (linezolida)	2. Alta prioridade, criticamente importantes	Não	Inibição da síntese proteica	-Mutações ribossomais (23S rRNA); -Genes transferíveis <i>cfr</i> , <i>optrA</i> , <i>poxtA</i> ; <i>cfr/optrA/poxtA</i> conferem resistência cruzada aos fenicóis e <i>poxtA</i> também à tetraciclina
Lipopéptidos (daptomicina)	2. Alta prioridade, criticamente importantes	Não	Ação complexa na membrana citoplasmática	-Mecanismo de resistência complexo com modificação da membrana celular
Gliciliclinas (tigeciclina)	2. Alta prioridade, criticamente importantes	Não	Inibição da síntese proteica	-Mutações ribossomais (<i>rpsJ</i>), sobre-regulação <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i>
Estreptograminas (quinupristina-dalfopristina)	3. Muito importantes	Não	Inibição da síntese proteica	-Modificação enzimática [<i>vat(D)</i> , <i>vat(E)</i>], bombas de efluxo, alteração do local alvo [<i>erm(B)</i>]
Fluoroquinolonas (ciprofloxacina)	1. <u>Maior prioridade</u> , criticamente importantes	Em animais de produção e estimação	Inibição da replicação do ADN pela interação com topoisomerasas e girase	-Mutações nos genes <i>parC/gyrA</i>

Macrólidos^a (eritromicina)	1. <u>Maior prioridade</u> , criticamente importantes	Em animais de produção e estimação	Inibição da síntese proteica	-Genes <i>erm</i> [<i>erm(B)</i> é o mais comum] que codifica para enzima que altera o local alvo RNA 23S
Aminoglicosídeos (gentamicina, estreptomicina)	2. Alta prioridade, criticamente importantes	Em animais de produção e estimação	Inibição da síntese proteica	-Aquisição de genes que codificam enzimas inativadoras das várias moléculas desta classe, envolvendo acetilação, adenilação ou fosforilação, e impedindo ligação aos alvos ribossomais
Aminopenicilinas (ampicilina)	2. Alta prioridade, criticamente importantes	Em animais de produção e estimação ^d		-Mutações ou sobreexpressão da <i>PBP</i> (proteína de ligação à penicilina) 5
Tetraciclina (tetraciclina)	3. Muito importantes	Em animais de produção e estimação	Inibição da síntese proteica	-Bombas de efluxo ou proteção ribossomal (genes <i>tet</i>); -Selecionam resistência cruzada às oxazolidinonas através do gene <i>poxA</i>
Anfenicóis (cloramfenicol)	3. Muito importantes	Em animais de produção e estimação	Inibição da síntese proteica	-Acetiltransferase codificada pelo gene <i>cat</i> que modifica o antibiótico -Selecionam resistência cruzada às oxazolidinonas através de <i>cfr</i> , <i>optrA</i> e <i>poxA</i>

^aNão se incluem os ketólidos como a telitromicina pois estes não são aprovados para uso veterinário.

^bA importância e prioridade das diferentes classes de antibióticos na medicina humana devido ao uso não humano é categorizada segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), e tendo em conta os diferentes géneros bacterianos mais importantes para o Homem, da seguinte forma: Maior prioridade, criticamente importantes > Alta prioridade, criticamente importantes > Muito importantes > Importantes (60).

^cO uso na medicina veterinária foi consultado no relatório da Agência Europeia de medicamentos sobre a categorização de antibióticos na Europa (87).

^dPrimeira linha de tratamento nas infeções urinárias de animais de estimação.

banido em 1997, ainda continua a haver descrições de *Enterococcus* resistentes à vancomicina na cadeia alimentar, embora com taxas reduzidas e decrescentes (88). Em Portugal, *E. faecium* e *E. faecalis* resistentes à vancomicina têm sido unicamente associados a *vanA*, quer provenientes de humanos quer de animais (81,89,90). Nos isolados resistentes à vancomicina, os compostos precursores do peptidoglicano da parede celular, que são os alvos da ação dos glicopéptidos, são modificados reduzindo a afinidade da vancomicina (78).

As **oxazolidinonas** (linezolida e tedizolida) são a classe mais recente de antibióticos desenvolvida para o tratamento de bactérias Gram-positivas multirresistentes, nomeadamente *Enterococcus* resistentes à vancomicina ou *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, sendo, portanto, um antibiótico de reserva ou de última linha (78). São inibidores da síntese proteica através da ligação à subunidade 50S ribossomal e desde a sua introdução no mercado em 2000 que diferentes mecanismos de resistência já foram descritos tanto em *Enterococcus* de origem hospitalar como em animais de produção, alimentos e ambiente. A nível hospitalar, a resistência tem sido atribuída principalmente a mutações no alvo das oxazolidinonas, o domínio V do gene rRNA 23S, mas a aquisição de diferentes genes de resistência tem sido crescentemente documentada, principalmente em ambiente de produção animal. Até à data são conhecidos os seguintes genes de resistência adquirida: *cfr* (com variantes de A-E) que confere resistência cruzada a diferentes antibióticos anti-ribossomais inibidores da síntese proteica (fenicóis, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas e estreptograminas) por metilação do rRNA 23S; *optrA* que confere resistência aos fenicóis e oxazolidinonas através de proteção ribossomal; e *poxtA* que confere resistência aos fenicóis, oxazolidinonas e tetraciclina também através de proteção ribossomal (91). De forma geral, as taxas atuais de resistência à linezolida são baixas (<1%), talvez porque a resistência a nível hospitalar ocorre muitas vezes após exposição da bactéria à ação da linezolida originando as mutações ribossomais que são reversíveis (91). No entanto, há cada vez mais registos da presença de genes adquiridos em *Enterococcus*, principalmente *optrA*, de diferentes origens mas grandemente em ambientes de produção animal (63,91,92).

Dada a relevância clínica destes microrganismos, os dados de resistência antimicrobiana de isolados invasivos de *E. faecalis* e *E. faecium* são reportados pelo Centro Europeu de Prevenção e Controlo das doenças (ECDC) pela rede de vigilância Europeia (EARS-Net) (93). Este relatório anual reporta as taxas de resistência de *E. faecium* resistentes à vancomicina e gentamicina (*high-level resistance*), e de *E. faecalis* resistentes à gentamicina, todas elas também descritas na cadeia alimentar.

1.4.2. Presença de *Enterococcus* na cadeia alimentar

Devido ao seu habitat natural no trato gastrointestinal dos animais e à sua distribuição ubíqua no ambiente, *Enterococcus* podem estar presentes em alimentos crus variados, principalmente de origem animal, como por exemplo produtos lácteos (leite cru, queijos), carnes, peixes (essencialmente nas suas vísceras e pele) e frutos do mar (94). Também podem estar presentes em produtos prontos a comer, principalmente alimentos fermentados à base de carne e leite (ex., queijos). São muitas vezes implicados em processos de deterioração de carnes fermentadas (apenas salgadas, curadas ou até cruas), pois são muito resistentes ao pH e salinidade, podendo multiplicar-se em números elevados (95). Também podem ser um problema em carnes cozidas e processadas pois podem ser capazes de resistir ao processamento térmico (não ultrapassa geralmente os 60-70°C), especialmente se estiverem presentes em grande número (96). No entanto, e uma vez que pertencem ao grupo das bactérias ácido-lácticas, desempenham por outro lado um papel importante devido à sua atividade como fermentadores conferindo características organoléticas benéficas em muitos alimentos fermentados como os queijos ou derivados de laticínios, ou por inibirem os efeitos deterioradores de outros patogénicos através da produção de bacteriocinas (95).

Assim, a aliança da resistência a múltiplos antibióticos e a condições adversas (temperatura, pH, salinidade) com a sua distribuição natural contribui para que *Enterococcus* resistentes a antibióticos sejam frequentemente encontrados em diferentes tipos de alimentos. Durante o processo de evisceração em matadouros, *Enterococcus* fecais podem contaminar produtos alimentares de origem animal, havendo estudos que mostram que mais de 90% dos alimentos de origem animal contaminados com *Enterococcus* no matadouro (97), nomeadamente daqueles com resistência a antibióticos. Desta forma, a contaminação de matérias-primas e de alimentos não processados é frequente, mas as superfícies de contato e equipamentos da fábrica não são sempre consideradas como uma fonte potencial de disseminação de bactérias resistentes a antibióticos. De facto, *Enterococcus* são também extremamente resistentes nas superfícies de contato com alimentos tais como bandejas de transporte, máquinas de fatiar, etc., e a presença frequente de fatores de virulência específicos (ex., adesinas) parece contribuir para esta habilidade (98). É assim de notar a capacidade de resistência e adesão por *Enterococcus* nos ambientes de processamento, quer em superfícies quer nos equipamentos, dificultando a sua eliminação durante os processos de limpeza e de desinfecção. O cumprimento das boas práticas de higiene e fabrico assume-se assim muito

importante no controlo da contaminação no ambiente de processamento, em particular da contaminação cruzada entre matérias-primas, superfícies, equipamentos, o próprio manuseador e alimentos prontos a consumir.

A resistência aos antibióticos pode ser transmitida aos humanos através da cadeia alimentar de duas formas: a) através do consumo de bactérias (patogénicas ou não) resistentes presentes nos alimentos que posteriormente colonizam animais e humanos; b) ou pela transferência de elementos genéticos móveis (ex., plasmídeos) contendo genes de resistência entre bactérias provenientes dos alimentos e das presentes na microbiota do trato gastrointestinal humano. A transferência de plasmídeos por conjugação já foi demonstrada em matrizes de alimentos entre diversas espécies bacterianas incluindo *Enterococcus*. Por exemplo a transferência de genes de resistência à vancomicina entre estirpes de *E. faecalis* durante a fermentação de queijos e salsichas, ou a transferência de resistência a antibióticos de *E. faecalis* para bactérias mais patogénicas (ex., *Staphylococcus aureus*) em leite fermentado (99). Há uma grande variabilidade nos perfis de resistência e de patogenicidade entre as espécies e estirpes de *Enterococcus* identificadas nos alimentos de origem animal, mas pela sua natureza podem facilmente atuar como dadores de genes de resistência a antibióticos a outros *Enterococcus* com maior potencial de patogenicidade ou a outros géneros bacterianos mais patogénicos.

Resumindo, como as matérias-primas utilizadas na produção de alimentos para animais de estimação têm a mesma origem (mesmos animais) que as destinadas à produção de géneros alimentícios humanos, infere-se facilmente que os alimentos para animais de estimação podem constituir veículos de transmissão de bactérias resistentes a antibióticos para os animais de estimação e para o ser humano. No entanto, e tal como referido anteriormente (secção 1.3.2), são ainda reduzidos os estudos que analisaram a suscetibilidade a antibióticos em bactérias presentes em alimentos para animais de estimação, nomeadamente em *Enterococcus* spp, uma bactéria com impacto relevante na saúde humana.

2. Objetivos

O aumento global do número de animais de estimação nos últimos anos tem-se traduzido no crescimento exponencial do setor industrial alimentar animal devido à grande demanda por alimentos de qualidade e de diversos tipos. A cadeia alimentar tem-se revelado uma via importante na transmissão de bactérias patogénicas e os alimentos para animais de estimação já foram associados a vários surtos e recolhidos de lotes devido à presença de bactérias patogénicas. Assim, estes alimentos começam a despertar o interesse das autoridades pelo seu papel como potenciais veículos de doenças de origem alimentar devido à transmissão de bactérias patogénicas. Em anos recentes, alguns estudos demonstram que estes alimentos também podem ser veículos de bactérias resistentes a antibióticos com potenciais implicações para saúde humana e animal. No entanto, os estudos realizados são ainda escassos e fundamentalmente associados a bactérias de Gram-negativo. Tendo em conta a falta de informação acerca da ocorrência de bactérias de Gram-positivo resistentes aos antibióticos com relevância para a Saúde Pública em alimentos para animais de estimação, um maior número de cães do que gatos em Portugal como animais de estimação e uma maior variedade de alimentos para cães no mercado nacional, os objetivos deste trabalho foram:

- ✓ Investigar a diversidade de tipos alimentares e as marcas mais representadas nos alimentos para cães comercializados em Portugal;
- ✓ Averiguar se os alimentos para cães adquiridos são reservatórios de *Enterococcus* spp. e a incidência de amostras com *Enterococcus* spp. resistentes a antibióticos;
- ✓ Caracterizar os isolados de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* resistentes aos antibióticos considerados críticos para o tratamento de infeções enterocócicas.

3. Materiais e métodos

3.1. Seleção e processamento das amostras

A seleção das amostras foi feita através de um levantamento das principais marcas e variedades comerciais dos tipos alimentares para cães disponíveis no mercado. Esta pesquisa foi feita nas principais superfícies comerciais (supermercados e hipermercados), clínicas veterinárias e lojas especializadas de produtos para animais de estimação da área metropolitana do Porto. Entre setembro de 2019 e janeiro de 2020 foram adquiridas 55 amostras de diferentes tipos alimentares para cães disponíveis em lojas de animais (n=2), supermercados e hipermercados (n=6) e clínicas veterinárias (n=1) localizadas em 4 cidades da região Norte [Matosinhos (n=23), Maia (n=22), Porto (n=7) e Póvoa de Varzim (n=3)]. As 55 amostras de 23 marcas (19 internacionais e 4 nacionais) correspondiam a 5 tipos de produtos alimentares disponíveis para cães: ração seca (n=8), húmida (n= 22), semi-húmida (n=4), crua (n=14) e snacks ou guloseimas (n=7) (Tabela 3). Todas as amostras foram adquiridas dentro do prazo de validade, transportadas para o laboratório na embalagem original e nas mesmas condições de armazenamento que as do local de compra (no caso das rações congeladas cruas foram transportadas para o laboratório sob condições de refrigeração por um curto período de tempo) e analisadas no mesmo dia de chegada ao laboratório. Para cada amostra foi registada a designação, o tipo alimentar, a marca, o local onde foi adquirida, data da compra, composição, prazo de validade e lote. A preparação e etapa de pré-enriquecimento das amostras foi realizada seguindo a metodologia descrita na Norma ISO 6887-4:2017 (100) em condições assépticas (Figura 6) da seguinte forma: foram pesadas 25 g numa balança digital com utensílios estéreis e, quando necessário (amostras secas mais duras, como por exemplo biscoitos), as amostras foram cortadas em pequenos pedaços para facilitar o processo de homogeneização. Posteriormente foram adicionados 225 mL (proporção de 1:10) de um meio de pré-enriquecimento, a *Buffer Peptone Water (Liofilchem)* (a composição e função dos meios de cultura usados neste trabalho estão incluídos no Anexo 7.1). As amostras foram deixadas a macerar entre 30 minutos a 1 hora (maior tempo para amostras secas/duras) à temperatura ambiente para recuperação de bactérias mais stressadas. Findo o tempo de maceração, as amostras foram homogeneizadas no aparelho de *Stomacher (Lab-Blender 400)* durante 2 a 3 minutos, procedeu-se à incubação das amostras com a *Buffer Peptone Water* homogeneizadas (passo denominado de pré-enriquecimento) durante 18h a 37°C. Finalizado o pré-enriquecimento, foi adicionado 1 mL de cada amostra a 9 mL de um caldo

de *Brain Heart Infusion* (BHI) (*Liofilchem*; Anexo 7.1) (passo denominado de enriquecimento) sem antibiótico, e com três antibióticos diferentes [ampicilina (16 µg/mL), vancomicina (6 µg/mL), e cloranfenicol (16 µg/mL; agente de seleção para bactérias resistentes ao cloranfenicol e a linezolida)] colocados a incubar num banho durante 18h, a uma temperatura (37°C) e rotação constantes.

O processamento de amostras teve como único objetivo a pesquisa de *Enterococcus* que são frequentemente usados como bioindicadores de resistência em programas de vigilância e epidemiologia (101), e de acordo com protocolos já inseridos no grupo de investigação responsável pela coordenação deste trabalho (89,102). No final do enriquecimento anterior, foram semeados 0,1 mL de cada amostra em placas de meio *Slanetz & Bartley Agar* com as concentrações dos mesmos antibióticos utilizados anteriormente e sem antibiótico. Após sementeira, as placas foram incubadas a 37°C durante 48h.

Para a pesquisa de *Enterococcus* nos meios de cultura foram usadas as seguintes estratégias: i) das placas de *Slanetz & Bartley Agar* sem antibiótico repicaram-se 2 colónias com morfologia típicas de *Enterococcus* spp. por cada amostra; ii) das placas com antibiótico repicaram-se um maior número colónias típicas (cerca de 6 a 20 colónias por cada placa dos diferentes antibióticos para cada amostra) com o intuito de aumentar a possibilidade de deteção da resistência bacteriana aos diferentes antibióticos testados e de ser possível selecionar diferentes fenótipos de resistência na mesma amostra. Após seleção das colónias representativas procedeu-se ao seu isolamento em placas com meio BHI Agar (*Liofilchem*; Anexo 7.1) que foram incubadas durante 24h, a 37°C. Após verificar que cada colónia estava pura, os isolados foram identificados com a designação "PFx" (PF= *pet food*) e armazenados em meio de *Tryptone Soya Broth* (*Oxoid*; Anexo 7.1) com 15% de glicerol, a -80°C.

3.2. Confirmação do género *Enterococcus* e identificação ao nível da espécie

A confirmação presuntiva do género *Enterococcus* foi realizada através de provas clássicas de identificação que incluíram a prova da catalase (catalase negativo) e o crescimento e hidrólise no meio bÍlis-esculina (teste positivo com aparecimento de cor negra) (103). Todas as colónias presuntivamente identificadas como *Enterococcus* foram

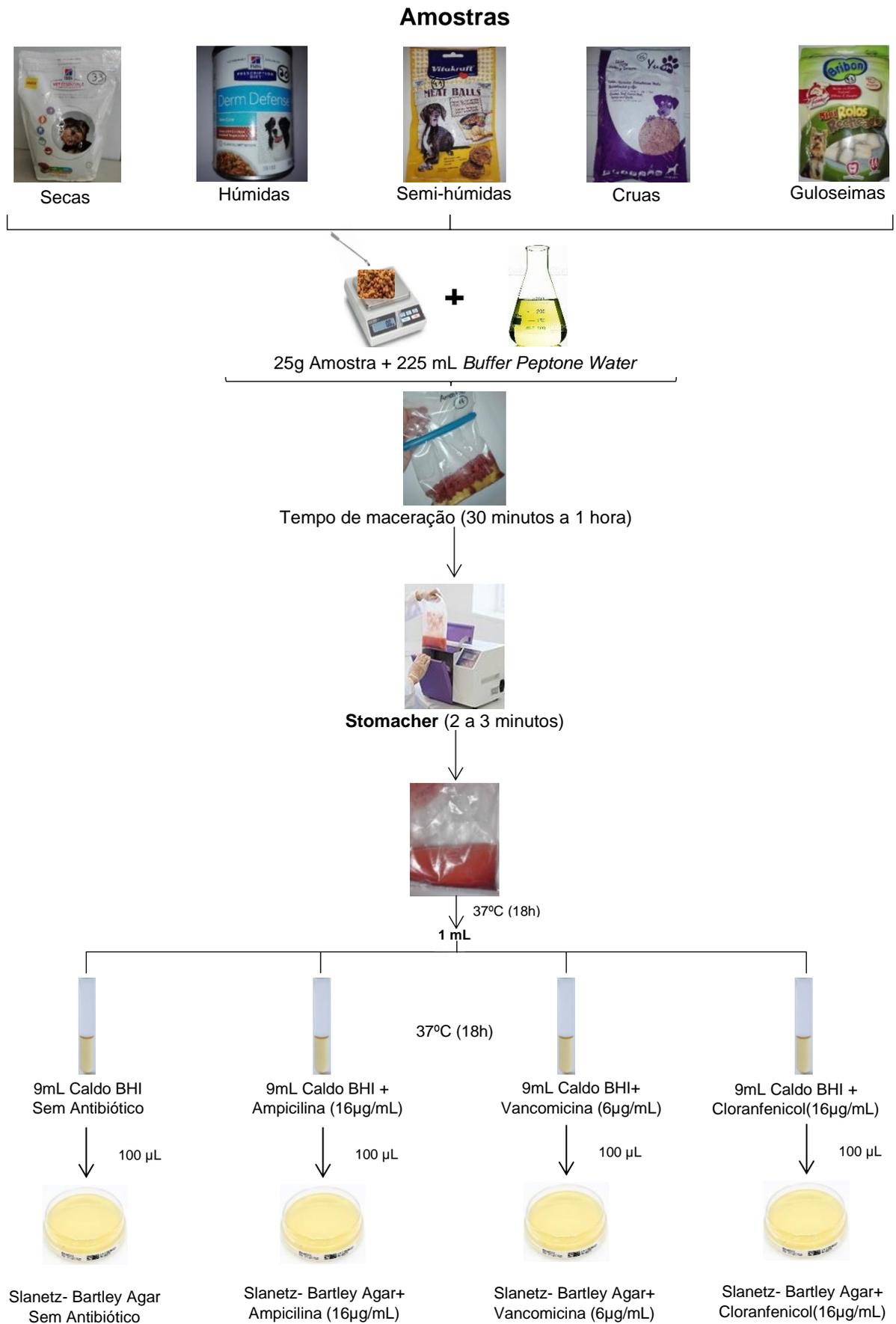


Figura 6. Representação esquemática do processamento das amostras de alimentos para cães.

selecionadas para subsequente identificação da espécie, caso contrário foram eliminadas. A identificação das espécies *E. faecium* e *E. faecalis* foi efetuada recorrendo à técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) através da amplificação dos genes específicos *ddl_{E.faecium}* (104) e *sodA* no caso de *E. faecalis* (105) (Tabela 2). Todos os isolados não *E. faecium* e não *E. faecalis* foram identificados por espectrometria de massa através da utilização da técnica *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) (106).

3.3. Estudo da suscetibilidade a antibióticos

Os isolados obtidos foram testados quanto à suscetibilidade a antibióticos pelos seguintes métodos standardizados segundo as normas do EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/): i) método de difusão em agar com discos; ii) tiras de E-test; e iii) microdiluição (107). O método de difusão em disco foi efetuado em todos os isolados obtidos para todos os antibióticos, enquanto o E-test e a microdiluição foram realizados aquando da observação ou suspeita de resistências à ampicilina e linezolida, respetivamente. Antes da realização destes testes de suscetibilidade, os isolados de *Enterococcus* foram semeados em BHI Agar e incubados a 37°C durante 18-24h de forma a garantir o seu isolamento em cultura pura. A estirpe de *E. faecalis* ATCC 29212 foi sempre usada como controlo do método (108).

3.3.1. Método de difusão em agar com discos

O método de difusão em agar com discos é um método qualitativo que permite avaliar a suscetibilidade das bactérias a um conjunto de antibióticos impregnados em discos com diferentes cargas preconizadas pelas normas Europeias (EUCAST) (108) ou Americanas (CLSI, *Clinical Laboratory Standards Institute*) (109). Após isolamento no meio BHI Agar, foram efetuadas suspensões das bactérias em 2 mL de soro fisiológico com uma densidade de 0.5 na escala de McFarland. Esta suspensão foi inoculada em tapete em placas de meio *Mueller Hinton II* agar (*BioMérieux*; Anexo 7.1) com exatamente 4 mm de altura onde se colocaram depois os discos de antibióticos de forma equidistante nas seguintes concentrações: ampicilina (2µg); ciprofloxacina (5 µg); cloranfenicol (30 µg); eritromicina

(15 µg); estreptomicina (300 µg); gentamicina (30 µg); linezolida (10 µg); nitrofurantoína (100 µg); quinupristina-dalfopristina (15 µg); teicoplanina (30 µg); tetraciclina (30 µg); tigeciclina (15 µg) e vancomicina (5 µg). A incubação das placas foi feita a 37°C durante 24h. A suscetibilidade aos antibióticos foi determinada a partir da leitura do diâmetro (em mm) da zona de inibição formada em torno do disco devido à difusão do antibiótico no agar. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles definidos pelas normas EUCAST (https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0/Breakpoint_Tables.pdf) permitindo classificar os isolados quanto à suscetibilidade em três categorias: i) **suscetível (S)** quando há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico através da utilização de uma dosagem padrão do antibiótico em questão; ii) **suscetível de exposição aumentada (I da antiga classificação de intermédio)** quando há uma grande probabilidade de sucesso terapêutico porque há uma maior exposição ao antibiótico ajustando o regime de dosagem ou a sua concentração no local de infecção; e iii) **resistente (R)** quando existe uma elevada probabilidade de falha terapêutica mesmo quando é utilizada uma dosagem muito maior que as estabelecidas de acordo com as normas do EUCAST. No caso dos antibióticos para os quais não existem pontos de corte para *Enterococcus* spp. definidos pelo EUCAST, (cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina) os isolados foram classificados segundo os critérios do CSLI em: **suscetível (S)** quando há uma grande probabilidade de eficácia clínica usando a dose habitualmente recomendada para tratar o local da infecção; **Intermédio (I)** quando a resposta pode ser menor para isolados suscetíveis implicando que pode haver eficácia terapêutica em órgãos em que o antibiótico atinge concentrações mais elevadas; esta categoria também inclui uma zona tampão inerente à variabilidade entre métodos diferentes de forma a prevenir que fatores técnicos difíceis de controlar causam discrepâncias significativas na interpretação; **resistente (R)** quando há um crescimento bacteriano notório na presença de concentrações de antibiótico usualmente indicadas ou quando os valores de CMI ou diâmetros caem em intervalos em que mecanismos de resistência específicos são muito prováveis (110).

Todos os resultados obtidos como susceptíveis com exposição aumentada (EUCAST) ou intermédios (CLSI) foram considerados como suscetíveis e não incluídos nas contagens das taxas de resistência. Os isolados que apresentaram um fenótipo de resistência a 3 ou mais antibióticos de famílias diferentes foram considerados multirresistentes (111).

3.3.2.Método de difusão em agar com tiras (E-test)

O E-test, Epsilometer teste ou método de difusão em agar com tiras, é um método quantitativo em que é determinada a Concentração Mínima Inibitória (CMI) de um antibiótico através da difusão em agar de uma tira de gradiente de concentrações desse mesmo antibiótico. Este método foi realizado da mesma forma que o anterior, usando o meio de *Mueller-Hinton II* agar, suspensão bacteriana acertada a 0.5 McFarland e incubação a 37°C durante 18h. Após o período de incubação a placa é analisada esperando-se um halo de inibição na forma de elipse. O valor de CMI é lido na interseção da elipse com a tira de antibiótico. Os isolados foram classificados na categoria **suscetível, regime de dosagem padrão (S)**; **suscetível de exposição aumentada (I)** ou **resistente (R)**, de acordo com o proposto pelo EUCAST (2020) (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/). Este método foi efetuado para determinação da CMI em isolados *E. faecium* resistentes ou perto do *borderline* da resistência à ampicilina pelo método de difusão em disco e representativos das diferentes amostras.

3.3.3.Microdiluição

A microdiluição é um método quantitativo que permite determinar o valor da CMI através da inoculação da bactéria num meio líquido que contém antibiótico em diferentes concentrações (107). Este método é efetuado em microplacas de 96 poços em que são distribuídas quantidades padronizadas de caldo de *Mueller Hinton II* (*BioMérieux*), de solução de antibiótico e das diferentes suspensões bacterianas (ajustadas a 0.5 McFarland) a serem testadas. As placas foram incubadas a 37°C durante 18h. Após a incubação, foi efetuado o registo dos resultados e o poço que apresentava ausência de crescimento correspondia à menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento bacteriano, ou seja, correspondia ao valor de CMI. Os isolados foram classificados na categoria **suscetível, regime de dosagem padrão (S) quando MIC (≤ 4 mg/L)** ou **resistente (R) quando MIC (> 4 mg/L)**, de acordo com o proposto pelo EUCAST (2020) (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/). Este método foi efetuado para confirmação de casos de suspeita de resistência à linezolida pelo método de difusão em disco em isolados de *E. faecium* e *E. faecalis*.

3.4. Detecção de genes de resistência e virulência

Todos os isolados resistentes ao cloranfenicol pelo método de difusão em disco foram testados, através da técnica de PCR, para a presença dos genes mais comuns que conferem resistência adquirida ao grupo das oxazolidinonas (*optrA* e *poxtA*), bem como todos os isolados resistentes à vancomicina ou provenientes das placas com vancomicina foram testados, através da técnica de PCR, para a presença do gene *vanA*. Por outro lado, todos os isolados de *E. faecium* foram testados relativamente à presença de um gene (*ptsD*) que parece funcionar como um marcador presuntivo de *E. faecium* resistentes a altos níveis de ampicilina e com características de virulência importantes nomeadamente com uma maior colonização e patogenicidade (11). As reações de PCR foram realizadas no termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, EUA) sempre com a inclusão dos respetivos controlos positivos e um branco (tubos sem DNA). A constituição da *mix* que foi utilizada para as reações de PCR foi a seguinte: 12,5 µL de NZYTaQ II 2x Green Master Mix (Nzytech, Portugal), 10 µL de água ultrapura e 0,25 µL (a 100 µM) de cada *primer*, à qual se adicionaram 2 µL da suspensão bacteriana pré-preparada em 50 µL de água ultrapura, perfazendo um total de 25 µL. As condições de amplificação utilizadas para a identificação das espécies, genes de resistência e marcador de virulência encontram-se descritos na Tabela 2.

Finalizado os PCRs, as leituras dos seus produtos foram realizadas através do método de separação em gel de agarose a 2% contendo *SYBR Safe* (Nzytech, Portugal) como intercalante de DNA. O gel e a eletroforese foram efetuados em tampão TAE 1x (Tris-base 40 mM, EDTA 1mM, ácido acético glacial, pH 8.0) e a corrida durante 30 minutos a 100 V. Foi utilizado um marcador de peso molecular (DNA NZYDNA Ladder, Nzytech, Portugal) para a determinação do tamanho das bandas e a aquisição de imagem do gel foi feita no equipamento ChemiDoc XRS+ system (Bio-Rad).

3.5. Estudo da clonalidade por MLST

Com o intuito de relacionar filogeneticamente as estirpes pertencentes à mesma espécie obtidas de amostras diferentes e/ou de comparar as estirpes deste trabalho com outras identificadas em estudos prévios, foi utilizado o *Multilocus Sequence Typing* (MLST) como método de tipagem de *E. faecium* e *E. faecalis* selecionados (112,113). Este método consiste na amplificação de 7 genes conservados (*housekeeping*) ao nível da espécie em

que as sequências destes alelos traduzem a evolução genética temporal de diferentes estirpes. A estas sequências são atribuídos diferentes números e o conjunto dos 7 números é traduzido num código final que corresponde ao chamado ST (*sequence type*), permitindo assim comparar facilmente isolados incluídos em estudos de diferentes laboratórios.

A base de dados de MLST para *E. faecium* e *E. faecalis* (<https://pubmlst.org/>) propõe a análise de fragmentos de 7 genes *housekeeping*. No caso de *E. faecium* os genes a amplificar são: *adk* (adenosina cinase), *atpA* (subunidade α da ATP sintetase), *ddl* (D-alanina-D-alanina ligase), *gyd* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *gdh* (glucose-6-fostato desidrogenase), *pstS* (transportador do fosfato) e *purK* (subunidade de fosforibosilaminoimidazol carboxilase ATPase); e no caso de *E. faecalis* são: *gdh* (glucose-6-fostato desidrogenase), *gyd* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *pstS* (transportador do fosfato), *gki* (glicoquinase putativa), *aroE* (chiquimato 5-desidrogenase), *xpt* (xantina fosforibosiltransferase) e *yiqL* (acetilcoenzima A acetiltransferase). Os fragmentos dos genes *housekeeping* foram amplificados por PCR, usando os *primers* e as condições previamente descritas para *E. faecium* (112) e *E. faecalis* (113) (Tabela 2). Seguidamente foi feita uma eletroforese como descrita nas secções anteriores e os produtos foram purificados pelo kit de purificação de DNA NZYGelpure kit (NZYTech, Portugal) e enviados para sequenciação na empresa GATC (<https://www.eurofinsgenomics.eu>). Foi feita a análise dos cromatogramas com a ajuda do software Chromas. De modo a determinar o número de alterações nucleotídicas de cada alelo e a sequência tipo (pela combinação das variantes dos alelos) as sequências foram analisadas na base de dados de MLST obtendo-se o ST de cada estirpe.

Tabela 2. Condições de amplificação para as diferentes reações de PCR.

Objetivo	Espécie/ gene pesquisado	Primers Sequência (5´- 3´)	Condições de amplificação	Referências
Identificação da espécie	<i>sodA</i> (<i>E. faecalis</i>)	Fw: ATCAAGTACAGTTAGTCT Rv: ACGATTCAAAGCTAACTG	1 ciclo por 15min a 95°C; seguido de 30 ciclos por 30s a 94°C, 30s a 52°C, 30s a 72°C; por último 1 ciclo por 10min a 72°C	(114)
	<i>ddl</i> (<i>E. faecium</i>)	Fw: TAGAGACATTGAATATGCC Rv: TCGAATGTGCTACAATC	1 ciclo por 15min a 95°C; seguido de 30 ciclos por 30s a 94°C, 30s a 50°C, 30s a 72°C; por último 1 ciclo por 10min a 72°C	(104)
Genes de resistência a antibióticos	<i>optrA</i>	Fw: AGGTGGTCAGCGAACTAA Rv: ATCA ACTGTTCCCATTC	1 ciclo por 15min a 95°C; seguido de 34 ciclos por 30s a 94°C, 1 min a 47°C, 1 min e 30s a 72°C; por último 1 ciclo por 10min a 72°C	(115)
	<i>poxTA</i>	Fw: TCCACAAAGGATGGGTTATG Rv: ATGCCCGTATTGGTTATCTC	1 ciclo por 15min a 95°C; seguido de 34 ciclos por: 30s a 94°C, 30s a 54°C, 30s a 72°C; por último 1 ciclo por 10min a 72°C	(116)
	<i>vanA</i>	Fw: GGGAAAACGACAATTGC Rv: GTACAATGCGGCCGTTA	1 ciclo por 10min a 95°C; seguido de 35 ciclos por:30s a 94°C, 30s a 52°C, 30s a 72°C; por último 1 ciclo por 10min a 72°C	(104)
Genes de virulência	<i>ptsD</i>	Fw: TATCAACGCGATCAAAAACGA Rv: CGTTCGCATACAGCTTTTCA	1 ciclo por 15min a 95°C; seguido de 25 ciclos por 30s a 94°C, 30s a 56°C, 30s a 72°C; por último 1 ciclo por 10min a 72°C	(83)
MLST	<i>adk</i> (<i>E. faecium</i>)	Fw:TATGAACCTCATTTTAATGG Rv: GTTGACTGCCAAACGATTTT		(112)

<i>atpA</i> (<i>E. faecium</i>)	Fw: CGGTTTCATACGGAATGGCACA Rv: AAGTTCACGATAAGCCACGG	
<i>ddl</i> (<i>E. faecium</i>)	Fw: GAGACATTGAATATGCCTTATG Rv: AAAAAGAAATCGCACCG	
<i>gyd</i> (<i>E. faecium</i>)	Fw: CAAACTGCTTAGCTCCAAGGC Rv: CATTTCGTTGTCATACCAAGC	1 ciclo por 3 min 94°C; seguido de 35 ciclos por: 30s a 94°C, 30s a 50°C, 30s a 72°C; por último 1 ciclo por 5 min a 72°C
<i>gdh</i> (<i>E. faecium</i>)	Fw: GGCGCACTAAAAGATATGGT Rv: CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
<i>pstS</i> (<i>E. faecium</i>)	Fw: TTGAGCCAAGTCGAAGCTGGAG Rv: CGTGATCACGTTCTACTTCC	
<i>purK</i> (<i>E. faecium</i>)	Fw: GCAGATTGGCACATTGAAAGT Rv: TACATAAATCCCCCTGTTTTY	
<i>gdh</i> (<i>E. faecalis</i>)	Fw: GGCGCACTAAAAGATATGGT Rv: CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
<i>gyd</i> (<i>E. faecalis</i>)	Fw: CAAACTGCTTAGCTCCAATGGC Rv: CATTTCGTTGTCATACCAAGC	
<i>ptsS</i> (<i>E. faecalis</i>)	Fw: CGGAACAGGACTTTTCGC Rv: ATTTACATCACGTTCTACTTGC	1 ciclo por 5 min 94°C; seguido de 30 ciclos por: 30s a 94°C, 30s a 52°C, 1 min a 72°C; por último 1 ciclo por 7 min a 72°C
<i>gki</i> (<i>E. faecalis</i>)	Fw: GATTTTGTGGGAATTGGTATGG Rv: ACCATTAAAGCAAAATG ATCGC	
<i>aroE</i> (<i>E. faecalis</i>)	Fw: TGGAAAACCTTTACGGAGACAGC Rv: GTCCTG TCCATTGTTCAAAAAGC	
<i>xpt</i> (<i>E. faecalis</i>)	Fw: AAAATGATGGCCGTGTATTAGG Rv: AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	
<i>yqiL</i> (<i>E. faecalis</i>)	Fw: CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG Rv: GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	

(113)

4. Resultados e Discussão

4.1. Diversidade Bacteriana por tipo de amostra

As amostras de alimentos para cães analisadas (n=55) foram classificadas em alimentos secos, húmidos, semi-húmidos, crus e guloseimas ou snacks (Tabela 3). Apesar de grande parte dos alimentos designados por guloseimas ou snacks serem considerados um alimento seco, devido ao seu aspeto e teor de humidade, foram categorizados separadamente tal como comumente observado noutros estudos que incluem este tipo de amostras.

Detetaram-se *Enterococcus* em 54% das amostras (30/55) que incluíam 27% das amostras húmidas (6/22); 88% das amostras secas (7/8); 43% das amostras de guloseimas ou snacks (3/7) e 100% das amostras cruas congeladas analisadas (14/14). Não foi detetada a presença de nenhuma espécie de *Enterococcus* nas amostras semi-húmidas, mas este tipo de amostras foi também a menos representada (4/55). Dentro dos isolados de *Enterococcus* obtidos (n=184), 44% eram *E. faecalis* (n=82), 43% *E. faecium*, 5% *E. gallinarum* e *E. hirae* (n=9 cada), 1% *E. casseliflavus* (n=2), e 1% *E. avium* e *E. durans* (n=1 cada). Tal como frequentemente descrito em diversos tipos alimentares (117), *E. faecium* e *E. faecalis* foram as espécies mais comuns nas rações analisadas. Segundo a análise da distribuição das espécies pelos diferentes tipos de alimentos analisados verificou-se que *E. faecalis* (60%) foi a espécie mais encontrada nas amostras húmidas, enquanto *E. faecium* foi a mais comum no caso das amostras secas e guloseimas (91% dos isolados nas amostras secas; 60% nas amostras de guloseimas) (Figura 7). *E. faecium* foi a única espécie identificada em todo o tipo de amostras. As amostras cruas foram aquelas em que mais espécies de *Enterococcus* foram isoladas (7 espécies), sendo a espécie mais prevalente *E. faecalis* (53%) (Figura 7).

De acordo com a literatura atual, apenas um estudo anteriormente referido analisou a presença de *Enterococcus* em rações comercializadas (não enlatadas e guloseimas) obtidas nos E.U.A. (2006-2010) ainda que não tenham sido fornecidos detalhes sobre as mesmas (59). Ge *et al.* detetaram *Enterococcus* em 32% das amostras (supostamente todas secas) e, de forma semelhante ao nosso estudo, a maioria dos isolados correspondia a *E. faecium* (95%). As restantes espécies foram identificadas como *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. faecalis*, *E. durans* e *E. mundtii* ($\leq 1\%$ cada).

Enterococcus spp. foram assim obtidos dos diferentes tipos de amostras analisadas incluindo amostras sujeitas a temperaturas elevadas. *Enterococcus* são consideradas das

Tabela 3. Constituição e distribuição das amostras analisadas consoante o tipo de alimento (húmida, seca, semi-húmida, guloseima e crua).

Tipo de Alimento	Amostra	Marca^a	Composição	Cidade (loja)	Data de aquisição	<i>Enterococcus</i>
Húmida (n=22)	1	C	Codorniz (>90%); ervilha	Matosinhos (loja de animais 1)	Setembro 2019	-
	2	D	Carne e subprodutos animais/ vegetais (4% vitela, 4% fígado)	Matosinhos (hipermercado 1)	Setembro 2019	-
	3	E	Carne e subprodutos animais (4% coelho); cereais	Matosinhos (hipermercado 2)	Setembro 2019	-
	4	F	Carne e subprodutos animais (4% frango); cereais; peixe; cenoura	Matosinhos (hipermercado 3)	Setembro 2019	-
	5	F	Carne e subprodutos animais (4% frango); peixe; vegetais	Póvoa de Varzim (hipermercado)	Outubro 2019	-
	6	G	Frango (60%); plasma; arroz; vegetais	Maia (hipermercado 1)	Setembro 2019	-
	7	H	Carne e derivados (4% bovino); cereais; vegetais; fruta	Póvoa de Varzim (hipermercado)	Outubro 2019	-
	8	I	Carne e subprodutos animais (4% frango, 4% peru, 4% cordeiro)	Póvoa de Varzim (hipermercado)	Outubro 2019	-
	9	J	Paté com carne e subprodutos animais (4% aves, 4% fígado)	Maia (hipermercado 1)	Outubro 2019	+
	10	J	Carne e subprodutos animais (4% frango); cereais; vegetais	Maia (hipermercado 1)	Outubro 2019	-
	11	K	Estufado com frango (8%) e vegetais (2%)	Maia (clínica veterinária 1)	Outubro 2019	+
	12	B	Bovino (>40%); caldo de carne; tripas; vegetais; arroz	Maia (loja de animais 1)	Outubro 2019	+
	13	B	Frango (>60%); caldo de carne; tripas; vegetais; arroz	Maia (loja de animais 1)	Outubro 2019	-
	14	I	Carne e subprodutos animais (4% frango); cereais; vegetais	Maia (hipermercado 2)	Novembro 2019	+
	15	M	Carne e derivados (4% frango, 4% cordeiro); cereais; vegetais	Maia (hipermercado 2)	Novembro 2019	-
	16	N	Carne e derivados (4% frango); cereais; vegetais	Maia (hipermercado 2)	Novembro 2019	-
	17	N	Carne e derivados (4% vaca); cereais; vegetais	Maia (hipermercado 2)	Novembro 2019	+
	18	O	Carne e derivados (4% vaca); peixe; subprodutos vegetais	Porto (hipermercado 1)	Novembro 2019	-
	19	P	Frango (60%); vegetais	Maia (hipermercado 3)	Novembro 2019	-
	20	P	Carne e derivados (55%); peixe e derivados (5% salmão)	Maia (hipermercado 3)	Novembro 2019	-
	21	Q	Carne e subprodutos animais (4% peru); cereais	Matosinhos (loja de animais 1)	Novembro 2019	-
	22	Q	Peixe (truta 20%, salmão 14%, sardinha 10%); vegetais	Matosinhos (loja de animais 1)	Janeiro 2020	+
Seca (n=8)	23	R	Proteínas desidratadas de aves/porco; carne e gordura de frango	Matosinhos (hipermercado 3)	Outubro 2019	+

	24	S	Arroz e proteína de arroz; óleo de peixe; proteína de salmão hidrolisada; vitaminas	Maia (clínica veterinária 1)	Outubro 2019	+
	25	T	Frango desidratado (27%); cereais; óleos; ervas aromáticas secas	Maia (clínica veterinária 1)	Outubro 2019	+
	26	F	Frango (20%); proteínas desidratadas de aves; arroz; óleo de peixe; farinha de milho	Maia (clínica veterinária 1)	Outubro 2019	-
	27	U	Salmão (21%); farinha de peixe; batatas; óleos	Maia (clínica veterinária 1)	Outubro 2019	+
	28	V	Proteína desidratada de porco e aves; arroz; casca de feijão; ervilhas	Maia (clínica veterinária 1)	Outubro 2019	+
	29	K	Proteína desidratada de aves; milho; farinha de milho; gordura animal; óleo de peixe	Maia (clínica veterinária 1)	Outubro 2019	+
	30	W	Carne e subprodutos animais; cereais; óleos/gorduras; Peixe e subprodutos	Porto (hipermercado 1)	Novembro 2019	+
Semi-húmida (n=4)	31	X	Carne de porco/bovino; coração de porco; cereais	Matosinhos (hipermercado 3)	Novembro 2019	-
	32	Y	Carne e subprodutos animais (60% frango); cereais; vegetais	Matosinhos (hipermercado 1)	Dezembro 2019	-
	33	Y	Carne e subprodutos animais (85% frango); vegetais	Matosinhos (hipermercado 1)	Dezembro 2019	-
	34	Y	Carne e subprodutos animais (85% frango); vegetais	Matosinhos (hipermercado 1)	Dezembro 2019	-
Guloseima (n=7)	35	R	Cereais; óleos/gorduras; carne e subprodutos animais	Matosinhos (hipermercado 3)	Outubro 2019	+
	36	F	Cereais; óleos/gorduras; carne e subprodutos animais	Matosinhos (hipermercado 3)	Outubro 2019	+
	37	I	Carne e subprodutos animais (4% frango, 4% vaca); cereais; peixe	Maia (hipermercado 2)	Novembro 2019	+
	38	M	Carne e subprodutos animais (4% frango, 4% vaca, 4% cordeiro)	Porto (hipermercado 1)	Novembro 2019	-
	39	F	carne e subprodutos animais; cereais; óleos/gorduras; laticínio	Porto (hipermercado 1)	Novembro 2019	-
	40	Z	Cereais; subprodutos vegetais; carne e subprodutos animais; laticínio	Maia (hipermercado 3)	Novembro 2019	-
	41	L	Cereais; carne e subprodutos animais; farinha de carne; óleos/gorduras	Maia (hipermercado 3)	Novembro 2019	-
Crua (n=14)	42-44	A	Salmão (20%); novilho (59%); vegetais; óleo de salmão	Matosinhos (loja de animais 1)	Setembro 2019- Janeiro 2020	+
	45	A	Frango (60%); cordeiro (19%); vegetais	Matosinhos (loja de animais 1)	Outubro 2019	+

46, 47	A	Frango (60%); vitela (19%); vegetais	Matosinhos (loja de animais 1)	Outubro. 2019 – Janeiro 2020	+
48, 49	A	Peru (60%); cordeiro (20%); vegetais	Matosinhos (loja de animais 1)	Outubro. 2019 - Janeiro2020	+
50, 51	A	Novilho (79%); vegetais; óleo de salmão	Matosinhos (loja de animais 1)	Outubro 2019 - Novembro 2019	+
52	B	Pato (80%); vegetais; fruta	Matosinhos (loja de animais 2)	Novembro 2019	+
53	B	Veado (80%); vegetais; fruta	Matosinhos (loja de animais 2)	Novembro 2019	+
54	B	Peru (50%); ganso (30%); vegetais; fruta	Matosinhos (loja de animais 2)	Janeiro 2020	+
55	B	Peru (40%); salmão (20%); peixe branco (20%); vegetais	Matosinhos (loja de animais 2)	Janeiro 2020	+

^aAs marcas indicadas a negrito aparecem nos diferentes tipos de alimentos para cães analisados.

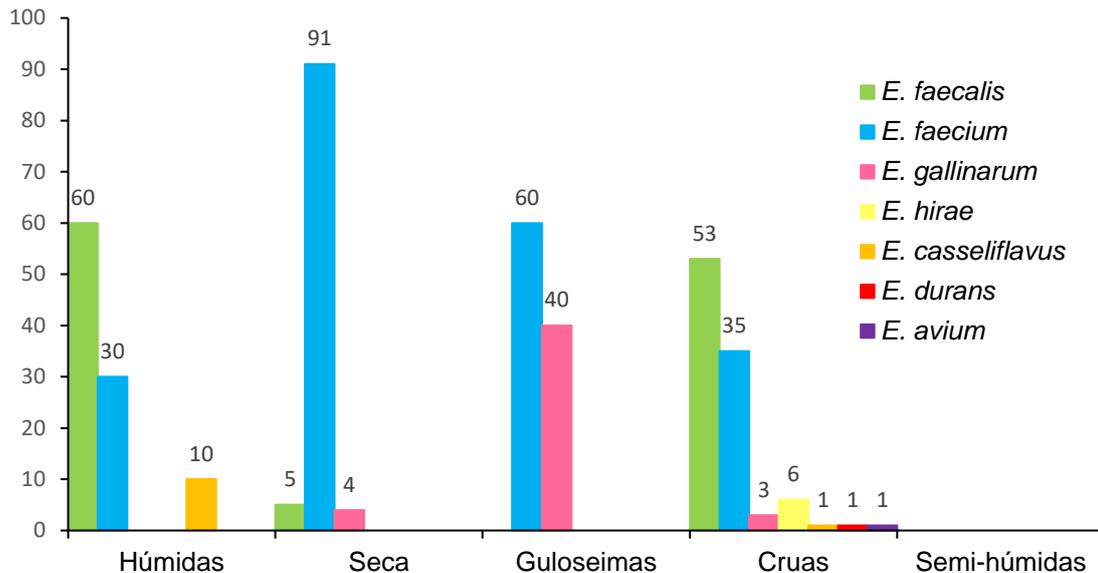


Figura 7. Distribuição das diferentes espécies de *Enterococcus* (n=184 isolados) pelos diferentes tipos de alimentos para cães (em %).

bactérias mais termotolerantes dentro das bactérias mesófilas não esporuladas devido à sua capacidade de sobreviver a temperatura elevadas (117). A sua capacidade de resistir a processos de pasteurização e a elevada capacidade de adaptação de crescimento em diferentes condições, incluindo o baixo teor de humidade ou atividade em água, adaptabilidade em diferentes substratos e intervalos de pH variáveis, e à capacidade de sobreviver a níveis elevados de salinidade, explica a presença de *Enterococcus* spp. nos produtos alimentares para animais de estimação produzidos a partir de matérias-primas contaminadas, mesmo naqueles que são tratados caso as temperaturas utilizadas não forem muito elevadas (117). Genes específicos são fortemente induzidos por altas temperaturas nas espécies de *E. faecium* e *E. faecalis* (118), contudo *E. faecium* parece ser a espécie mais resistente ao calor ao contrário do que acontece com *E. faecalis* de acordo com os estudos disponíveis (119,120). Embora a termotolerância possa variar entre estirpes, os dados destes estudos podem ajudar a compreender a maior predominância de *E. faecium* em amostras secas e guloseimas, visto que este tipo alimentar é fabricado através do método de extrusão, em que os ingredientes utilizados são aquecidos a altas temperaturas (80-200°C; normalmente 110-150°C) por curtos intervalos de tempo (10-270 segundos) de maneira a obter o alimento na sua forma final (121). Para além disto, também existe a possibilidade da temperatura de extrusão não terem sido atingidas, logo não ocorreu eliminação total dos *Enterococcus*, como também a constituição dos alimentos ser contribuir para o favorecimento da termotolerância, além destes fatores não se deve descartar a eventual ocorrência de contaminações pós-fabrico através da contaminação

cruzada com operadores e/ou equipamentos e superfícies de contato dos alimentos. A contaminação dos alimentos secos, por exemplo, pode também ocorrer após o tratamento térmico durante a cadeia de produção, visto que são adicionadas substâncias após a extrusão (por exemplo intensificadores de sabor e gordura resultante da hidrólise de tecido animal), sem que haja uma etapa que garanta a eliminação de eventuais patogênicos (e portanto outras bactérias) que possam estar presentes (122,123). De forma contrária, como os alimentos húmidos são hermeticamente selados em latas ou bolsas e sujeitos a um processamento térmico que permite a esterilização comercial a altas temperaturas, neste tipo de alimentos não é tão expectável a presença de bactérias. Até à data não há nenhum estudo que associe os alimentos húmidos a surtos ou à presença de bactérias patogênicas. De acordo com o melhor conhecimento da literatura atual, este trabalho corresponde ao primeiro estudo em que foi possível o isolamento de *Enterococcus* em amostras húmidas para cães. A deteção de *Enterococcus* foi verificada em 27% dos alimentos húmidos analisados, adquiridos em diferentes locais comerciais (supermercados, lojas de animais e clínicas veterinárias). A sua presença neste tipo de alimentos ou nos restantes pode indicar a falta de condições de higiene e a possibilidade das temperaturas elevadas que normalmente são utilizadas nos alimentos sujeitos a tratamento térmico não estarem a ser atingidas durante a confeção dos alimentos para cães. De salientar que a pesquisa de *Salmonella* e contagem de *Enterobacteriaceae* não é necessária no caso dos alimentos húmidos, ao contrário do que acontece com os restantes tipos alimentares (124).

Desta forma, apesar de no caso dos alimentos para animais de estimação, por norma, serem sujeitos a processamentos envolvendo altas temperaturas e outras condições específicas para a inibição do crescimento microbiano, no caso dos *Enterococcus* spp. este parâmetro no ciclo de fabrico pode não ser o suficiente (73). A diversidade de *Enterococcus* nos alimentos pode ter origem nos vários tipos de matérias-primas normalmente utilizadas, pois nas matérias-primas de origem animal, essencialmente nos alimentos crus, é comum a presença de uma elevada diversidade bacteriana. No caso de alimentos constituídos por produtos derivados de peixes e aves, estudos demonstram que é expectável uma maior probabilidade de serem detetados *E. faecium* (68). Tendo em conta as amostras analisadas e a sua constituição, não foi possível averiguar este tipo de diferenças, até porque muitas amostras eram constituídas por uma mistura de ingredientes de diferentes fontes.

4.2. Estudo da suscetibilidade a antibióticos

Das 30 amostras positivas para a presença de *Enterococcus*, verificou-se que 47% das amostras (26/55-47%; 14 cruas, 6 secas, 3 húmidas, 3 guloseimas) continham isolados resistentes a pelo menos um antibiótico e 31% (17/55-31%; 14 cruas, 2 húmidas, 1 guloseima) continham isolados multirresistentes (resistentes a 3 ou mais antibióticos de diferentes famílias). As 30 amostras continham então *Enterococcus* resistentes a diferentes antibióticos incluindo: eritromicina (73%), tetraciclina (63%), quinupristina-dalfopristina (60%, testado unicamente para *E. faecium*), estreptomicina (53%), cloranfenicol (50%), ampicilina e ciprofloxacina (47% cada), gentamicina (40%), linezolida (23%), vancomicina e teicoplanina (2% para cada). Dentro das resistências, destacam-se a gentamicina, ampicilina, vancomicina, ciprofloxacina e linezolida devido à sua relevância clínica no tratamento de infecções enterocócicas. Por outro lado, verificou-se que apenas 7% das 30 amostras testadas foram portadores de isolados suscetíveis a todas as classes de antibióticos. Estes incluíram isolados de diferentes espécies e de amostras húmidas [*E. faecalis* (n=2) e *E. casseliflavus* (n=1)] e secas [*E. faecalis* (n=1)]. Dos resultados obtidos também se verificou a ausência de isolados resistentes à tigeciclina e nitrofurantoína (apenas testado em isolados *E. faecalis*).

Dos 184 *Enterococcus* obtidos das amostras estudadas, foram selecionados e estudados quanto à suscetibilidade a antibióticos 138 isolados representativos das diferentes espécies [*E. faecium* (n=62); *E. faecalis* (n=57); *E. gallinarum* (n=8); *E. hirae* (n=7); *E. casseliflavus* (n=2); *E. avium* (n=1); *E. durans* (n=1)] e dos diversos tipos de alimentos para cães. A Tabela 4 mostra os perfis de resistência dos 138 isolados de acordo com o meio em que foram obtidos (com ou sem antibiótico). Tendo em conta o meio de origem dos isolados, verificou-se que os isolados resistentes à ampicilina, ciprofloxacina ou quinupristina-dalfopristina foram maioritariamente (88%/ 67%/ 69%) recuperados de meio suplementado com ampicilina. Já os isolados resistentes à linezolida e/ou ao cloranfenicol foram maioritariamente recuperados de meios suplementados com cloranfenicol (80% cada) e em alguns casos também com ampicilina (20%/ 16%). Destaca-se, em particular, isolados resistentes ou portadores de genes de resistência à linezolida (mesmo sensíveis ao antibiótico) detetados essencialmente em placas de *Slanetz-Bartley* suplementadas com cloranfenicol, pois este último antibiótico tem capacidade em co-selecionar isolados com resistência adquirida à linezolida codificada, como por exemplo, pelo gene *optrA* (63). Também a maioria dos isolados multirresistentes foram recuperados de *Slanetz-Bartley* suplementado com antibióticos (85% vs 15%) em *Slanetz-Bartley* sem

suplemento). Desta forma, os dados apresentados suportam a necessidade do uso de antibióticos como agente de seleção nos meios de cultura (pré-enriquecimento e placas de seleção) para recuperar mais facilmente bactérias multirresistentes ou com resistências de interesse clínico.

Os isolados multirresistentes obtidos (70% de *E. faecalis*, 48% de *E. faecium*, 25% de *E. gallinarum* e 100% de *E. durans*) provêm de amostras húmidas, cruas e de guloseimas. O fenótipo de multirresistência mais comum em isolados de *E. faecalis* foi eritromicina, tetraciclina, estreptomicina e cloranfenicol (53%) em amostras cruas e húmidas. No caso de *E. faecium*, observou-se uma maior variedade de fenótipos de multirresistência, destacando-se principalmente 19% dos isolados com resistência à eritromicina, ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina, aminoglicosídeos (gentamicina ou estreptomicina) e quinupristina-dalfopristina, apenas em amostras cruas. Apesar do número de isolados resistentes provenientes de amostras húmidas ser baixo, apenas neste tipo de amostras se verificou a presença de isolados resistentes à vancomicina (n=3). Estes 3 isolados de *E. faecium* partilhavam um perfil de resistência a antibióticos semelhante que incluiu a vancomicina, teicoplanina, ampicilina, ciprofloxacina e eritromicina, sendo apenas a resistência à gentamicina variável. Os restantes isolados obtidos de amostras húmidas foram identificados como *E. faecalis* e também eram multirresistentes (eritromicina, cloranfenicol e/ou tetraciclina; Figura 8). Nas amostras secas foram detetados isolados de *E. faecium* e *E. gallinarum* que apresentaram resistência à eritromicina, tetraciclina, estreptomicina e quinupristina-dalfopristina. Desta forma foi possível comprovar que as amostras cruas foram o tipo alimentar com maior diversidade quanto à espécie e também quanto aos perfis de resistência aos antibióticos. Já os isolados resistentes à linezolidina foram obtidos unicamente de amostras cruas. Os isolados resistentes à eritromicina e/ou à tetraciclina foram detetados em todos os tipos de amostras analisadas.

Os estudos realizados e publicados até à data que incluam a análise da suscetibilidade a antibióticos em isolados bacterianos obtidos de alimentos para animais de estimação são ainda muito escassos e focados essencialmente em *Salmonella* e *Enterobacteriaceae*. A presença em alimentos para animais de estimação de *Salmonella* multirresistentes já foi reportada em diversos estudos, essencialmente em alimentos crus e guloseimas, e é ainda de salientar que alimentos do tipo guloseimas já foram associados ao desenvolvimento de infeções em humanos causadas por estirpes de *Salmonella* resistentes a antibióticos clinicamente importantes (56,57). Elevadas taxas de contaminação por *Enterobacteriaceae* multirresistentes (74%), particularmente de *E. coli*, já foram reportadas em alimentos crus para animais de estimação sendo a maioria dos isolados resistentes a cefalosporinas de terceira geração devido à produção de beta lactamases de espectro alargado (ESBLs) e

alguns resistentes à colistina, um antibiótico de última linha no tratamento de infecções em humanos causadas por *Enterobacteriaceae* (55). Desta forma é possível fazer um paralelismo com o nosso trabalho, visto que foi possível detetar a presença de *Enterococcus* resistentes à linezolida apenas nas amostras de alimentos crus, um antibiótico de última linha no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas.

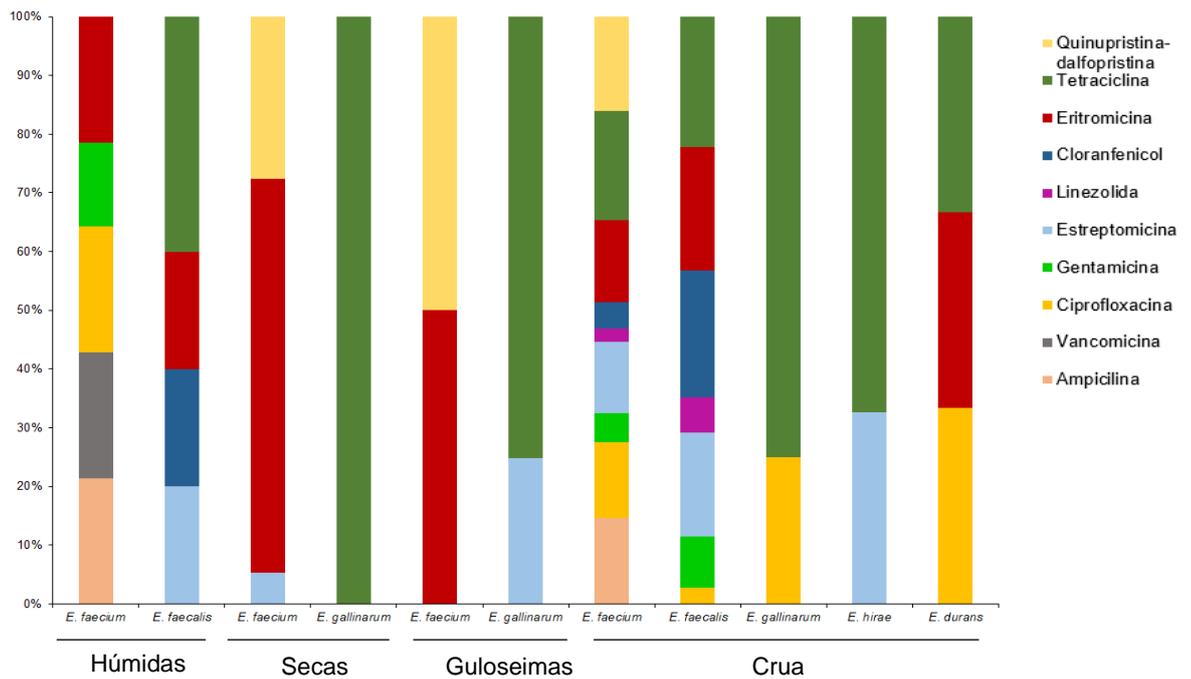


Figura 8. Distribuição das resistências a antibióticos pelas diferentes espécies de *Enterococcus* e pelo tipo de alimento analisados. A distribuição das resistências pela espécie é dada em

Este é o primeiro estudo em que se descrevem *Enterococcus* resistentes a antibióticos clinicamente relevantes tais como ampicilina, gentamicina, vancomicina e linezolida em alimentos comercializados para cães. Apesar de até à data existir um único estudo conhecido nesta temática que faça a pesquisa de *Enterococcus* resistentes, Ge *et al.* reportaram uma incidência de isolados multirresistentes mais baixa (2%) e todos os isolados multirresistentes foram identificados como *E. faecium* (59). Ainda que o processamento das amostras nesse estudo não tenha incluído um passo de enriquecimento com antibióticos como no nosso trabalho, e os resultados serem dificilmente comparáveis, foram mesmo assim detetados isolados de *Enterococcus* resistentes à ciprofloxacina, eritromicina, canamicina e tetraciclina (59). Em contraste com a escassez de estudos sobre a resistência a antibióticos em alimentos para animais de

Tabela 4. Perfis de resistência de *Enterococcus* aos diferentes antibióticos testados de acordo com o meio de origem.

Placa de origem	Isolados obtidos nos diferentes tipos de meio (n)	Amostras (n)	Marcas	Número de isolados que expressam resistência a antibióticos ^a										
				VAN	TEC	AMP	CIP	ERI	TET	GEN	ESTR	LIN	CHL	Q/D
Sem antibiótico	<i>E. faecium</i> (22)	húmida (4), seca (3),	A, B, J,	3	3	3	5	15	9	3	4	0	0	10
	<i>E. faecalis</i> (16)	guloseima (1),	I, N, Q,	0	0	0	0	3	5	1	3	0	1	RN
	<i>E. hirae</i> (7)	crua (14)	S, U, V	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	RN
	<i>E. casseliflavus</i> (1)			RN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	RN
	<i>E. durans</i> (1)				0	0	0	1	1	1	0	0	0	RN
	<i>E. avium</i> (1)				0	0	0	0	0	0	0	0	0	RN
Ampicilina (16 mg/L)	<i>E. faecium</i> (39)	seca (6),	I, R, K,	0	0	24	21	26	23	8	18	3	7	25
	<i>E. faecalis</i> (2)	guloseima (2),	T, U, V,	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	RN
	<i>E. gallinarum</i> (2)	crua (12)	W	RN	0	0	0	0	2	0	1	0	0	RN
Vancomicina (6 mg/L)	<i>E. faecalis</i> (1)	guloseima (2),	A, B,	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	RN
	<i>E. gallinarum</i> (6)	crua (3)	F, R	RN	0	0	1	0	5	0	0	0	0	RN
	<i>E. casseliflavus</i> (1)			RN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	RN
Cloranfenicol (16 mg/L)	<i>E. faecium</i> (1)	húmida (1),	A, B,	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
	<i>E. faecalis</i> (38)	crua (14)	K	0	0	0	4	35	36	13	28	11	38	RN

^a*E. casseliflavus* e *E. gallinarum* são naturalmente resistentes à vancomicina (ambos possuem o gene *vanC* no cromossoma), desta forma não foram considerados para o cálculo das resistências. *E. faecalis* é naturalmente resistente à Q/D e desta forma não foi incluído no cálculo de resistências. *n*, número de isolados; RN- resistência natural; VAN-vancomicina; TEC- teicoplanina; AMP- ampicilina; CIP- ciprofloxacina; ERI- eritromicina; GEN- gentamicina; ESTR- estreptomicina; LIN- linezolida; CHL- cloranfenicol; Q/D- quinupristina-dalfopristina

estimação, há vários trabalhos que abordam a detecção de bactérias resistentes em animais de estimação, nomeadamente cães. Em alguns deles, já foi reportada a elevada ocorrência de *Enterococcus* multirresistentes incluindo resistentes a antibióticos clinicamente importantes, tais como ampicilina (20%-60%) (48,125), vancomicina (<24%) e mais raramente linezolida (<2%) (126,127).

4.2.1. Resistência à vancomicina

Apesar da sua detecção numa minoria de isolados, a identificação de isolados resistentes à vancomicina neste trabalho foi notória. A vancomicina é considerada pela OMS um antibiótico no nível mais prioritário de todos devido: a) ao grande número de infeções (não só causadas por *Enterococcus*) em que este antibiótico é das poucas alternativas terapêuticas disponíveis; b) por ser usada com elevada frequência em medicina humana; e c) porque a transmissão de *Enterococcus* resistentes à vancomicina já foi anteriormente descrita em animais de produção (60).

Até à data não existem na literatura estudos que demonstrem a presença de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (ERV) em alimentos para animais de estimação. Foram identificados três isolados de *E. faecium* que expressaram resistência aos glicopéptidos, vancomicina e teicoplanina, obtidos de uma amostra húmida (paté) feito à base de carne e subprodutos animais de aves e fígado. Os três isolados albergavam o gene *vanA* que é o mais frequentemente descrito e disseminado em alimentos e animais (89–91). Para além da resistência aos glicopéptidos estes isolados mostraram ser multirresistentes com co-resistência à ampicilina, ciprofloxacina e eritromicina, em que dois dos três apresentaram adicionalmente resistência à gentamicina. Um dos três isolados foi caracterizado por MLST e identificado como ST17 (Tabela 5) que corresponde a um clone mundialmente disseminado em pacientes hospitalizados (90) e muito raramente encontrado em ambientes não hospitalares. Tanto quanto sabemos, esta parece ser a primeira descrição de um clone tipicamente hospitalar associado a um padrão de multirresistência incluindo a antibióticos clinicamente relevantes num alimento comercial para cães. De salientar ainda que este clone ST17 também já foi identificado em isolados obtidos de cães tratados com ampicilina e internados em unidades de cuidados intensivos de um hospital veterinário americano (128). Não podemos descartar a possibilidade destes clones colonizarem o intestino animal e os alimentos para cães poderem ser uma fonte dos mesmos, ainda que em quantidade reduzida, podendo ser selecionados pela toma de antibióticos como a ampicilina.

E. faecium tem sido a espécie mais frequentemente associada a animais de produção e a alimentos quando são detetados *Enterococcus* resistentes à vancomicina, e na grande maioria também associados ao genótipo *vanA* (97). Com a abolição da avoparcina (análogo da vancomicina) no ambiente de produção animal na Europa, a presença de ERV na cadeia alimentar tem vindo a diminuir, porém a sua presença é ainda comum em animais de produção dependendo da origem, tipo de processamento de amostras e dos animais (88,97). *Enterococcus* resistentes à vancomicina com o gene *vanA* já foram descritos em animais de estimação de diferentes países, tanto cães como gatos, sendo as taxas de resistência variáveis de estudo para estudo (<23%) (48,97). Alguns dos animais de estimação incluídos nesses estudos não tiveram contacto próximo com animais de produção nem foram sujeitos a tratamento prévio com vancomicina (129), o que em conjunto com o nosso estudo demonstra que os alimentos para animais de estimação podem ser um reservatório adicional de estirpes ERV ou de genes *van*.

4.2.2. Resistência à ampicilina

Apesar das taxas de resistência à ampicilina serem elevadas em *Enterococcus*, tanto nos hospitais como na comunidade, este é um antibiótico de primeira linha utilizado no tratamento de infeções causadas por *Enterococcus*, quando usado em sinergia com a vancomicina ou a gentamicina. As aminopenicilinas são consideradas de alta prioridade para a OMS. Este antibiótico é uma das poucas alternativas terapêuticas para o tratamento de infeções enterocócicas, e quando há resistência não pode ser usado em sinergismo com vancomicina ou gentamicina para o tratamento de infeções. A resistência à ampicilina já foi demonstrada em animais, sendo preocupante pelo exposto a sua transmissão para o ser humano (60).

O presente estudo permitiu identificar isolados *E. faecium* AmpR em grande parte das amostras cruas analisadas (93%; 43% de resistência de alto nível) constituídas por produtos de animais variados (bovinos, suínos, aves de capoeira, pato, novilho ou peixe, como por exemplo salmão), e também numa amostra húmida (correspondente ao isolado ERV). A resistência à ampicilina (valores de CMI entre 16 e 256 mg/L) foi detetada em 25 isolados de *E. faecium*, os quais também expressavam resistência à ciprofloxacina e à tetraciclina (88% para cada antibiótico), eritromicina (80%), estreptomina (64%), quinupristina-dalfopristina (60%), gentamicina (40%), cloranfenicol (28%), linezolida, vancomicina e teicoplanina (12% cada antibiótico). A incidência geral de resistência à ampicilina observada neste estudo (47% no total das amostras) é geralmente mais alta que

aquela observada em estudos de vigilância anteriores que incluíram isolados provenientes de fontes não hospitalares em Portugal (81,83).

Onze isolados *E. faecium* resistentes à ampicilina, representativos das diferentes amostras cruas de onde foram isolados, foram tipados por MLST. Estes isolados foram identificados como dez clones diferentes (Tabela 5): ST25 (novilho; marca A), ST80 (amostra de salmão; marca A), ST148 (pato; marca B), ST168 (veado; marca B), ST264 (novilho; marca A), ST451 (cabrito; marca A), ST970 (perú+ganso; marca B), ST1254 (frango+vitela; marca A), ST1263 (veado; marca B) e dois ST1611 (perú da marca A e Perú+salmão da marca B). O clone ST1611 foi identificado em amostras (perú e Perú+salmão) de duas marcas diferentes, indicando que pode haver uma fonte comum de contaminação, eventualmente na origem das matérias-primas animais. De acordo com os dados disponíveis na base de dados de MLST para *E. faecium* e com a literatura atual, pode-se constatar que: o ST80 tem sido frequentemente associado a isolados de infecções hospitalares; ST25 está disperso pela comunidade mas ocasionalmente foi associado a isolados clínicos; os clones ST148, ST168 e ST264 foram previamente identificados em animais de estimação em diferentes países; os clones ST451, ST970, ST1254 e ST1611 foram previamente identificados em animais de produção, nomeadamente aves; e o ST1263, que difere em apenas um alelo de um clone altamente disseminado a nível hospitalar (ST18), foi antes descrito no ambiente (90) (https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_efaecium_isolates).

Assim, os resultados deste estudo indicam o papel relevante dos alimentos para animais de estimação como veículos de *Enterococcus* resistentes à ampicilina e pertencentes a linhagens clonais não só as habitualmente identificadas em animais de produção como seria expectável, mas também de isolados clínicos de pacientes hospitalizados. Apesar de alguns trabalhos serem sugestivos que os cães são um reservatório de *Enterococcus AmpR*, a origem destes isolados não foi ainda elucidada (se humano-animal, animal-homem ou ambos) e apenas os alimentos crus foram reconhecidos como um fator de risco (62). Desta forma, este trabalho não só reforça os alimentos crus como um reservatório de isolados AmpR, como adiciona a possibilidade de outro tipo de rações (neste caso, húmidas) poderem ser importantes, reforçando a necessidade de mais estudos deste tipo.

O gene *ptsD* foi testado em todos os *E. faecium* deste estudo (n=80), tendo sido identificado em 16% dos isolados e em quase metade de *E. faecium AmpR* (48%) obtidos essencialmente a partir de alimentos crus (salmão, galinha, cabrito, novilho, veado), mas também de uma amostra húmida de galinha. O gene *ptsD* é responsável por codificar uma subunidade associada à membrana celular responsável pelo transporte de hidratos de

carbono sendo o primeiro gene conhecido por contribuir para a colonização intestinal durante o tratamento com β -lactâmicos (84). Este gene também foi reconhecido por ser um bom marcador para *E. faecium* AmpR provenientes de amostras clínicas e não clínicas (83). A detecção deste gene nos alimentos para animais de estimação alerta para o potencial patogénico destas estirpes que podem possuir os mesmos genes de virulência normalmente encontrados em *E. faecium* provenientes de pacientes hospitalizados.

4.2.3. Resistência à linezolida

A linezolida (oxazolidinona) é um antibiótico de última linha ou de reserva no tratamento de infeções multirresistentes causadas por diferentes espécies bacterianas de Gram-positivo, incluindo *Enterococcus*. As oxazolidinonas são consideradas de alta prioridade para a OMS. Sendo consideradas uma das poucas alternativas terapêuticas para o tratamento de infeções por bactérias de Gram-positivo multirresistentes, tendo sido já descritas resistências em isolados clínicos e isolados da comunidade, incluindo da cadeia alimentar. Neste último nicho, os isolados resistentes à linezolida parecem ser co-selecionados pelo uso de fenicóis ou tetraciclina na produção animal (60). O elevado número de amostras com isolados de *Enterococcus* resistentes à linezolida (23% no total) foi surpreendente ainda que limitados às amostras cruas (50%). A resistência à linezolida (MIC=8 mg/L) foi detetada em 11 isolados *E. faecalis* e 4 isolados *E. faecium* que expressaram, respetivamente, co-resistência ao cloranfenicol (100% cada), tetraciclina (92%/100%), eritromicina (100%/75%), estreptomicina (64%/100%), gentamicina (73%/0%), ciprofloxacina (18%/50%) e/ou ampicilina (0%/75%). Estes 15 isolados em conjunto com outros 5 isolados suscetíveis à linezolida (MIC=4 mg/L), continham diferentes genes de resistência adquirida à linezolida: *optrA* (6 *E. faecalis* e 1 *E. faecium*), *poxxA* (2 *E. faecium*) ou *optrA+poxxA* (8 *E. faecalis*, 3 *E. faecium*) (Figura 9). Apesar destas amostras serem importadas de outros países europeus, este trabalho constitui o primeiro estudo em que é descrita a presença de genes *optrA* em *Enterococcus* obtidos em Portugal.

Assim, foram caracterizados por MLST cinco *E. faecalis* (ST40, ST674, 2 ST1008 e ST1009) e um *E. faecium* (ST1833) resistentes à linezolida e/ou portadores dos genes *optrA/poxxA*. Outros três *E. faecium* portadores de *optrA* ou *poxxA* e também resistentes à ampicilina foram descritos na seção anterior (ST25, ST148 e ST1263) (Tabela 5).

Tabela 5. Caracterização de isolados representativos de *Enterococcus* recuperados de amostras provenientes de rações para cães comercializadas em Portugal.

Alimento (marca) ^a	Amostra	Espécie	MLST ^b	Perfil de suscetibilidade a antibióticos	MIC Amp (mg/L)	MIC Lin (mg/L) ^c	Genes R adquiridos
Salmão (A)	42	<i>E. faecium</i>	ST80	AMP, CIP, ERI, TET, GEN, ESTR, QD	>256	-	-
Salmão (A)	43	<i>E. faecalis</i>	ST674	CIP, ERI, TET, ESTR, CHL, LIN	-	8	<i>optrA</i>
Frango+ Cordeiro (A)	45	<i>E. faecium</i>	ST451	AMP, CIP, ERI, TET, GEN, ESTR, QD	>256	-	-
Frango+ Cordeiro (A)	45	<i>E. faecalis</i>	ST1008	ERI, TET, ESTR, CHL, LIN	-	8	<i>optrA, poxtA</i>
Aves+ Fígado (J)	9	<i>E. faecium</i>	ST17	VAN, AMP, TEC, CIP, ERI, TET, GEN	-	-	<i>vanA</i>
Frango+ Vitela (A)	46	<i>E. faecium</i>	ST1254	AMP, TET	12	-	-
Peru+ Cordeiro (A)	48	<i>E. faecalis</i>	ST1008	ERI, TET, GEN, ESTR, LIN, NIT, CHL	-	8	<i>optrA, poxtA</i>
Peru+ Cordeiro (A)	49	<i>E. faecium</i>	ST1611	AMP, CIP, ERI, TET, GEN, ESTR, QD	>256	-	-
Novilho (A)	50	<i>E. faecium</i>	ST25	AMP, CIP, ERI, TET, GEN, ESTR, QD, CHL, LIN	32	4	<i>poxtA</i>
Novilho (A)	50	<i>E. faecium</i>	ST264	AMP, CIP, TET, ESTR, QD	32	-	-
Novilho (A)	51	<i>E. faecium</i>	ST1833	ERI, TET, ESTR, QD, CHL, LIN	-	8	<i>optrA, poxtA</i>
Pato (B)	52	<i>E. faecium</i>	ST148	AMP, TET, ESTR, CHL, LIN	>256	8	<i>optrA</i>
Pato (B)	52	<i>E. faecalis</i>	ST40	ERI, TET, CHL, LIN	-	8	<i>optrA</i>
Veado (B)	53	<i>E. faecium</i>	ST168	AMP, CIP, ERI, TET, QD	32	-	-
Veado (B)	53	<i>E. faecium</i>	ST1263	AMP, ERI, TET, ESTR, QD, CHL	24	4	<i>poxtA</i>
Peru+Ganso (B)	54	<i>E. faecium</i>	ST970	AMP, CIP, ERI, TET, QD, CHL	>256	-	-
Peru+Ganso (B)	54	<i>E. faecalis</i>	ST1009	ERI, CHL, LIN	-	8	<i>optrA</i>
Peru+Salmão (B)	55	<i>E. faecium</i>	ST1611	AMP, CIP, ERI, TET, GEN, ESTR, QD	>256	-	-

AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CHL: cloranfenicol; ERI: eritromicina; ESTR: estreptomicina; GEN: gentamicina; LIN: linezolida; NIT- nitrofurantoina; QD: quinupristina-dalfopristina; TEC- teicoplanina; TET- tetraciclina; VAN- vancomicina; CMI: concentração mínima inibitória; MLST: *multilocus sequence typing*; R: resistência; ST: *sequence type*. ^aTreze amostras de dez tipos de alimentos diferentes foram analisadas: Salmão (2 amostras), Frango+ Cordeiro (2 amostras), Aves+ Fígado (1 amostra), Frango+ Vitela (1 amostras), Peru+ Cordeiro (2 amostras), Novilho (3 amostras), Pato (2 amostras), Veado (2 amostras), Peru+ Ganso (2 amostras), Peru+ Salmão (1 amostra).

^bST1008, ST1009 e ST1833 foram identificados como novos STs atribuídos neste estudo através das bases de dados PubMLST.

^cOs valores de CMI considerados resistentes à linezolida foram atribuídos de acordo com os pontos de corte atribuídos pelo EUCAST estando representados a negrito.

O clone ST1008 foi identificado em amostras diferentes (perú e cabrito) da mesma marca. É de realçar que o clone ST40 tem sido frequentemente associado a *E. faecalis* obtidos de isolados clínicos em diferentes países e principalmente na Europa (130) e o clone ST674 também foi previamente descrito em pacientes hospitalizados na Ásia (https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_efaecalis_isolates&page=profiles). Não foi possível comparar a dispersão dos restantes clones noutros nichos pois os ST1008 e ST1009 de *E. faecalis* e o ST1833 de *E. faecium* foram neste estudo identificados pela primeira vez, denotando a diversidade destas amostras.

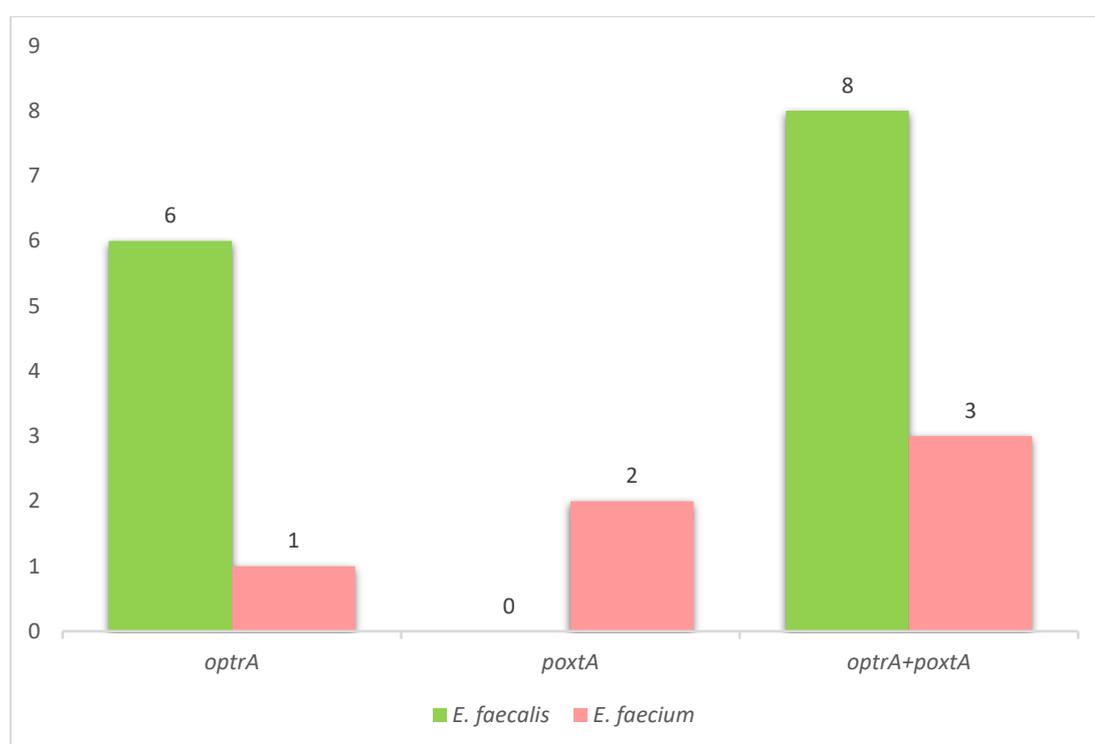


Figura 9. Distribuição dos genes de resistência à linezolida (*optrA* e *poxtA*) pelas diferentes espécies obtidas (em número de isolados).

Tendo em conta que a linezolida constitui uma alternativa terapêutica de última linha para o tratamento de infeções causadas por bactérias Gram-positivas, como por exemplo ERV que continuam a aumentar em muitos países, ou *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, os resultados deste trabalho revelam uma fonte de bactérias resistentes a antibióticos de último recurso que tem sido de certa forma negligenciada no contexto de uma só saúde (*One Health*). Tendo em conta os dados disponíveis verifica-se que as taxas de resistência à linezolida são baixas em Portugal e globalmente, mas é de referir que *Enterococcus* resistentes à linezolida têm emergido em anos recentes de forma alarmante

tanto nos hospitais como na comunidade (91,97). Até à data, os genes *optrA* e *poxtA* constituem os genes adquiridos conhecidos mais frequentemente responsáveis pela expressão de resistência à linezolida transferível entre os *Enterococcus*, essencialmente nos isolados obtidos a partir de animais de produção. Este crescimento exponencial verificado nos últimos anos tem sido particularmente associado à deteção de *optrA* em *Enterococcus* obtidos de diferentes animais produtores de alimentos (como aves, suínos, bovino e patos) e de carne crua, com origem em diferentes países e continentes (115,131,132). Tal pode ser explicado pela utilização frequente de fenicóis e tetraciclinas na produção animal, que favorecem eventos de co-seleção de resistência a ambas as classes de antibióticos, oxazolidinonas e fenicóis (*optrA* e *poxtA*) ou tetraciclina (apenas *poxtA*) (133), que desta forma contribuem para a disseminação de estirpes resistentes à linezolida na cadeia alimentar. Embora estudos recentes tenham descrito *Enterococcus* resistentes à linezolida em animais de estimação (134), tanto quanto sabemos este estudo corresponde à primeira descrição de resistência à linezolida em alimentos para cães. Na China, a presença de *E. faecalis* resistente à linezolida com o gene *optrA* (8%) foi detetada em alimentos crus de supermercado (carne/vegetais) assim como nos cães a quem este tipo de alimentos foi fornecido (134). Em outro estudo, desta vez realizado no Reino Unido, foi descrita a presença de *E. faecalis* (n=4) resistentes à linezolida com o gene *optrA*, provenientes de cães e gatos de um pequeno hospital de animais (127). Apesar do uso da linezolida não estar autorizado em animais de companhia, verifica-se que sua utilização fora das indicações previstas (*off-label*) em animais de estimação já foi documentada (https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-label-use-antimicrobials-veterinary-medicine-european-union-first-version_en.pdf), contribuindo para a seleção de bactérias resistentes a este antibiótico em animais de estimação. Assim, os resultados obtidos alertam para uma eventual disseminação local de genes de resistência à linezolida, raramente descritos no nosso país (135), e para a ligação estreita entre os diferentes nichos que as bactérias podem partilhar (animais-Homem-ambiente). Os dados reforçam ainda a necessidade de mais estudos de vigilância que incluam uma maior diversidade de amostras, nomeadamente alimentos para animais de estimação, dentro da política de uma só saúde.

5. Conclusões

1. A elevada incidência de alimentos para animais de estimação (>50%) contaminados com *Enterococcus spp.* indica a necessidade de melhoria de boas práticas de higiene e de fabrico destes alimentos. Os dados obtidos chamam a atenção para a possível necessidade de melhoria das práticas de produção e da seleção das matérias-primas usadas na produção de alimentos para cães, assim como de estudos de vigilância e de risco que avaliem a dimensão deste problema para a saúde pública.
2. A deteção de isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* multirresistentes, nomeadamente a antibióticos de última linha para o tratamento de infeções por bactérias de Gram-positivo multirresistentes, assim como de linhagens clonais previamente associadas a infeções humanas, é particularmente preocupante. A expansão de reservatórios e veículos (ex. animais domésticos e seus alimentos) transmissores de tais bactérias ao homem e ambiente pode constituir um futuro problema de saúde pública na área da resistência aos antibióticos. Esta preocupação é reforçada pelo facto dos genótipos encontrados estarem descritos na literatura como sendo transferíveis entre estirpes bacterianas e, por isso, em condições de pressão seletiva poderem expandirem para novos reservatórios e hospedeiros (136).
3. Este estudo mostra de forma clara que os alimentos para cães podem ser reservatórios/veículos de bactérias/genes de resistência aos antibióticos com impacto clínico, reforçando a necessidade de informação ao consumidor acerca de boas práticas de higiene na manipulação destes alimentos e também da importância deste nicho no contexto de Uma Só Saúde. O contato próximo de humanos com rações, cães ou suas fezes (diretamente ou através do ambiente), e a comercialização das marcas estudadas em diferentes países, podem representar um risco para a Saúde Pública.

6. Referências Bibliográficas

1. Irvine L, Cilia L. More-than-human families: Pets, people, and practices in multispecies households. *Sociol Compass*. 2017;11(2):1–13.
2. Daumas C, Paragon B-M, Thorin C, Martin L, Dumon H, Ninet S, et al. Evaluation of eight commercial dog diets. *J Nutr Sci*. 2014;3:1–5.
3. Europe: dog population, by country 2018 | Statista. [acedido em 27/09/2020]. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/414956/dog-population-european-union-eu-by-country/>
4. The European Pet Food Industry. FACTS & FIGURES 2019 European Overview. 2019;35–48. Disponível em: https://fediaf.org/images/FEDIAF_facts_and_figs_2019_cor-35-48.pdf
5. Pet Food - Estados Unidos | Statista Market Forecast. [acedido em 27/09/2020]. Disponível em: <https://www.statista.com/outlook/40130000/109/pet-food/united-states>
6. Inspeção-Geral da Agricultura, do Mar do A e do O do T. SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL NÃO DESTINADOS AO CONSUMO HUMANO (SPOA). 2018. Disponível em: https://www.igamaot.gov.pt/wp-content/uploads/RELATORIO_SPOA.pdf
7. Toldrá F, Aristoy MC, Mora L, Reig M. Innovations in value-addition of edible meat by-products. *Meat Sci*. 2012;92(3):290–6.
8. Alao BO, Falowo AB, Chulayo A, Muchenje V. The potential of animal by-products in food systems: Production, prospects and challenges. *Sustain*. 2017;9(7):1–18.
9. Jędrejek D, Levic J, Wallace J, Oleszek W. Animal by-products for feed: Characteristics, European regulatory framework, and potential impacts on human and animal health and the environment. *J Anim Feed Sci*. 2016;25(3):189–202.
10. Comissão Europeia. Regulamento (CE) n.º 1774/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 3 de Outubro de 2002 [acedido em 14/10/2020].
11. Comissão Europeia. Regulamento (CE) n.º 1069/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 21 de Outubro de 2009 [acedido em 14/10/2020].
12. Comissão Europeia. Regulamento (UE) n.º 142/20011 da Comissão de 25 de

- Fevereiro de 2011 [acedido em 14/10/2020].
13. Comissão Europeia. Regulamento (CE) n.º 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Maio de 2001 [acedido em 14/10/2020].
 14. Comissão Europeia. Regulamento (CE) n.º 183/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de Janeiro de 2005 [acedido em 14/10/2020].
 15. Aldrich GC, Koppel K. Pet food palatability evaluation: A review of standard assay techniques and interpretation of results with a primary focus on limitations. *Animals*. 2015;5(1):43–55.
 16. Zicker SC. Evaluating Pet Foods: How Confident Are You When You Recommend a Commercial Pet Food? *Top Companion Anim Med*. 2008;23(3):121–6.
 17. Guy RCE. Pet Foods. *Encycl Food Grains Second Ed*. 2015;3–4:223–7.
 18. Case LP, Daristotle L, Hayek MG, Raasch MF. History and Regulation of Pet Foods. *Canine Feline Nutr*. 2011;121–9.
 19. Castle M. FURTHER PROCESSING AND MANUFACTURING OF PETFOOD. In: *Operational Code: Petfood Processing*. 2018. 110–27.
 20. Lopes da Silva M de F, Santos L, Choupina A. A extrusão em tecnologia alimentar: tipos, vantagens e equipamentos. *Rev Ciências Agrárias*. 2015;38(1):03–10.
 21. Case LP, Daristotle L, Hayek MG, Raasch MF. Types of Pet Foods. *Canine Feline Nutr*. 2011;163–76.
 22. Barbier C. Retort Processes | Retorts.com. 2019 [acedido em 1/06/2020]. Disponível em: <https://www.retorts.com/white-papers/category/retort-processes/>
 23. FEDIAF: European Pet Food Industry Federation. How pet food is made. 2013;(202):20036. Disponível em: <http://www.petfoodinstitute.org/Index.cfm?Page=DryPetFood>
 24. Davies RH, Lawes JR, Wales AD. Raw diets for dogs and cats: a review, with particular reference to microbiological hazards. *J Small Anim Pract*. 2019;60(6):329–39.
 25. Garcia-Amezquita LE, Welte-Chanes J, Vergara-Balderas FT, Bermúdez-Aguirre D. Freeze-drying: The Basic Process. *Encycl Food Heal*. 2015;104–9.
 26. Schlesinger DP, Joffe DJ. Raw food diets in companion animals: A critical review.

- Can Vet J. 2011;52(1):50–4.
27. European Pet Food Industry Federation. Guide to Good Practice for the Manufacture of Safe Pet Foods. The European Pet Food Industry. 2018. 51, 55–6, 69. Disponível em:
http://www.fediaf.org/images/FEDIAF_Safety_Guide_February_2018_online.pdf
 28. Berghofer LK, Hocking AD, Miskelly D, Jansson E. Microbiology of wheat and flour milling in Australia. *Int J Food Microbiol.* 2003;85(1–2):137–49.
 29. Lambertini E, Buchanan RL, Narrod C, Pradhan AK. Transmission of Bacterial Zoonotic Pathogens between Pets and Humans: The Role of Pet Food. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56(3):364–418.
 30. Wong TL, Thom K, Nicol C, Heffernan H, MacDiarmid S. *Salmonella* serotypes isolated from pet chews in New Zealand. *J Appl Microbiol.* 2007;103(4):803–10.
 31. Nemser SM, Doran T, Grabenstein M, McConnell T, McGrath T, Pamboukian R, et al. Investigation of *Listeria*, *Salmonella*, and toxigenic *Escherichia coli* in various pet foods. *Foodborne Pathog Dis.* 2014;11(9):706–9.
 32. Food and Drug Administration. Hazard Analysis and Risk-Based Preventive Controls for Food for Animals. US Dep Heal Hum Serv. 2018.
 33. Food and Drug Administration. Hazard Analysis and Risk-Based Preventive Controls for Food for Animals. 2018. Disponível em:
<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/ucm459719.htm>.
 34. van Bree FPJ, Bokken GCAM, Mineur R, Franssen F, Opsteegh M, van der Giessen JWB, et al. Zoonotic bacteria and parasites found in raw meat-based diets for cats and dogs. *Vet Rec.* 2018;182(2):50.
 35. Buchanan RL, Baker RC, Charlton AJ, Riviere JE, Standaert R. Pet food safety : a shared concern *British Journal of Nutrition.* 2019;(2011):78–84.
 36. Carrión PA, Thompson LJ. Pet Food. *Food Safety Management: A Practical Guide for the Food Industry.* Elsevier Inc.; 2014. 379–396.
 37. Weese, J.S., Rousseau, J. AL. Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets. *Can Vet Journal= Rev Vet Can.* 2005;46(6):513–6.
 38. Hellgren J, Hästö LS, Wikstrom C, Fernström LL, Hansson I. Occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium* and *Enterobacteriaceae* in raw meat-based

- diets for dogs. *Vet Rec.* 2019;184(14).
39. Lamb K, Morgan M, Dwyer R. A brief history of pet foods , the pathogenic organisms of concern , and the potential harboring capacity of animal derived fats. *J Food Microbiol Saf Hyg.* 2018;3(2).
 40. Public Health England. Investigation into an outbreak of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) O157 PT 21 / 28 *Stx2* in England , August 2017-October 2018 About Public Health England. 2018.
 41. Bottari B, Bancalari E, Barera A, Ghidini S, Gatti M. Evaluating the presence of human pathogens in commercially frozen, biologically appropriate raw pet food sold in Italy. *Vet Rec.* 2020;1–6.
 42. Comissão Europeia. Regulamento n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002 [acedido em 15/10/2020].
 43. Comissão Europeia. Regulamento (UE) n.º 2279/2017 da Comissão de 11 de dezembro de 2017 [acedido em 15/10/2020].
 44. The European Pet Food Industry. Safety [acedido 11/11/2020]. Disponível em: <https://fediaf.org/self-regulation/safety.html/>
 45. European Pet Food Industry Federation. Guide to good practice for the manufactures of safe pet foods. 2006.
 46. World Health Organization. Ten threats to global health in 2019. [acedido em 14/10/2020]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>
 47. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(1):56–66.
 48. Iseppi, Ramona, Di Cerbo. Alessandro, Messi, Patrizia, Sabia C. Antibiotic Resistance and Virulence Traits in Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) and Extended-Spectrum β -Lactamase/AmpC-producing (ESBL/AmpC) *Enterobacteriaceae* from Humans and Pets. *Antibiotics.* 2020;9(4):1–14.
 49. Ferreira JP, Staerk K. Antimicrobial resistance and antimicrobial use animal monitoring policies in Europe: Where are we? *J Public Health Policy.*

- 2017;38(2):185–202.
50. Day MJ. Human-animal health interactions: The role of one health. *Am Fam Physician*. 2016;93(5):345–6.
 51. De Briyne N, Atkinson J, Borriello SP, Pokludová L. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet Rec*. 2014;175(13):325.
 52. European Medicines Agency. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018: Trends from 2010-2018. Ninth ESVAC Rep - EMA/294674/2019. 2020;106. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2017_en.pdf
 53. Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(2):321–32.
 54. Baede VO, Broens EM, Spaninks MP, Timmerman AJ, Graveland H, Wagenaar JA, et al. Raw pet food as a risk factor for shedding of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in household cats. *PLoS One*. 2017;12(11):1–11.
 55. Nüesch-inderbinnen M, Treier A, Zurfluh K, Stephan R, Nüesch-inderbinnen M. Raw meat-based diets for companion animals: a potential source of transmission of pathogenic and antimicrobial-resistant *Enterobacteriaceae*. *R Soc Open Sci*. 2019;6(10):1–11.
 56. Pitout JDD, Reisbig MD, Mulvey M, Chui L, Louie M, Crowe L, et al. Association between handling of pet treats and infection with *Salmonella* enterica serotype Newport expressing the AmpC β -lactamase, CMY-2. *J Clin Microbiol*. 2003;41(10):4578–82.
 57. Finley R, Reid-Smith R, Ribble C, Popa M, Vandermeer M, Aramini J. The occurrence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from commercially available canine raw food diets in three Canadian cities. *Zoonoses Public Health*. 2008;55(8–10):462–9.
 58. Finley R, Reid-Smith R, Ribble C, Popa M, Vandermeer M, Aramini J. The occurrence and anti-microbial susceptibility of *Salmonella* isolated from commercially available pig ear pet treats. *Zoonoses Public Health*. 2008;55(8–10):455–61.
 59. Ge B, Domesle KJ, Gaines SA, Lam C, Bodeis Jones SM, Yang Q, et al. Prevalence

- and antimicrobial susceptibility of indicator organisms *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. Isolated from U.S. animal food, 2005–2011. *Microorganisms*. 2020;8(7):1–14.
60. World Health Organization. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. 2018. 52. Disponível em: http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/cia/en/#.UiMEZ7zmSDA.mendele y
 61. Damborg P, Top J, Hendrickx APA, Dawson S, Willems RJL, Guardabassi L. Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human infections. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(8):2360–5.
 62. Van den Bunt G, Top J, Hordijk J, De Greeff SC, Mughini-Gras L, Corander J, et al. Intestinal carriage of ampicillin- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in humans, dogs and cats in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(3):607–14.
 63. Elghaieb H, Freitas AR, Abbassi MS, Novais C, Zouari M, Hassen A, et al. Dispersal of linezolid-resistant enterococci carrying *poxtA* or *optrA* in retail meat and food-producing animals from Tunisia. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(10):2865–9.
 64. Pavia M, Nobile CGA, Salpietro L, Angelillo IF. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J Food Prot*. 2000;63(7):912–5.
 65. Novais C, Coque TM, Costa MJ, Sousa JC, Baquero F, Peixe L V. High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(6):1139–43.
 66. Gousia P, Economou V, Bozidis P, Papadopoulou C. Vancomycin-resistance phenotypes, vancomycin-resistance genes, and resistance to antibiotics of enterococci isolated from food of animal origin. *Foodborne Pathog Dis*. 2015;12(3):214–20.
 67. Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;57(13):2857–76.
 68. Hanchi H, Mottawea W, Sebei K, Hammami R. The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns-an update. *Front Microbiol*. 2018;9:1–16.
 69. Švec P, Franz CMAP. The genus *Enterococcus*. *Lact Acid Bact Biodivers Taxon*.

- 2014;9781444333:175–211.
70. John U V., Carvalho J. *Enterococcus*: Review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. *Front Biol (Beijing)*. 2011;6(5):357–66.
 71. Sykes JE. Streptococcal and enterococcal infections. *Canine and Feline Infectious Diseases*. Elsevier Inc.; 2013. 334–346.
 72. Ramsey M, Hartke A HM. The Physiology and Metabolism of Enterococci. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y SN, editor. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts; 2014.
 73. Fiore, Elizabeth Tyne, Daria Van Gilmore MS. Pathogenicity of Enterococci. *Microbiol Spectr*. 20;72(2):189–211.
 74. Giraffa G. *Enterococcus*. *Encycl Food Microbiol Second Ed*. 2014;1:674–9.
 75. Bin-Asif H, Abid Ali S. The Genus *Enterococcus* and Its Associated Virulent Factors. *Microorganisms [Working Title]*. 2019.1–22.
 76. Guzman Prieto AM, van Schaik W, Rogers MRC, Coque TM, Baquero F, Corander J, et al. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: Attack of the clones? *Front Microbiol*. 2016;7(788):1–15.
 77. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front Microbiol*. 2019;10.
 78. Kristich, C. J.; Rice LB. ACA. Enterococcal Infection– Treatment and Antibiotic Resistance. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y SN, editor. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts; 2014.123–85.
 79. Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: From commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;52(3):297–308.
 80. Novais C, Tedim AP, Lanza VF, Freitas AR, Silveira E, Escada R, et al. Co-diversification of *Enterococcus faecium* core genomes and PBP5: Evidences of PBP5 horizontal transfer. *Front Microbiol*. 2016;7(1581):1–17.
 81. Novais C, Freitas AR, Silveira E, Antunes P, Silva R, Coque TM, et al. Spread of

- multidrug-resistant *Enterococcus* to animals and humans: An underestimated role for the pig farm environment. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(12):2746–54.
82. de Regt MJA, van Schaik W, van Luit-Asbroek M, Dekker HAT, van Duijkeren E, Koning CJM, et al. Hospital and community ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* are evolutionarily closely linked but have diversified through niche adaptation. *PLoS One.* 2012;7(2).
 83. Freitas AR, Tedim AP, Novais C, Coque TM, Peixe L. Distribution of putative virulence markers in *Enterococcus faecium*: towards a safety profile review. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(2):306–19.
 84. Zhang X, Top J, De Been M, Bierschenk D, Rogers M, Leendertse M, et al. Identification of a genetic determinant in clinical *Enterococcus faecium* strains that contributes to intestinal colonization during antibiotic treatment. *J Infect Dis.* 2013;207(11):1780–6.
 85. van Harten RM, Willems RJL, Martin NI, Hendrickx APA. Multidrug-Resistant Enterococcal Infections: New Compounds, Novel Antimicrobial Therapies? *Trends Microbiol.* 2017;25(6):467–79.
 86. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
 87. European Medicines Agency. Categorisation of antibiotics in the European Union. Vol. 31, Ema/Cvmp/Chmp/682198/2017. 2019. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf
 88. Nilsson O, Alm E, Greko C, Bengtsson B. The rise and fall of a vancomycin-resistant clone of *Enterococcus faecium* among broilers in Sweden. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;17:233–5.
 89. Freitas AR, Novais C, Duarte B, Pereira AP, Coque TM, Peixe L. High rates of colonisation by ampicillin-resistant enterococci in residents of long-term care facilities in Porto, Portugal. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;51(3):503–7.
 90. Freitas AR, Tedim AP, Francia M V., Jensen LB, Novais C, Peixe L, et al. Multilevel population genetic analysis of *vanA* and *vanB* *Enterococcus faecium* causing

- nosocomial outbreaks in 27 countries (1986-2012). *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(12):3351–66.
91. Bender JK, Cattoir V, Hegstad K, Sadowy E, Coque TM, Westh H, et al. Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resist Updat.* 2018;40:25–39.
 92. Sadowy E. Linezolid resistance genes and genetic elements enhancing their dissemination in enterococci and streptococci. *Plasmid.* 2018;99:89–98.
 93. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. 2019 [acedido em 30/10/2020].
 94. Ben Braïek O, Smaoui S. Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *Biomed Res Int.* 2019;2019:13.
 95. Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev.* 2002;26(2):163–71.
 96. Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol.* 1999;47(1–2):1–24.
 97. Torres C, Alonso CA, Ruiz-Ripa L, León-Sampedro R, del Campo R, Coque TM. Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Antimicrob Resist Bact from Livest Companion Anim.* 2018;185–227.
 98. Soares-Santos V, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T. Characterization of enterococci from food and food-related settings. *J Food Prot.* 2015;78(7):1320–6.
 99. Verraes C, Van Boxtael S, Van Meervenne E, Van Coillie E, Butaye P, Catry B, et al. Antimicrobial resistance in the food chain: A review. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(7):2643–69.
 100. ISO 6887-4:2017. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
 101. Agudelo Higueta NI, Huycke MM. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection.* 2014. 1–35.
 102. Novais C, Campos J, Freitas AR, Barros M, Silveira E, Coque TM, et al. Water supply and feed as sources of antimicrobial-resistant *Enterococcus* spp. in aquacultures of

- rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Portugal. *Sci Total Environ.* 2018;625:1102–12.
103. Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. - 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int J Food Microbiol.* 2003;88(2–3):165–88.
 104. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33(1):24–7.
 105. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3558–65.
 106. Quintela Baluja M, Böhme K, Fernández-No IC, Morandi S, Franco C, Gallardo JM, et al. Rapid differentiation of *Enterococcus* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Microbes Appl Res Curr Adv Challenges, Malaga, Spain.* 2012;294–8.
 107. Khan,Zeeshan A. Siddiqui,Mohd F. Park S. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics.* 2019;9(2):49.
 108. European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. 2020. 1–21. Disponível em: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2020_manuals/Manual_v_8.0_EUCAST_Disk_Test_2020.pdf
 109. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology.* 2019.
 110. Kahlmeter G, Giske CG, Kirn TJ, Sharp SE. Point-counterpoint: Differences between the European Committee on Antimicrobial susceptibility testing and Clinical and Laboratory standards institute recommendations for reporting antimicrobial susceptibility results. *J Clin Microbiol.* 2019;57(9):1–6.
 111. Magiorakos A, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Bacteria: an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268–81.
 112. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2002;40(6):1963–71.

113. Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJM, Robinson DA, Top J, Nallapareddy SR, Torres C, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J Clin Microbiol.* 2006;44(6):2220–8.
114. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. *Iran Biomed J.* 2007;11(3):161–7.
115. Wang Y, Lv Y, Cai J, Schwarz S, Cui L, Hu Z, et al. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(8):2182–90.
116. Du F, Lv X, Duan D, Wang L, Huang J. Characterization of a Linezolid- and Vancomycin-Resistant *Streptococcus suis* Isolate That Harbors *optrA* and *vanG* Operons. *Front Microbiol.* 2019;10:1–12.
117. Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection.* 2014.1–59.
118. Gaca AO, Lemos JA. Adaptation to Adversity: the Intermingling of Stress Tolerance and Pathogenesis in Enterococci. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2019;83(3):1–46.
119. Panagea S, Chadwick PR. Heat tolerance of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Pathol.* 1996;49(8):687–9.
120. McAuley CM, Gobius KS, Britz ML, Craven HM. Heat resistance of thermotolerant enterococci isolated from milk. *Int J Food Microbiol.* 2012;154(3):162–8.
121. Imanishi, M Rotstein, DS Reimschuessel R, Schwensohn CA, Woody DH Jr, Davis SW. Outbreak of *Salmonella* enterica serotype Infantis infection in humans linked to dry dog food in the United States and Canada, 2012. *J Am Vet Med Assoc.* 2014;244:545–53.
122. Thompson A. Ingredients: Where Pet Food Starts. *Top Companion Anim Med.* 2008;23(3):127–32.
123. Tran QD, Hendriks WH, Van der Poel AFB. Effects of drying temperature and time of a canine diet extruded with a 4 or 8mm die on physical and nutritional quality indicators. *Anim Feed Sci Technol.* 2011;165(3–4):258–64.

124. FEDIAF: European Pet Food Industry Federation. FEDIAF Guide to Good Practice for the Manufacture of Safe Pet Foods. Vol. 2001. 2010. 1–66. Disponível em: <http://www.fediaf.org/self-regulation/safety/>
125. Jung WK, Shin S, Park YK, Noh SM, Shin SR, Yoo HS, et al. Distribution and antimicrobial resistance profiles of bacterial species in stray dogs, hospital-admitted dogs, and veterinary staff in South Korea. *Prev Vet Med.* 2020;184:1–14.
126. Ben Said L, Dziri R, Sassi N, Lozano C, Ben Slama K, Ouzari I, et al. Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in canine and feline enterococci in Tunisia. *Acta Vet Hung.* 2017;65(2):173–84.
127. Hopkins K, Meunier D, Turton J, Bos M, Brown C, Graham E, et al. P2332 Identification of *optrA* in linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from companion animals in the UK. 2019;2332.
128. Ghosh A, Dowd SE, Zurek L. Dogs leaving the ICU carry a very large multi-drug resistant enterococcal population with capacity for biofilm formation and horizontal gene transfer. *PLoS One.* 2011;6(7):e22451.
129. Herrero IA, Fernández-Garayzábal JF, Moreno MA, Domínguez L. Dogs Should Be Included in Surveillance Programs for Vancomycin-Resistant Enterococci. *J Clin Microbiol.* 2004;42(3):1384–5.
130. Zischka M, Künne CT, Blom J, Wobser D, Sakingç T, Schmidt-Hohagen K, et al. Comprehensive molecular, genomic and phenotypic analysis of a major clone of *Enterococcus faecalis* MLST ST40. *BMC Genomics.* 2015;16(1):1–20.
131. Cavaco LM, Bernal JF, Zankari E, León M, Hendriksen RS, Perez-Gutierrez E, et al. Detection of linezolid resistance due to the *optrA* gene in *Enterococcus faecalis* from poultry meat from the American continent (Colombia). *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(3):678–83.
132. Na SH, Moon DC, Choi MJ, Oh SJ, Jung DY, Kang HY, et al. Detection of oxazolidinone and phenicol resistant enterococcal isolates from duck feces and carcasses. *Int J Food Microbiol.* 2019;293:53–9.
133. Elghaieb H, Tedim AP, Abbassi MS, Novais C, Duarte B, Hassen A, et al. From farm to fork: Identical clones and Tn6674-like elements in linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* from food-producing animals and retail meat. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(1):30–5.

134. Wu Y, Fan R, Wang Y, Lei L, Feßler AT, Wang Z, et al. Analysis of combined resistance to oxazolidinones and phenicols among bacteria from dogs fed with raw meat/vegetables and the respective food items. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–10.
135. Freitas AR, Tedim AP, Duarte B, Elghaieb H, Abbassi MS, Hassen A, et al. Linezolid-resistant (Tn6246::*fexB-poxA*) *Enterococcus faecium* strains colonizing humans and bovines on different continents: similarity without epidemiological link. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(9):2416–23.
136. Huang J, Chen L, Wu Z, Wang L. Retrospective analysis of genome sequences revealed the wide dissemination of *optrA* in Gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(2):614–6.

7. Anexos

7.1. Características dos meios de cultura usados neste trabalho.

Buffered Peptone Water	Brain Heart Infusion	Slanetz & Bartley agar	Mueller Hinton II	Tryptone Soya Broth
<ul style="list-style-type: none">•Meio não seletivo;•Elevada fonte de nitrogênio, vitaminas, minerais e aminoácidos;•Altos níveis de pH.•Utilizado como pré-enriquecimento com o intuito de ajudar na recuperação de bactérias que possam estar em stress devido às condições adversas a que os alimentos foram sujeitos.	<ul style="list-style-type: none">•Meio nutritivo e não seletivo;•Utilizado como enriquecimento com o intuito de fornecer os nutrientes adequados ao crescimento de bactérias que possam estar em baixo número.	<ul style="list-style-type: none">•Meio seletivo;•Possuí azida de sódio que é um agente seletivo responsável pela inibição do crescimento de bactérias de Gram-negativo;•TTC (<i>triphenyl tetrazolium chloride</i>), um suplemento indicador do crescimento bacteriano, permitindo isolar e quantificar <i>Enterococcus</i>, em que as suas colónias típicas apresentam uma tonalidade rosa claro a rosa vinoso.	<ul style="list-style-type: none">•Meio não seletivo e não diferencial;•Elevada fonte de nitrogênio, vitaminas, carbono, aminoácidos, enxofre e outros nutrientes essenciais;•Possuí amido que funciona como auxiliar no crescimento bacteriano e neutraliza os produtos tóxicos que se formam durante o crescimento bacteriano.	<ul style="list-style-type: none">•Meio não seletivo e nutritivo;•Elevada fonte de vitaminas, minerais e nitrogénio;•Utilizado para o cultivo de uma variedade de microrganismos .

7.2. Comunicação em forma de resumo submetida ao *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2020)*.

Apesar do congresso ter sido cancelado devido à pandemia Covid-19, todos os trabalhos submetidos foram sujeitos a revisão internacional por pares e publicados num livro de resumos acessível a partir da página da Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infeciosas (ESCMID; https://www.escmid.org/escmid_publications/eccmid_abstract_book/).

Abstracts 2020

Abstract 9246

Detection of linezolid-resistant enterococci carrying *optrA* and/or *poxtA* in raw-frozen dog foods commercialised in the EU: trend or threat?

Liliana Finisterra¹, Carla Novais¹, Barbara Duarte¹, Luisa Maria Vieira Peixe¹, Ana Raquel Freitas^{*1}

¹ Faculdade de Farmácia do Porto, UCIBIO-Requimte, Porto, Portugal

Abstract third-party references: The work was supported by UID/MULTI/04378/2019 with funding from FCT/MCTES through national funds.

Background: Raw-food-based diets have grown popularity recently as a healthier choice. Increasing controversy regarding their safety is installed, with limited scientific evidences showing their role as vehicles for transmission of antibiotic-resistant bacteria. Dogs have been described as reservoirs of clinically-relevant ampicillin-resistant (AmpR) *Enterococcus faecium* (Efm), but strains origin remains unknown. We aimed to characterize enterococci obtained from processed (dry/wet) and non-processed (raw-frozen) foods of main brands commercialized in Portugal.

Materials/methods: Forty-six samples (wet-n=22/dry-n=15/raw-frozen-n=9 foods; 24-international brands) from supermarkets/stores-n=8 and veterinary clinics-n=1 were included (September-November 2019). Raw-frozen samples were mainly constituted of salmon, chicken, turkey, calf, deer or duck, being a mixture of different meat types (muscle/viscera), fruits and vegetables. Samples (25g) were pre-enriched (37°C/16-18h) in Buffered-Petpone-Water (ISO6887-2), enriched without/with different antibiotics (BHI-broth+Amp-16µg/mL or vancomycin-6µg/mL or chloramphenicol-16µg/mL) and plated in Slanetz-Bartley-agar without/with the same antibiotics. Different morphotypes/plate were saved and antibiotic susceptibility studied (13 antibiotics-disk-diffusion; linezolid-microdilution; Amp-Etest; EUCAST/CLSI). Identification of species (*sodA*), search of *optrA/poxtA* (linezolid-resistance) and *ptsD* (clinically-relevant Efm marker) genes was done by PCR. MLST (pubmlst.org) was done in representatives and WGS is ongoing.

Results: *Enterococcus* (n=163) were identified in 19/46 (41%) (8/15-dry, 2/22-wet, 9/9-raw) of samples and identified as Efm (n=91), *E. faecalis* (Efs, n=59) or other species (n=13). Eighty-four were deeply studied. All 9 raw-frozen meat samples (Efm+Efs; n=30 each) carried Multi-Drug-Resistant (MDR) enterococci (n=20-Efm+22-Efs) including to ampicillin/ciprofloxacin/erythromycin/tetracycline/streptomycin/chloramphenicol-100% each, linezolid-78%, and gentamicin/quinupristin-dalfopristin-67% each. Linezolid-resistance (MIC=8-16mg/L) was detected in MDR enterococci carrying *optrA+poxtA* (5-Efs+3-Efm), only *optrA* (3-Efs, one ST40; 1-Efm) or only *poxtA* (2-Efm), corresponding to 78% of raw-frozen and 15% of all samples. MDR-AmpR-Efm (MIC=8->256 mg/L; n=18, one ST80) were identified in all raw-frozen samples and some carried *optrA*-n=1, *poxtA*-n=2 and/or *ptsD*-n=9. AmpR-linezolid-resistant-Efm were limited to one raw-frozen brand. In contrast, only one MDR-Efm (erythromycin/tetracycline/gentamicin) was detected in a wet sample.

Conclusions: Our study demonstrates that raw-frozen-foods for dogs carry MDR enterococci including to last-resource molecules for the treatment of human infections (linezolid). The close contact of pets with humans and the commercialization of the studied brands in different EU countries pose an international Public Health risk if transmission of such strains occurs between dogs and humans.

7.3. Comunicação em forma de “*press release*” internacional

O resumo incluído no anexo 7.2. foi escolhido pelo comité do *ECCMID 2020* para ser publicado na prensa internacional dando origem a vários artigos de *newsletters* e publicações por parte de magazines internacionais incluindo a prestigiada magazine americana, *The Scientist*. Seguem-se alguns exemplos:

- "Study reveals raw-type dog foods as a major source of multidrug-resistant bacteria that could potentially colonize humans", EurekaAlert, 2020, https://www.eurekaalert.org/pub_releases/2020-04/esoc-srr041720.php.
- "Study finds raw-type dog foods as a major source of multidrug-resistant bacteria that could potentially colonize humans", Center for Infectious Disease Research and Policy (CIDRAP), 2020, <https://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2020/04/eccmid-studies-probe-resistant-pathogens-pets-pet-food-and-people>.
- Finisterra, L.; Novais, C.; Duarte, B.; Peixe, L.; Freitas, A.R.. "Study finds raw-type dog foods as a major source of multidrug-resistant bacteria that could potentially colonize humans", PHYS.ORG, 2020, <https://phys.org/news/2020-04-raw-type-dog-foods-major-source.html>.
- Finisterra, L.; Novais, C.; Duarte, B.; Peixe, L.; Freitas, A.R.. "Raw dog food contains drug resistant bacteria, study finds", MedicalNewsToday, 2020, <https://www.medicalnewstoday.com/articles/raw-dog-food-contains-drug-resistant-bacteria-study-finds#Bacteria-resistance-to-key-antibiotics>.
- Finisterra, L.; Novais, C.; Duarte, B.; Peixe, L.; Freitas, A.R.. "Pet food can contain drug-resistant bacteria that may pass to humans", NewScientist, 2020, <https://www.newscientist.com/article/2241580-pet-food-can-contain-drug-resistant-bacteria-that-may-pass-to-humans/>.
- "Our Pets May Harbor Much More Than Coronavirus", The Scientist, 2020, <https://www.the-scientist.com/notebook/our-pets-may-harbor-much-more-than-coronavirus-67714>.

Caracterização de *Enterococcus* resistentes a antibióticos oriundos de alimentos para animais de estimação

Liliana Barroso Finisterra

Faculdade de Farmácia

