



**ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Caracterização do perfil de suscetibilidade bacteriana a antimicrobianos em saladas  
prontas a consumir**

**Inês Marques dos Santos**

Coimbra, julho de 2022



## **ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA**

### **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

#### **Caracterização do perfil de suscetibilidade bacteriana a antimicrobianos em saladas prontas a consumir**

**Coimbra, julho de 2022**

**Inês Marques dos Santos**

Aluna do Mestrado integrado em Medicina Veterinária

#### **Constituição do Júri**

*Presidente do Júri: Professora Doutora Sofia*

*Alexandra Giestas Cancela Duarte*

*Arguente: Professora Doutora Sofia Ferreira*

*Anastácio*

*Orientador: Professora Doutora Anabela Maduro  
de Almeida Francisco*

#### **Orientador Interno**

Professora Doutora Anabela Maduro de  
Almeida Francisco

#### **Coorientador Interno**

Mestre Ricardo Cabeças

#### **Orientadores Externos**

Professora Doutora Maria Eduarda  
Moreno da Silveira (Escola Universitária  
Vasco da Gama)

Dr. Augusto Silva e Dr. Ricardo Lopes  
(Laboratório INNO)

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Medicina  
Veterinária da EUVG

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
ÍNDICE DE TABELAS .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO .....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	2
2.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	2
2.2. SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS .....	3
2.3. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	3
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	4
3. RESULTADOS .....	4
3.1. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS .....	4
3.2. PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS .....	5
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO .....	12
5. AGRADECIMENTOS .....	17
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
ANEXO I. TABELAS SUPLEMENTARES.....	24
ANEXO II. CASUÍSTICA .....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** - Percentagem de isolados BF portadores de perfil de resistência ou suscetibilidade a antimicrobianos (n=29) p<0,001 (Teste de Fisher). AMP (ampicilina), PRL (piperacilina), TZP (piperacilina + tazobactam), IMP (imipenem), MEM (meropenem), ETP (ertapenem), FOX (cefoxitina), CAZ (ceftazidima), CN (gentamicina), TOB (tobramicina), AK (amicacina), NOR (norfloxacina), CIP (ciprofloxacina), C (cloranfenicol), SXT (sulfametoxazol/trimetoprim), TGC (tigeciclina) e BF (bacilos fermentadores).. ..... 6
- Figura 2** - Percentagem de isolados BNF portadores de perfil de resistência ou suscetibilidade a antimicrobianos (n=26) p<0,001 (Teste de Fisher). TZP (piperacilina + tazobactam), PRL (piperacilina), CAZ (ceftazidima), IMP (imipenem), MEM (meropenem), TOB (tobramicina), AK (amicacina) e CIP (ciprofloxacina) e BNF (bacilos não fermentadores). ..... 7
- Figura 3** - Percentagem de isolados BF (bacilos fermentadores) portadores de perfil de resistência por grupo de antimicrobianos. Penicilinas n=87 (AMP, PRL, TZP); Cefalosporinas n=58 (CAZ, FOX); Fluoroquinolonas n=58 (NOR, CIP); Carbapenemos n=87 (ETP, MEM, IMP); Cloranfenicol n=29 (C); Aminoglicosídeos n=87 (AK,TOB, CN); Tetraciclinas n= 29 (TGC) e Sulfonamidas n=29 (SXT). ..... 8
- Figura 4** - Percentagem de isolados BNF (bacilos não fermentadores) portadores de perfil de resistência por grupo de antimicrobianos. Penicilinas n=52 (PRL, TZP); Cefalosporinas n=26 (CAZ); Fluoroquinolonas n=26 (CIP); Carbapenemos n=52 (MEM, IMP); Aminoglicosídeos n=52 (AK,TOB).. 8
- Figura 5** - Percentagem de isolados *Enterococcus* spp. portadores de perfil de resistência ou suscetibilidade a antimicrobianos (n=20) p<0,001 (Teste de Fisher). AMP (ampicilina), IMP (imipenem), CIP (ciprofloxacina), NOR (norfloxacina), VA (vancomicina), TEC (teicoplanina), S (estreptomicina), CN (gentamicina), TGC (tigeciclina) e SXT (sulfametoxazol/trimetoprim). ..... 9

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Caracterização da composição das amostras de <i>saladas prontas a consumir</i> . ....	2
<b>Tabela 2</b> - Número de isolados bacilos de gram-negativo e cocos de gram-positivo obtidos por marca e amostra de salada. ....	4
<b>Tabela 3</b> - Identificação de isolados bacilos de gram-negativo por API 20E por tipo de fermentação, número de isolados e amostra. ....	5
<b>Tabela 4</b> - Bacilos de gram-negativo identificados e respetivo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos por número de isolados e amostra. ....	10
<b>Tabela 5</b> - Perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos em bacilos de gram-negativo: BF (n=29) e BNF (n=26) e respetivas amostras. ....	11
<b>Tabela 6</b> - Perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos em bacilos de cocos de gram-positivo: <i>Enterococcus</i> spp. (n=20) e <i>Streptococcus</i> spp.(n=2) e respetivas amostras. ....	11
<b>ANEXO I. TABELAS SUPLEMENTARES</b> .....	24
<b>Tabela Suplementar 1</b> - Número de isolados bacilos de gram-negativo resistentes aos antimicrobianos nos diferentes subgrupos BF e BNF. ....	25
<b>Tabela Suplementar 2</b> - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana nos bacilos de gram-negativos em bacilos não fermentadores e bacilos fermentadores por amostra. ....	26
<b>Tabela Suplementar 3</b> - Número de isolados de cocos de gram-positivo ( <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp.) resistentes aos antimicrobianos. ....	27
<b>Tabela Suplementar 4</b> - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana em cocos de gram-positivo aos antimicrobianos por amostra. ....	28
<b>Tabela Suplementar 5</b> - Espécies gram-negativas identificadas através do API 20E com respetiva percentagem de identificação e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. ....	28
<b>Tabela Suplementar 6</b> - Sistematização de estudos prévios realizados no mesmo âmbito do presente. ....	29
<b>Tabela Suplementar 7</b> - Número e classe de genes codificantes de carbapenemases presentes em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de acordo com o GenBank (NCBI). Adaptado de Botelho et al. (2020). .	30

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AK</b>	Amicacina
<b>AM-CL</b>	Amoxicilina-ácido clavulânico
<b>AMP</b>	Ampicilina
<b>AMR</b>	Resistência aos antimicrobianos (do Inglês <i>Antimicrobial Resistance</i> )
<b>API</b>	Índice de Perfil Analítico (do Inglês <i>Analytical Profile Index</i> )
<b>ATM</b>	Aztreonam
<b>BF</b>	Bacilos fermentativos
<b>BNF</b>	Bacilos não fermentativos
<b>C</b>	Cloranfenicol
<b>CAZ</b>	Ceftazidima
<b>CFPM</b>	Cefepima
<b>CIA</b>	Antimicrobianos de importância crítica (do Inglês <i>Critically important antimicrobials</i> )
<b>CIP</b>	Ciprofloxacina
<b>CLI</b>	Clindamicina
<b>CN</b>	Gentamicina
<b>CPZ</b>	Cefoperazona
<b>CRO</b>	Ceftriaxona
<b>CTX</b>	Cefotaxima
<b>CXM</b>	Cefuroxima
<b>DGAV</b>	Direção-Geral de Alimentação e Veterinária
<b>DGS</b>	Direção Geral da Saúde
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EMA</b>	Agência Europeia de Medicamentos (do Inglês <i>European Medicines Agency</i> )
<b>ETP</b>	Ertapenem

**EUCAST** Comit  Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (do Inglês *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

**FOX** Cefoxitina

**g** gramas

**IMP** Imipenem

**KAN** Canamicina

**KF** Cefalotina

**MDR** Multirresistentes (do Inglês *MultiDrug Resistant*)

**MEM** Meropenem

**MIC** Concentra o m nima inibit ria (do Ingl s *Minimum Inhibitory Concentration*)

**ml** Mililitro

**NaCl** Cloreto de s dio

**NAL**  cido nalid xico

**NOR** Norfloxacina

**OFX** Ofloxacina

**OMS** Organiza o Mundial da Saúde

**PBP** Prote nas de liga o   penicilina (do Ingl s *Penicillin Binding Protein*)

**PRL** Piperacilina

**S** Estreptomicina

**SAM** Ampicilina/sulbactam

**SMZ** Sulfametoxazol

**SXT** Sulfametoxazol/Trimetoprim

**TEC** Teicoplanina

**TET** Tetraciclina

**TGC** Tigeciclina

**TMP** Trimetoprim

**TOB** Tobramicina

<b>TSA</b>	Tripticase soja agar (do Inglês <i>Trypticase Soy Agar</i> )
<b>TZP</b>	Piperacilina + Tazobactam
<b>VA</b>	Vancomicina
<b>µg</b>	Micrograma

1 **Caracterização do perfil de suscetibilidade bacteriana a antimicrobianos em saladas prontas a**  
2 **consumir**

3 Inês Santos<sup>a</sup>, Eduarda Silveira<sup>a</sup>, Ricardo Cabeças<sup>a</sup>, Anabela Almeida<sup>a,b</sup>

4

5

6

7 <sup>a</sup> Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG)/ Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), Av.  
8 José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário - Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra,  
9 Portugal. (inesmarquessantos@hotmail.com; eduardasilveira@euvg.pt; ricardo.cabeças@euvg.pt;  
10 anabela.almeida@euvg.pt)

11 <sup>b</sup> Coimbra Institute for Biomedical Imaging and Translational Research (CIBIT), University of Coimbra,  
12 Edifício do ICNAS, Polo 3 Azinhaga de Santa Comba 3000-548 Coimbra, Portugal  
13 (anabela.almeida@euvg.pt)

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

## 28 RESUMO

29           As *saladas prontas a consumir* são uma alternativa rápida e saudável, cuja adesão e  
30 disponibilidade tem aumentado nos últimos anos. Os vegetais consumidos na forma não cozinhada  
31 trazem benefícios à saúde, no entanto, e apesar de serem considerados como alimentos seguros,  
32 poderão constituir risco para a saúde do consumidor por contaminação microbiológica. Adicionalmente,  
33 a emergência de bactérias portadoras de genes de resistência a antimicrobianos é neste momento  
34 considerada uma preocupação global. As bactérias multirresistentes (MDR) constituem um risco de  
35 saúde pública, contribuindo para a ineficácia do tratamento de infeções nos humanos e nos animais,  
36 sendo a resistência antimicrobiana uma das dez ameaças à saúde segundo a Organização Mundial de  
37 Saúde.

38           O objetivo deste estudo consistiu na caracterização do perfil de suscetibilidade aos  
39 antimicrobianos de amostra de saladas prontas a consumir de forma a contribuir para um maior  
40 conhecimento sobre o risco que estes produtos apresentam no âmbito da segurança alimentar. Para  
41 tal, foram adquiridas sete amostras de três marcas diferentes, de grandes superfícies da região Centro  
42 de Portugal. Após isolamento de bacilos de gram-negativo fermentadores e não fermentadores da  
43 lactose, e de cocos de gram-positivo, foi estudado o seu perfil de suscetibilidade utilizando o método  
44 de difusão por disco. Procedeu-se à identificação de isolados representativos de perfis de  
45 suscetibilidade a antimicrobianos através de API ou métodos fenotípicos.

46           Obtiveram-se 77 isolados, dos quais 29 bacilos de gram-negativo fermentadores, 26 bacilos de  
47 gram-negativo não fermentadores e 22 cocos de gram-positivo (dois *Streptococcus* spp. e 20  
48 *Enterococcus* spp.). Verificou-se que 82% dos bacilos de gram-negativo fermentadores e não  
49 fermentadores apresentaram resistência a uma ou mais classes de antimicrobianos, com maior  
50 incidência na classe dos beta-lactâmicos. Nos isolados de bacilos fermentadores, os grupos de  
51 antimicrobianos que se destacaram foram os seguintes: penicilinas (23%), cefalosporinas (9%),  
52 fluoroquinolonas (7%), cloranfenicol (7%), aminoglicosídeos (3%) e carbapenemos (1%); nos bacilos  
53 não fermentadores: penicilinas (100%), cefalosporinas (100%), fluoroquinolonas (100%),  
54 carbapenemos (60%) e aminoglicosídeos (8%). Nos cocos de gram-positivo, 100% dos isolados  
55 apresentaram resistência a pelo menos uma classe de antimicrobianos, sendo que todos os isolados  
56 apresentaram resistência ao imipenem e 18% ao sulfametoxazol/trimetoprim. No total dos isolados  
57 obtidos, 39% eram portadores de perfil de MDR, sendo que nestes foram identificadas as seguintes  
58 espécies: *Citrobacter braakii*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas aeruginosa* e  
59 *Aeromonas hydrophila/cavie/sobria*.

60           Este estudo permite concluir que as saladas prontas a consumir poderão constituir um veículo  
61 de transmissão e disseminação de bactérias portadoras de resistência aos antimicrobianos,  
62 contribuindo para uma colonização da microbiota intestinal por bactérias MDR, o que configura sério  
63 risco em termos de segurança alimentar e, conseqüentemente, de saúde pública.

64 **PALAVRAS-CHAVE:** AMR; Antimicrobianos; Bactérias; MDR; Multirresistência; Resistência a  
65 antimicrobianos; Saladas prontas a consumir; Segurança alimentar.

66

## 67 **ABSTRACT**

68 *Ready-to-eat salads* are a quick and healthy alternative with growing demand and availability in  
69 recent years. Uncooked vegetables bring several health benefits when consumed, however, and even  
70 though they're considered safe food, they can pose a threat to consumers health through microbiological  
71 contamination. Additionally, the emergence of antibiotic-resistance gene-carrying bacteria is considered  
72 a global concern nowadays. Multiresistant bacteria (MDR) are a public health risk, contributing for  
73 ineffective treatments in both humans and animals, with antibiotic resistance being considered one of  
74 the ten public health threats, according to the World Health Organization.

75 This study aimed to characterize the antibiotic susceptibility profile in ready-to-eat salad samples  
76 to contribute for a better knowledge of the risk that these products pose in the context of food safety.  
77 For that, seven samples of three different brands were acquired from large retail stores in the Centro  
78 region of Portugal. After isolating both lactose-fermenting and non-lactose- fermenting gram-negative  
79 bacilli, as well as gram-positive cocci, their susceptibility profile was assessed, using the disc diffusion  
80 method. The isolates representative of antibiotic susceptibility profiles were identified through API or  
81 phenotypic methods.

82 Seventy-seven isolates were obtained, of which 29 were fermentative gram-negative bacilli, 26  
83 non-fermentative gram-negative bacilli and 22 gram-positive cocci (two *Streptococcus* spp. and 20  
84 *Enterococcus* spp.). It was determined that 82% of fermentative and non-fermentative gram-negative  
85 bacilli showed resistance to one or more classes of antibiotics, with a higher incidence on the beta-  
86 lactam class. In the fermentative bacilli isolates, the more relevant antibiotic groups were: penicillins  
87 (23%), cephalosporins (9%), fluoroquinolones (7%), chloramphenicol (7%), aminoglycosides (3%) and  
88 carbapenems (1%); in the non-fermentative bacilli: penicillins (100%), cephalosporins (100%),  
89 fluoroquinolones (100%), carbapenems (60%) and aminoglycosides (8%). In the gram-positive cocci,  
90 100% of the isolates presented resistance to at least one class of antibiotics, with all isolates showing  
91 resistance to imipenem and 18% to sulfamethoxazole/trimethoprim. Of all obtained isolates, 39%  
92 showed a MDR profile, and in these the following species were identified: *Citrobacter braakii*, *Proteus*  
93 *vulgaris*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila/cavie/sobria*.

94 This study allows for the conclusion that ready-to-eat salads can be a vehicle for transmission  
95 and dissemination of antibiotic-resistant bacteria, contributing to a colonization of the intestinal  
96 microbiota by MDR bacteria, which poses a serious threat in terms of food safety and, consequently,  
97 public health.

98 **KEYWORDS:** AMR; Antimicrobials; Antimicrobials resistance; Bacteria; Food safety; MDR;  
99 Multiresistance; Ready to eat salads.

## 100 1. INTRODUÇÃO

101 *As saladas prontas a consumir* constituem um alimento cujo consumo tem vindo a aumentar  
102 devido à procura de um estilo de vida mais saudável, sobretudo em contexto urbano, aliado a um menor  
103 tempo disponível para preparar refeições (Althaus *et al.*, 2012; Berger *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2020;  
104 Taban *et al.*, 2013). Os *alimentos prontos a consumir* são definidos como “alimentos destinados pelo  
105 produtor ou fabricante ao consumo humano direto, sem necessidade de cozedura ou outra  
106 transformação, eficazes para eliminar ou reduzir para um nível aceitável os microrganismos perigosos”  
107 (Regulamento CE nº2073/2005). Os vegetais consumidos na forma não cozinhada trazem diversos  
108 benefícios à saúde, pois são ricos em hidratos de carbono, antioxidantes, minerais, vitaminas e fibra.  
109 No entanto apresentam também um maior risco para a saúde do consumidor, devido a contaminação  
110 microbiológica, que pode levar a surtos de doenças com origem alimentar (Araújo *et al.*, 2017; Berger  
111 *et al.*, 2010; Mritunjay & Kumar, 2017b, 2017a; Schwaiger *et al.*, 2011a; Taban *et al.*, 2013).

112 A contaminação dos vegetais utilizados na composição de *saladas prontas a consumir* pode  
113 ocorrer em diversas fases, nomeadamente na fase da pré-colheita, devido à utilização de fertilizantes  
114 biológicos constituídos por matéria fecal de animais contaminados, pela presença de animais selvagens  
115 ou domésticos no local de cultivo (Althaus *et al.*, 2012; Brandão *et al.*, 2014; Mritunjay & Kumar, 2017a),  
116 pela existência de esgotos nas imediações ou pela irrigação com águas contaminadas (Araújo *et al.*,  
117 2017; Berger *et al.*, 2010; Mritunjay & Kumar, 2017b; Schwaiger *et al.*, 2011b). A contaminação pode  
118 também ocorrer durante a fase de colheita pela manipulação dos vegetais, ou pelo contacto com  
119 instrumentos contaminados (Jung *et al.*, 2014) e até pela presença de insetos (Berger *et al.*, 2010).  
120 Durante a fase de pós-colheita a contaminação pode ser devida a lavagem inadequada ou utilização  
121 de água imprópria, bem como resultado de contaminações cruzadas durante a seleção e corte,  
122 transporte e distribuição (Berger *et al.*, 2010; Brandão *et al.*, 2014). A temperatura de armazenamento  
123 também é considerada um fator de grande relevância, pois afeta a sobrevivência e multiplicação de  
124 microrganismos que possam estar presentes no alimento (Berger *et al.*, 2010). Existem ainda diversos  
125 microrganismos capazes de formar biofilmes e assim resistir aos processos de lavagem/desinfecção  
126 (Mritunjay & Kumar, 2017a, 2017b; Schwaiger *et al.*, 2011b).

127 Adicionalmente, as bactérias poderão ser portadoras de genes de resistência a antimicrobianos  
128 (AMR), sendo a sua emergência uma preocupação global. A ocorrência de bactérias multirresistentes  
129 (MDR) constitui um risco de saúde pública, contribuindo para a ineficácia terapêutica e,  
130 consequentemente, levando à morte de 700.000 de indivíduos por ano, estimando-se que daqui a 28  
131 anos infeções comuns e ferimentos leves possam levar à subida deste número para 10 milhões,  
132 causando mais óbitos que o cancro, sendo atualmente considerada como uma das dez ameaças à  
133 saúde pela Organização Mundial da Saúde (O’Neill, 2014; Schwaiger *et al.*, 2011a; WHO, 2014).

134 O principal risco da utilização destas *saladas prontas a consumir* está relacionada com a  
135 ausência de tratamento térmico. Como tal as bactérias não são inativadas, podendo sobreviver ao  
136 processo de digestão gastrointestinal, contribuindo para a disseminação de AMR às bactérias

137 comensais do trato gastrointestinal e colonização deste. Esta disseminação pode ocorrer através de  
138 mecanismos de transferência horizontal de genes, nomeadamente através de transferência/captação  
139 de elementos móveis portadores de genes de AMR (Baloch *et al.*, 2017; Bezanson *et al.*, 2008; Novais  
140 *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2020). A microbiota intestinal encontra-se permanentemente em interação com  
141 microrganismos ambientais, que são introduzidos pela ingestão de alimentos, água e pelo contato com  
142 animais. Numa perspetiva *One Health*, a alimentação e saúde humana estão relacionadas com a saúde  
143 e alimentação animal e com o ambiente (da Silva *et al.*, 2021). Neste contexto, o uso inadequado de  
144 antimicrobianos e a forma de gestão de saneamento e de resíduos apresentam-se como atividades  
145 antropogénicas sobre as quais recai uma maior responsabilidade, pois estas têm um elevado impacto  
146 na diversidade da microbiota, favorecendo a disseminação, manutenção e aumento de AMR (da Silva  
147 *et al.*, 2021; Pesavento *et al.*, 2014).

148 Em Portugal os estudos realizados no contexto das resistências aos antimicrobianos em *saladas*  
149 *prontas a consumir* são ainda escassos (Campos *et al.*, 2013). Assim, o objetivo deste estudo consistiu  
150 na caracterização do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de amostra de *saladas prontas a*  
151 *consumir* de forma a contribuir para um maior conhecimento sobre o risco que estes produtos  
152 apresentam no âmbito da segurança alimentar.

153

154

## 155 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 156 2.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

157

158 Foram adquiridas, durante os meses de janeiro e fevereiro de 2022, sete amostras de *saladas*  
159 *prontas a consumir* (as quais foram designadas por amostra “A”, “B”, “C”, “D”, “E”, “F” e “G”), de três  
160 marcas distintas (1, 2 e 3), em diferentes superfícies comerciais na região centro de Portugal. A  
161 constituição das amostras encontra-se descrita na Tabela 1. Todas as amostras foram adquiridas e  
162 processadas dentro do seu prazo de validade, respeitando todas as condições de assepsia durante o  
163 processamento e manipulação das amostras.

164 **Tabela 1** - Caracterização da composição das amostras de *saladas prontas a consumir*.

Marca	Amostras	Ingredientes
1	A	Alface chicória, alface radicchio, canónigos
	B	Alface multifolhas verde, cenoura, milho, couve roxa
	C	Espinafres
2	D	Alface multifolhas e cenoura
	E	Rúcula
	F	Alface verde, alface roxa, coentros
3	G	Alface verde, alface roxa, rúcula selvagem

165

## 2.2. SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

O processamento de cada uma das amostras foi realizado através de pesagem de 10 g de cada amostra, posterior pré-enriquecimento em água peptonada (Scharlau®) numa proporção de 1:10 e homogeneização em *Stomacher* (Interscience®). Procedeu-se à seleção de bacilos fermentadores (BF) e bacilos não fermentadores (BNF) de gram-negativo e *Enterococcus spp.* utilizando a técnica de espalhamento em diferentes meios de cultura seletivos, ou semi-seletivos (*Hektoen Enteric Agar*, Liofilchem®; *Slanetz Bartley Agar*, Condalab®), respetivamente, conforme previamente descrito (King & Metzger, 1968; Novais *et al.*, 2005; Slanetz & Bartley, 1957). Após incubação (37°C/18-24 horas) as colónias isoladas foram selecionadas com base em características morfológicas, tendo as mesmas sido repicadas para *Trypticase Soy Agar* (TSA) (Liofilchem®).

A identificação presuntiva de isolados de BF e BNF foi realizada recorrendo à prova da oxidase (Sigma-Aldrich®) e sistema API 20E (Biomérieux®), sendo que para os BNF incluíram-se provas adicionais (mobilidade, redução dos nitratos, crescimento em meio de cultura agar *MacConkey*, e prova da oxidação/fermentação da glucose). A identificação dos géneros *Enterococcus* e *Streptococcus* foi realizada através de coloração de Gram, reação da catalase, hidrólise da esculina e crescimento em NaCl (Cloreto de sódio) a 6,5% (Novais *et al.*, 2013).

## 2.3. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

O estudo de suscetibilidade a antimicrobianos foi realizado através do método de difusão por disco de acordo com as normas internacionais (EUCAST, 2022): ***Enterococcus spp.*** e ***Streptococcus spp.*** - ampicilina (AMP) 2 µg, imipenem (IMP) 10 µg, norfloxacin (NOR) 10 µg, gentamicina (CN) 30 µg, estreptomicina (S) 300 µg, teicoplanina (TEC) 30 µg, vancomicina (VA) 5 µg, tigeciclina (TGC) 15 µg, ciprofloxacina (CIP) 5 µg; **BNF** - ceftazidima (CAZ) 10 µg, imipenem (IMP) 10 µg, amicacina (AK) 30 µg, tobramicina (TOB) 10 µg, piperacilina (PRL) 30 µg, piperacilina + tazobactam (TZP) 36 µg, meropenem (MEM) 10 µg, ciprofloxacina 5 µg (CIP); **BF** - ampicilina (AMP) 10 µg, cefoxitina (FOX) 30 µg, ceftazidima (CAZ) 10 µg, imipenem (IMP) 10 µg, amicacina (AK) 30 µg, tobramicina (TOB) 10 µg, sulfametoxazol/trimetoprim (SXT) 25 µg, norfloxacin (NOR) 10 µg, cloranfenicol (C) 30 µg, tigeciclina (TGC) 15 µg, piperacilina (PRL) 30 µg, piperacilina + tazobactam (TZP) 36 µg, ertapenem (ETP) 10 µg, meropenem (MEM) 10 µg, gentamicina (CN) 10 µg, ciprofloxacina 5 µg (CIP).

Os isolados que apresentaram um perfil de resistência intermédia, de acordo com as diretrizes da norma EUCAST, foram classificados como resistentes. Classificaram-se como isolados multirresistentes (MDR), todos os isolados que apresentaram um perfil de resistência a três ou mais classes de antimicrobianos.

## 202 2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

203

204 O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi analisado, aplicando o teste de Fisher recorrendo  
205 ao software R (R Core Team ®, 2019).

206

## 207 3. RESULTADOS

### 208 3.1. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

209

210 No total foi possível obter 77 isolados puros dos quais foram obtidos 55 isolados de gram-negativo:  
211 26 de BNF (*Pseudomonadales*) e 29 de bactérias BF (*Enterobacterales*). Foram também identificados  
212 22 isolados de gram-positivo: 20 isolados de *Enterococcus* spp. (salada A, B, C e E) e dois isolados de  
213 *Streptococcus* spp. do grupo D (salada C e D) (Tabela 2).

214 **Tabela 2** - Número de isolados de bacilos de gram-negativo e cocos de gram-positivo obtidos por marca e amostra  
215 de salada.

Marca	Amostras	Número de isolados de bactérias obtidos por amostra		
		Bacilos de gram-negativo	Cocos de gram-positivo	Total
1	A	10	5	15
	B	10	5	15
2	C	4	7	11
	D	5	1	6
	E	5	4	9
3	F	12	0	12
	G	9	0	9
	Total	55	22	77

216

217 De acordo com o perfil de suscetibilidade foram seleccionados 25 isolados para identificação por  
218 API 20E, do quais apenas 15 isolados apresentaram uma percentagem de identificação acima de 90%  
219 (Tabela 3; Tabela Suplementar 5).

220

221

222

223

224

225

226

227 **Tabela 3** - Identificação de isolados bacilos de gram-negativo por API 20E por tipo de fermentação, número de  
 228 isolados e amostra (n=15).

Género/espécie	Fermentação	Isolados (n)	Amostra
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae</i>	BF	1	A
<i>Hafnia alvei</i>	BF	1	B
<i>Enterobacter cloacae</i>	BF	5	F, B, D
<i>Citrobacter braakii</i>	BF	1	B
<i>Pseudomonas luteola</i>	BF	1	C
<i>Providencia rettgeri</i>	BF	1	E
<i>Proteus vulgaris</i>	BF	1	E
<i>Aeromonas hydrophila/cavie/sobria</i>	BNF*	1	D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BNF*	3	G

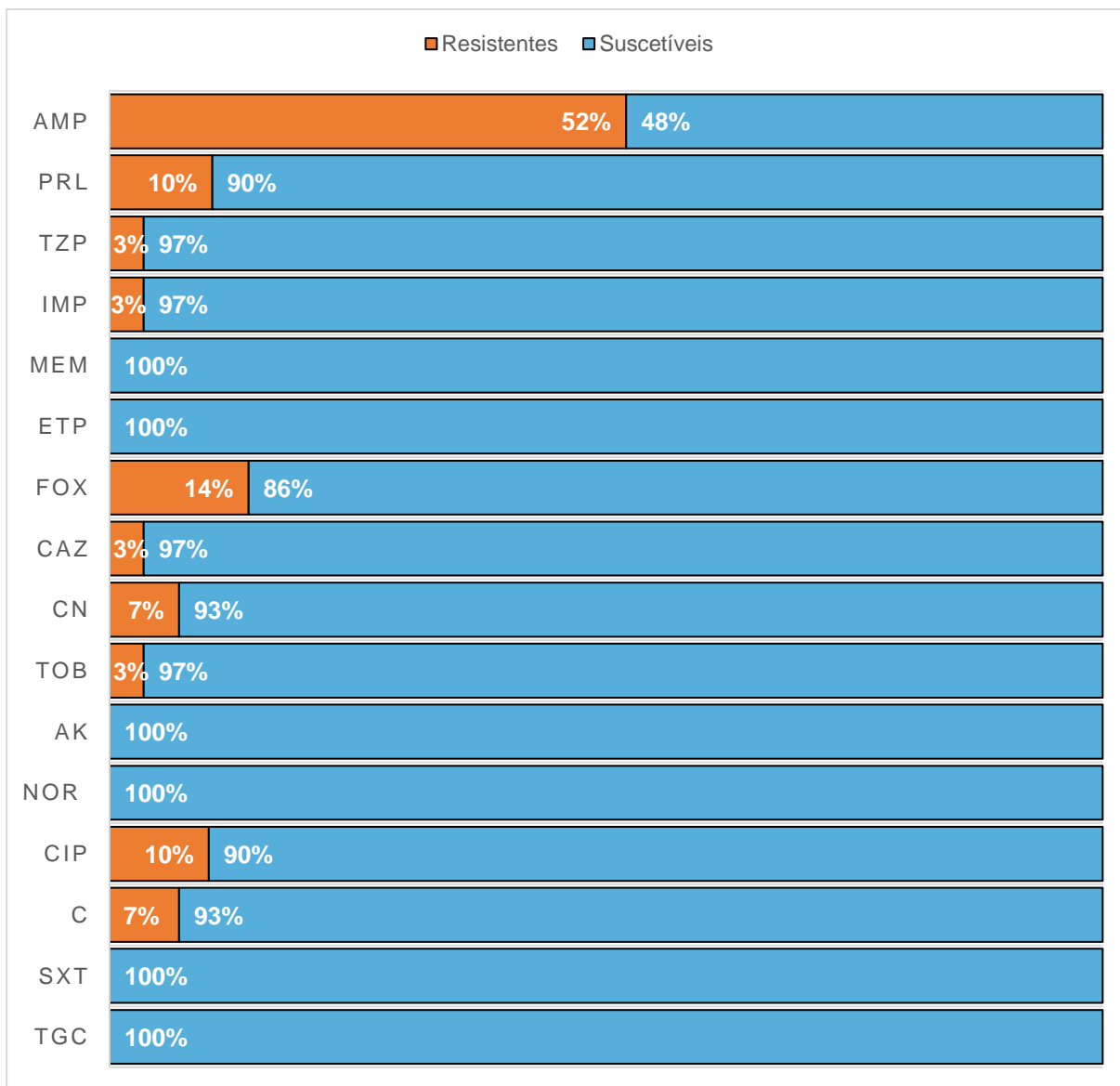
229 BF (Bacilos fermentativos), BNF (Bacilos não fermentativos), \*API 20E + Provas adicionais  
 230

231

### 232 3.2. PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

233

234 Relativamente aos BF a maior percentagem de isolados resistentes foi registada para o  
 235 antimicrobiano AMP (n=15/29) seguido de FOX (n=4/29), de CIP (n=3/29), de PRL (n=3/29), de C  
 236 (n=2/29), de CN (n=2/29) e menor à TOB (n=1/29), IMP (n=1/29), TZP (n=1/29) e CAZ (n=1/29).  
 237 Nenhum isolado apresentou resistências à NOR, SXT, AK, MEM, ETP e TGC (Figura 1; Tabela  
 238 Suplementar 1). Dos 29 BF encontrados neste estudo, dez isolados foram suscetíveis a todos os  
 239 antibióticos testados. Nos BNF todos os isolados apresentaram resistência ao IMP (n=26/26), à CAZ  
 240 (n=26/26), à CIP (n=26/26), à TZP (n=26/26), à PRL (n=26/26) e verificou-se menor resistência em  
 241 MEM (5/26) e TOB (n=4/26), sendo que nenhum isolado apresentou resistência à AK (Figura 2; Tabela  
 242 5; Tabela Suplementar 1).

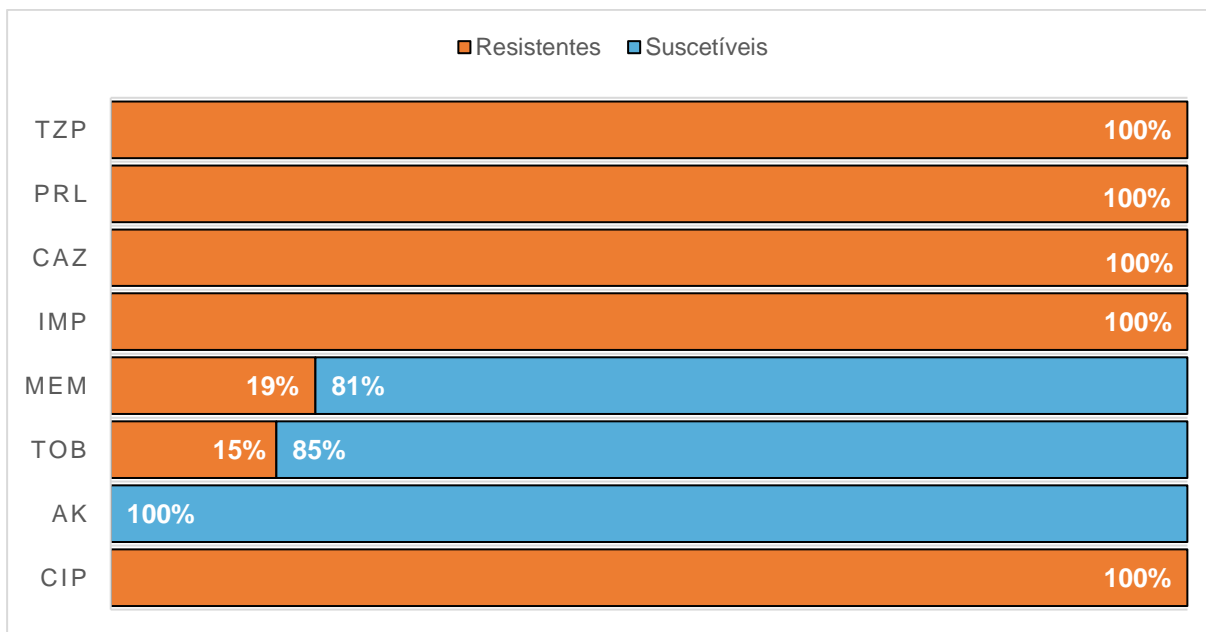


243

244 **Figura 1** - Percentagem de isolados BF portadores de perfil de resistência ou suscetibilidade a antimicrobianos  
 245 (n=29) p<0,001 (Teste de Fisher).

246 AMP (ampicilina), PRL (piperacilina), TZP (piperacilina + tazobactam), IMP (imipenem), MEM (meropenem), ETP  
 247 (ertapenem), FOX (cefoxitina), CAZ (ceftazidima), CN (gentamicina), TOB (tobramicina), AK (amicacina), NOR  
 248 (norfloxacina), CIP (ciprofloxacina), C (cloranfenicol), SXT (sulfametoxazol/trimetoprim), TGC (tigeciclina) e BF  
 249 (bacilos fermentadores).

250



251

252 **Figura 2** - Percentagem de isolados BNF portadores de perfil de resistência ou suscetibilidade a antimicrobianos  
 253 (n=26) p<0,001 (Teste de Fisher).

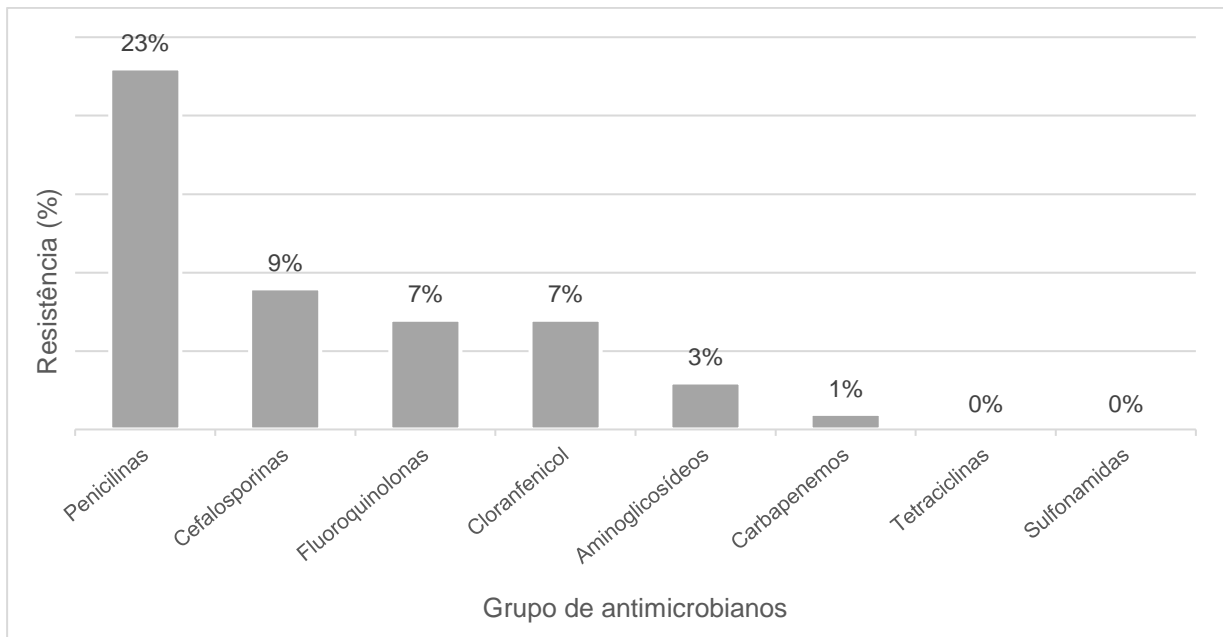
254 TZP (piperacilina + tazobactam), PRL (piperacilina), CAZ (ceftazidima), IMP (imipenem), MEM (meropenem),  
 255 TOB (tobramicina), AK (amicacina), CIP (ciprofloxacina) e BNF (bacilos não fermentadores).

256

257

258 No total dos isolados de gram-negativo (BF e BNF) analisados, verificou-se que 82% (n=45/55)  
 259 isolados apresentaram resistência a uma ou mais classes de antimicrobianos.

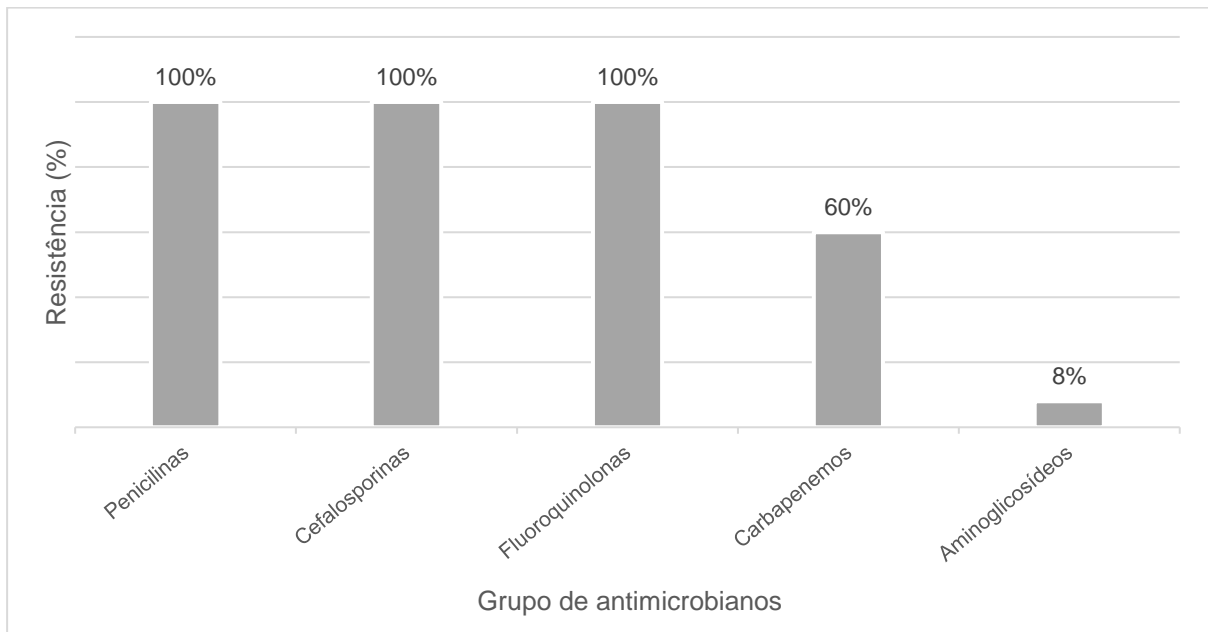
260 Tendo em consideração os diferentes grupos de antimicrobianos testadas nos BF (penicilinas,  
 261 cefalosporinas, fluoroquinolonas, carbapenemos, cloranfenicol, aminoglicosídeos, tetraciclina e  
 262 sulfonamidas) verificou-se que a maior percentagem de resistência incidiu sobre o grupo das penicilinas  
 263 (23%, n=20/87) e em menor percentagem em cefalosporinas (9%, n=5/58), fluoroquinolonas (7%,  
 264 n=4/58), cloranfenicol (7%, n=2/29), aminoglicosídeos (3%, n=3/87) e carbapenemos (1%, n=1/87),  
 265 sendo que não existiram resistências aos grupos das tetraciclina e sulfonamidas (Figura 3). Nos BNF  
 266 todos os isolados apresentaram 100% de resistência às penicilinas (n=52/52), cefalosporinas (n=26/26)  
 267 e fluoroquinolonas (n=26/26), 60% (n=31/52) aos carbapenemos e em menor percentagem em  
 268 aminoglicosídeos (6%, n=4/52) (Figura 4).



269

270 **Figura 3** - Percentagem de isolados BF (bacilos fermentadores) portadores de perfil de resistência por grupo de  
 271 antimicrobianos. Penicilinas n=87 (AMP, PRL, TZP); Cefalosporinas n=58 (CAZ, FOX); Fluoroquinolonas n=58  
 272 (NOR, CIP); Carbapenemos n=87 (ETP, MEM, IMP); Cloranfenicol n=29 (C); Aminoglicosídeos n=87 (AK, TOB,  
 273 CN); Tetracilinas n= 29 (TGC) e Sulfonamidas n=29 (SXT).

274



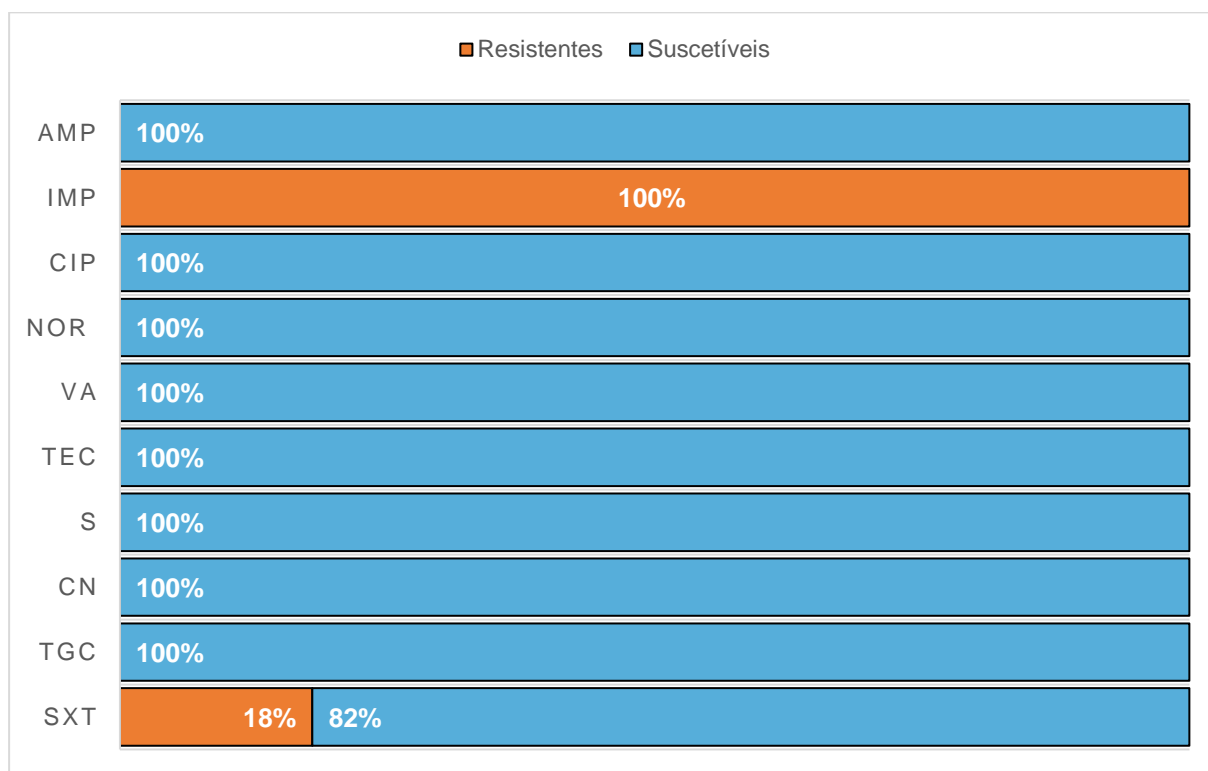
275

276 **Figura 4** - Percentagem de isolados BNF (bacilos não fermentadores) portadores de perfil de resistência por grupo  
 277 de antimicrobianos. Penicilinas n=52 (PRL, TZP); Cefalosporinas n=26 (CAZ); Fluoroquinolonas n=26 (CIP);  
 278 Carbapenemos n=52 (MEM, IMP); Aminoglicosídeos n=52 (AK, TOB).

279

280

281 Nos cocos de gram-positivo não foram observadas resistências às penicilinas, aos  
 282 aminoglicosídeos, às tetraciclina e aos glicopeptídeos. Todos os isolados de *Enterococcus* spp.  
 283 exibiram resistência ao antimicrobiano IMP (n=20/20) e em alguns isolados simultaneamente  
 284 resistência ao SXT (n=3/22). Nos restantes antimicrobianos testados (AMP, CN, S, TEC, VA, CIP, NOR)  
 285 todos os isolados demonstraram total suscetibilidade (Figura 5; Tabela Suplementar 4). Nos dois  
 286 isolados de *Streptococcus* spp., semelhante ao que foi descrito em *Enterococcus* spp., todos  
 287 apresentaram resistência ao IMP e num isolado simultaneamente evidenciou-se resistências ao  
 288 antimicrobiano SXT e NOR. Nenhum isolado apresentou resistência aos antimicrobianos AMP, VA,  
 289 TEC, S, CN e TGC (Tabela suplementar 3; Tabela Suplementar 4).



290  
 291 **Figura 5** - Percentagem de isolados *Enterococcus* spp. portadores de perfil de resistência ou suscetibilidade a  
 292 antimicrobianos (n=20) p<0,001 (Teste de Fisher).  
 293 AMP (ampicilina), IMP (imipenem), CIP (ciprofloxacina), NOR (norfloxacina), VA (vancomicina), TEC (teicoplanina),  
 294 S (estreptomicina), CN (gentamicina), TGC (tigeciclina) e SXT (sulfametoxazol/trimetoprim).

295  
 296  
 297 Dos 55 isolados de gram-negativo resultantes deste estudo observou-se que 53% de bacilos  
 298 de gram-negativo apresentavam um perfil MDR (n=29/55). Também em cocos de gram-positivo se  
 299 observou um isolado do género *Streptococcus* com um perfil de MDR, nomeadamente, resistência  
 300 simultânea ao IMP, SXT e NOR. No total de isolados obtidos verificou-se que 39% (n=30/77)  
 301 apresentavam perfil de MDR. Dos 15 isolados identificados por API 20E destacam-se as seguintes  
 302 espécies: *Citrobacter braakii*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas aeruginosa* e  
 303 *Aeromonas hydrophila/cavie/sobria* (Tabela 4).

304

305 **Tabela 4** - Bacilos de gram-negativo identificados e respetivo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos por  
 306 número de isolados e amostra.

Género/espécie	Isolados (n)	Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos	Amostra
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	1		A
<i>Hafnia alvei</i>	1	AMP	B
<i>Enterobacter cloacae</i>	1		F
<i>Providencia rettgeri</i>	1		E
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	AMP - PRL	F
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	AMP - FOX	B, D
<i>Citrobacter braakii</i>	1	AMP - FOX - C	B
<i>Proteus vulgaris</i>	1	AMP - TOB - C - CN	E
<i>Pseudomonas luteola</i>	1		C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	G
<i>Aeromonas hydrophila/cavie/sobria</i>	1	PRL - TZP - CAZ - IMP - TOB - CIP	D

307 AMP (ampicilina), FOX (cefoxitina), TOB (tobramicina), C (cloranfenicol), CAZ (ceftazidima), IMP (imipenem), CN  
 308 (gentamicina), PRL (piperacilina), TZP (piperacilina + tazobactam), TOB (tobramicina) e CIP (ciprofloxacina).

309

310

311 Os perfis de suscetibilidade encontrados neste estudo foram variáveis: em BF verificou-se que a  
 312 resistência exclusivamente ao antimicrobiano AMP foi mais comum (n=7/29), enquanto que nos BNF  
 313 verificou-se um perfil de MDR mais frequente à PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP (n=17/26) (Tabela 5;  
 314 Tabela Suplementar 2). Nos cocos de gram-positivo o perfil de suscetibilidade mais comum foi a  
 315 resistência ao antimicrobiano IMP em *Enterococcus* spp. (n=20/20) (Tabela 6; Tabela Suplementar 4).

316

317

318

319

320

321

322

323 **Tabela 5** - Perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos em bacilos de gram-negativo: BF (n=29) e BNF (n=26) e  
 324 respetivas amostras.

BF		
<i>Perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos</i>	<i>nº de isolados</i>	<i>Amostras</i>
AMP	7	A, B, E, F
AMP- CIP	1	B
AMP - PRL	2	F, G
AMP - FOX	3	B, D
AMP - FOX - C	1	B
AMP - TOB - C - CN	1	E
PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	1	C
CN	1	D
CIP	2	E
BNF		
<i>Perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos</i>	<i>nº de isolados</i>	<i>Amostras</i>
PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	17	A, B, F, G
PRL - TZP - CAZ - IMP - TOB - CIP	4	D, F
PRL - TZP - CAZ - IMP - MEM - CIP	5	A, B, D

325 AMP (ampicilina), FOX (cefoxitina), C (cloranfenicol), CAZ (ceftazidima), IMP (imipenem), CN (gentamicina), PRL  
 326 (piperacilina), TZP (piperacilina + tazobactam), TOB (tobramicina), CIP (ciprofloxacina), MEM (meropenem), BF  
 327 (bacilos fermentativos) e BNF (bacilos não fermentativos).

328

329

330 **Tabela 6** - Perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos em bacilos de cocos de gram-positivo: *Enterococcus*  
 331 spp. (n=20) e *Streptococcus* spp.(n=2) e respetivas amostras.

<i>Enterococcus</i> spp.		
<i>Perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos</i>	<i>nº de isolados</i>	<i>Amostras</i>
IMP	17	A, B, C, E
IMP - SXT	3	C, E
<i>Streptococcus</i> spp.		
<i>Perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos</i>	<i>nº de isolados</i>	<i>Amostras</i>
IMP	1	C
IMP - NOR - SXT	1	D

332 IMP (imipenem), SXT (sulfametoxazol/trimetoprim) e NOR (norfloxacina).

333

334

335

336

337

338

339

#### 340 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

341 As populações de *Enterobacterales* (BF) são frequentemente utilizadas como indicadoras de  
342 controlo de processos de higiene no processamento dos alimentos, enquanto que bactérias como  
343 *Escherichia coli* constituem um indicador de eleição de contaminação fecal ambiental (Santos *et al.*,  
344 2020). No presente estudo não foram identificadas bactérias da espécie *E. coli*, ao contrário do que já  
345 foi reportado anteriormente em saladas prontas a consumir em Portugal (Campos *et al.*, 2013). Algumas  
346 espécies identificadas neste estudo são microrganismos ambientais, alguns dos quais pertencentes à  
347 microbiota normal intestinal. Geralmente apresentam baixa patogenicidade, mas são também  
348 considerados potenciais agentes oportunistas, podendo causar infeções nosocomiais em populações  
349 mais vulneráveis (Schwaiger *et al.*, 2011b). As espécies encontradas, no entanto, não diferem muito  
350 das que são observadas em estudos prévios realizados em saladas e vegetais (Al-Kharousi *et al.*, 2019;  
351 Bezanson *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2013; Österblad *et al.*, 1999; Pesavento *et al.*, 2014; Salmanov  
352 *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2020) (Tabela suplementar 6).

353 Algumas das bactérias identificadas nestes ensaios fazem parte do grupo “ESKAPE”, um acrónimo  
354 que engloba seis espécies de bactérias, que incluem estirpes altamente virulentas e resistentes a  
355 antibióticos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter*  
356 *baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. Estas são responsáveis pela maioria das  
357 infeções hospitalares e são capazes de “escapar” à ação de grande parte dos antimicrobianos.  
358 Apresentam diversos mecanismos de resistências e são capazes de produzir biofilme que contribui  
359 para prevenir fisicamente a resposta imune do hospedeiro assim como a ação dos antimicrobianos  
360 (Mulani *et al.*, 2019).

361 A Organização Mundial da Saúde elaborou uma lista de antimicrobianos de importância crítica  
362 (CIA) que foram categorizados em três grupos com base na sua importância para a medicina humana.  
363 Esta lista é importante para auxiliar a gestão dos antimicrobianos, garantindo o seu uso criterioso na  
364 medicina humana e veterinária. Entre os antimicrobianos categorizados com importância crítica,  
365 analisados neste estudo, destacam-se as cefalosporinas de 3ª geração (CAZ), glicopeptídeos (TEC,  
366 VA), fluoroquinolonas (NOR, CIP), aminoglicosídeos (CN, S, AK, TOB), carbapenemos (IMP, ETP,  
367 MEM), glicilciclina (TGC), oxazolidinonas (LZD) e algumas penicilinas (AMP, TZP) (WHO, 2019).

368 Relativamente às resistências encontradas, 82% dos isolados de bacilos de gram-negativo  
369 exibiram resistência a pelo menos um antimicrobiano, valor semelhante ao encontrado por outros  
370 estudos em vegetais (Al-Kharousi *et al.*, 2019; Bezanson *et al.*, 2008).

371 Os resultados obtidos no presente estudo para os BF são similares aos obtidos por Al-Kharousi *et*  
372 *al.* (2019) em vegetais, com os 52% de resistência à AMP comparáveis aos 66% descritos no referido  
373 estudo, sendo ainda de destaque os valores semelhantes de resistência à FOX e a existência de 100%  
374 de suscetibilidade à CAZ. Num estudo anterior (Österblad *et al.*, 1999) foi evidenciada uma elevada  
375 suscetibilidade aos antimicrobianos testados em *Enterobacteriaceae* e uma percentagem de resistência

376 semelhante à apresentada para o cloranfenicol no presente estudo. A família *Enterobacteriaceae* é  
377 naturalmente suscetível aos antimicrobianos do grupo das fluoroquinolonas (Ruppé *et al.*, 2015), o que  
378 justifica a suscetibilidade ao antimicrobiano NOR encontrada neste ensaio. Um estudo realizado na  
379 Ucrânia obteve valores equiparáveis ao presente estudo no que concerne ao antimicrobiano AMP  
380 (52,1%) e na suscetibilidade ao MEM e ETP (Salmanov *et al.*, 2021).

381 Nos BNF destacam-se valores de 100% de resistência ao IMP, à CAZ, às penicilinas TZP, PRL e  
382 à CIP. Num estudo realizado por Bezanson *et al.* (2008) verificou-se também uma elevada resistência  
383 aos beta-lactâmicos (90%) e 17% de resistência a aminoglicosídeos, valores que são idênticos aos  
384 observados no presente estudo. Num estudo realizado na Jamaica, os autores identificaram isolados  
385 da espécie *Pseudomonas aeruginosa* com 100% de resistência a IMP conjuntamente com 79% de  
386 resistência a CAZ e 93% de resistência à CIP (Allydice-Francis & Brown, 2012) corroborando o presente  
387 estudo. As taxas de *P. aeruginosa* com resistência à CAZ e carbapenemos podem variar entres 20% a  
388 40% (Ruppé *et al.*, 2015), demonstrando que este perfil de resistências apresenta taxas relativamente  
389 elevadas. A CIP é um antimicrobiano amplamente utilizado contra *Pseudomonas aeruginosa*, contudo  
390 devido ao seu uso generalizado, o número de isolados resistentes tem vindo a aumentar, podendo esta  
391 resistência ser mediada pela aquisição de mutações em genes que codificam as proteínas alvo do  
392 antimicrobiano e pela presença de bombas de efluxo (Rehman *et al.*, 2019).

393 Nos bacilos de gram-negativo a resistência aos antimicrobianos pode ser intrínseca, contudo  
394 também pode ser causada por mutações genéticas, destacando-se os seguintes mecanismos:  
395 modificação do recetor alvo do antimicrobiano, inativação enzimática, bombas de efluxo e alterações  
396 de permeabilidade da membrana celular (Reygaert, 2018; Botelho *et al.*, 2019). De salientar que a  
397 aquisição de elementos genéticos móveis que são passíveis de transferir genes de resistências entre  
398 bactérias, tal como os que codificam beta-lactamases, é o principal mecanismo de resistência descrito  
399 na família *Enterobacteriaceae* (Reygaert, 2018; Ruppé *et al.*, 2015).

400 As bactérias do género *Enterococcus* spp. podem causar infeções nosocomiais salientando-se as  
401 infeções do trato urinário, bacteremia e endocardite, são naturalmente resistentes a cefalosporinas,  
402 aminoglicosídeos, polimixinas, lincomicinas, clindamicina e algumas quinolonas e podem adquirir  
403 resistências a outros antimicrobianos (Johnston & Jaykus, 2004; Pesavento *et al.*, 2014). São  
404 produtoras de biofilme e pertencem à microbiota comensal do trato gastrointestinal e também estão  
405 presentes no meio ambiente por contaminação fecal (Hashem *et al.*, 2017). A sua presença neste  
406 estudo indica uma possível contaminação fecal das *saladas prontas a consumir*. Neste estudo foram  
407 identificados 20 isolados de *Enterococcus* spp. que se encontravam presentes em quatro saladas  
408 (salada A, B, E e G) cujos perfis de suscetibilidade observados se encontram nos 100% para o IMP e  
409 de 18% em associação para o SXT.

410 O IMP não é o antimicrobiano de primeira linha a ser utilizado em infeções nas diversas espécies  
411 de *Enterococcus* spp. pois apresenta uma boa atividade antimicrobiana contra a espécie *Enterococcus*  
412 *faecalis* e baixa contra a espécie *Enterococcus faecium*. Normalmente está indicado em infeções intra-

413 abdominais e dermatológicas (Weinstein, 2001). A resistência ao IMP conjunta com a sensibilidade à  
414 AMP pode ser explicada por uma possível sobreexpressão de *Penicillin Binding Protein* (PBP) 5 ou PBP  
415 4 pela bactéria, uma vez que estas proteínas, ao contrário das PBP 1, 2, 3 e 6, apresentam menor  
416 afinidade para o imipenem, mas afinidade inalterada para a ampicilina, resultando numa atividade  
417 antimicrobiana inalterada deste último antimicrobiano, mas apresentando a bactéria resistência ao  
418 primeiro (Amin *et al.*, 2001; Ono *et al.*, 2005). A resistência de três isolados ao SXT pode ser explicada  
419 por uma resistência adquirida (Johnston & Jaykus, 2004; Pesavento *et al.*, 2014). Os restantes  
420 antimicrobianos testados apresentaram 100% de suscetibilidade, o que é semelhante à baixa  
421 percentagem de resistências obtidas em outros estudos (Campos *et al.*, 2013; Pesavento *et al.*, 2014)  
422 em *saladas prontas a consumir* e que difere de outros estudos (Boccella *et al.*, 2021) em que foram  
423 testados os isolados de amostras com origem hospitalar.

424 As bactérias do género *Streptococcus* do grupo D, como *Streptococcus bovis*, são bactérias  
425 comensais do trato gastrointestinal de ruminantes, podendo causar infeções graves como endocardite  
426 e bacteremia. Foram descritas taxas de resistência variáveis para clindamicina, eritromicina, tetraciclina  
427 e levofloxacina e suscetibilidade para a penicilina (Pompilio *et al.*, 2019). Neste caso a sua hipotética  
428 presença em saladas pode ser indicativo de uma possível contaminação fecal. No entanto, uma  
429 confirmação da identificação por sequenciação de DNA seria essencial para confirmar a espécie.

430 No que diz respeito às bactérias com perfil MDR, estas representaram 39% das bactérias isoladas  
431 no presente estudo, valor semelhante aos 40% encontrado noutra estudo que analisou alfaces  
432 (Bezanson *et al.*, 2008).

433 O isolado *Proteus vulgaris* com perfil MDR, faz parte de um género que possui vários fatores de  
434 virulência assim com uma grande capacidade de formar biofilmes, aumentando a sua permanência no  
435 meio ambiente e a capacidade de resistir aos antimicrobianos. São também microrganismos  
436 oportunistas causando sobretudo infeções nosocomiais, infeções do trato urinário e de feridas, e a sua  
437 presença pode apontar uma contaminação fecal, uma vez que o seu reservatório principal é o intestino  
438 (Drzewiecka, 2016). Um perfil MDR foi também reportado por Drzewiecka (2016) num estudo realizado  
439 em suínos.

440 Os isolados da espécie *Citrobacter braakii* podem estar naturalmente presentes na água, solo e no  
441 trato intestinal de animais e humanos, sendo também considerados microrganismos oportunistas pela  
442 capacidade de causar infeções como bacteremias e infeções do trato urinário (Liu *et al.*, 2017). Foi  
443 também reportado que o género *Citrobacter* apresenta resistências intrínsecas a beta-lactâmicos e a  
444 várias cefalosporinas, mas apresenta capacidade para adquirir vários genes de resistência a  
445 antimicrobianos, designadamente a resistência mediada por plasmídeos a aminoglicosídeos e  
446 quinolonas (Kus & Burrows, 2007).

447 Os isolados *Aeromonas hydrophila/cavie/sobria* são tipicamente encontradas em ambientes  
448 aquáticos sendo considerados agentes patogénicos em diversos hospedeiros incluindo o Homem.

449 Produzem diversos fatores de virulência e beta-lactamases, podendo provocar infecções como  
450 gastroenterite, septicemia e meningite (Stratev & Odeyemi, 2016). Podem adquirir resistências aos  
451 antimicrobianos e está descrita a resistência intrínseca a beta-lactâmicos e a glicopeptídeos (Nhinh *et*  
452 *al.*, 2021). Tal como o presente estudo, diversos estudos identificaram esta espécie como MDR,  
453 possivelmente associado ao uso excessivo de antimicrobianos em aquacultura (Stratev & Odeyemi,  
454 2016). O uso indevido de antimicrobianos é prática muitas vezes comum em sistemas de aquacultura  
455 o que pode promover o desenvolvimento de bactérias AMR (Nhinh *et al.*, 2021). Vários estudos  
456 compilados por Watts *et al.* (2017) relataram a existência de vários genes de resistência a  
457 antimicrobianos em sistemas de aquacultura.

458 Os isolados *Pseudomonas luteola* são igualmente agentes oportunistas também associados a  
459 septicemia, meningite, endocardite e peritonite (Chihab *et al.*, 2004). Está descrito que a família  
460 *Pseudomonadaceae* é frequentemente resistente a vários antimicrobianos e tem uma grande facilidade  
461 para adquirir resistências a antimicrobianos e de formar biofilme, sendo, portanto, um dos géneros mais  
462 frequentes em infecções nosocomiais (Bezanson *et al.*, 2008; Mielko *et al.*, 2019).

463 As bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* apresentam uma grande capacidade de se  
464 adaptar a diferentes meios e podem causar infecções em diversas espécies incluindo humanos. Podem  
465 produzir biofilme e apresentam uma elevada percentagem de resistências intrínsecas e adquiridas a  
466 vários antimicrobianos. Atualmente esta espécie encontra-se na categoria “Crítica”, de maior prioridade,  
467 na lista de agentes patogénicos prioritários da OMS para pesquisa e desenvolvimento de novos  
468 antimicrobianos (Tacconelli *et al.*, 2018). Esta espécie apresenta diversas resistências intrínsecas,  
469 incluindo as sulfonamidas, ampicilina, tetraciclina, cefalosporinas e cloranfenicol que pode ser conferida  
470 por vários mecanismos onde se destacam a baixa permeabilidade celular, bombas de efluxo e produção  
471 de beta-lactamases, contudo é capaz de adquirir resistência através de mutações cromossómicas  
472 assim como por aquisição horizontal de genes de resistência a antimicrobianos (Allydice-Francis &  
473 Brown, 2012; Botelho *et al.*, 2019; Reygaert, 2018).

474 Os carbapenemos são considerados pela OMS um grupo de antimicrobianos de importância crítica  
475 (CIA) uma vez que são reservados para o tratamento de infecções graves normalmente causadas por  
476 bactérias multirresistentes (EFSA, 2013; WHO, 2019). As carbapenemases são enzimas que por sua  
477 vez degradam carbapenemos, sendo adquiridas por via de transferência horizontal de genes. Em *P.*  
478 *aeruginosa* as carbapenemases mais frequentes são as metalo-beta-lactamases (MBL), isto é, beta-  
479 lactamases da classe B, como é o caso de *Verona Integron-encoded* (VIM), Imipenemase (IMP) e *New*  
480 *Delhi* (NDM). Podem também ser encontradas beta-lactamases da classe A como é o caso de *Klebsiella*  
481 *Pneumoniae Carbapenemase* (KPC) e *Guiana extended-spectrum* (GES) e mais raramente da Classe  
482 D como é o caso de Oxacilinase (OXA) (Yoon & Jeong, 2021). Num estudo anterior realizado em  
483 Portugal foram descritos 443 genomas de *P. aeruginosa* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) onde  
484 se verificou a presença de genes comuns codificantes a diversas carbapenemases (Botelho *et al.*,

485 2020) (Tabela Suplementar 7) demonstrando a existência destes genes que são passíveis de serem  
486 transferidos entre bactérias promovendo a sua disseminação.

487 Este estudo permite concluir que as saladas prontas a consumir poderão constituir um veículo de  
488 transmissão e disseminação de bactérias portadoras de resistência aos antimicrobianos, contribuindo  
489 para uma colonização da microbiota intestinal por bactérias MDR, o que configura sério risco em termos  
490 de segurança alimentar e, conseqüentemente, de saúde pública, pois não obstante o facto de muitos  
491 destes microrganismos serem consideradas oportunistas, foram observadas resistências a pelo menos  
492 um dos antimicrobianos testados, muitos dos quais pertencentes à lista de antimicrobianos de  
493 importância crítica (WHO, 2019).

494 É então importante que haja uma maior adoção de boas práticas agrícolas e de higiene para que  
495 a contaminação com bactérias e a disseminação de AMR seja minimizada de modo a que a qualidade  
496 e a segurança dos produtos sejam asseguradas, podendo também ser necessário novas estratégias  
497 de intervenção como uma maior fiscalização da correta lavagem dos legumes utilizados para as *saladas*  
498 *prontas a consumir* (Abadias *et al.*, 2008; Berger *et al.*, 2010).

499 Várias entidades nacionais e internacionais, como a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), a  
500 Direção Geral da Saúde (DGS) e a Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) apresentaram  
501 diversas medidas com o objetivo de promover o combate às resistências aos antimicrobianos. Alguns  
502 dos objetivos passam por uma maior vigilância epidemiológica e monitorização ambiental, apostar na  
503 educação e sensibilização da população, reduzir a incidência de infeção e otimizar o uso dos  
504 antimicrobianos, aumentar o investimento na investigação, novos medicamentos e ferramentas de  
505 diagnóstico e dar continuidade à implementação do conceito *One Health* (DGS *et al.*, 2019; EMA, 2022;  
506 Regulamento (UE) 2019/6).

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517 **5. AGRADECIMENTOS**

518

519 Passaram seis anos de tanto trabalho, resiliência e tantas horas de dedicação e como tal não  
520 podia deixar de agradecer à EUVG e a todos os professores, que passaram pelo meu percurso  
521 académico. Foi graças a todos eles, que me foram transmitidos os conhecimentos e aprendizagens  
522 essenciais para conclusão deste percurso e me tornaram numa pessoa tão dedicada e trabalhadora.

523 Manifesto um agradecimentos particular:

524 - à minha orientadora Professora Dra. Anabela Almeida por me ter orientado e ajudado em todos os  
525 imprevistos deste estágio curricular e por ter estado sempre disponível para me acompanhar na  
526 execução da dissertação, assim como por todo o apoio e paciência ao longo deste percurso;

527 - à minha orientadora externa Professora Dra. Eduarda Silveira por todas as horas no laboratório, pela  
528 transmissão de conhecimentos, pela motivação nas horas de maior desespero, pelos conselhos  
529 amigos, pela dedicação e preocupação, pela ajuda fundamental na execução deste projeto e pelo apoio  
530 à execução da dissertação;

531 - ao Professor Mestre Ricardo Cabeças pela disponibilidade e ajuda no tratamento estatístico dos  
532 resultados obtidos para a elaboração desta dissertação;

533 - à Escola Universitária Vasco da Gama pelo acolhimento durante o estágio curricular e pelo  
534 financiamento dos API 20E.

535 - ao laboratório INNO e em especial ao Dr. Augusto Silva e ao Dr. Ricardo Lopes por me terem acolhido  
536 de braços abertos e ao Dr. Filipe Sampaio por ter despertado em mim a paixão pela citologia;

537 - à Marine Kameneff pela amizade, pelas conversas, pela ajuda e pelas horas que passamos juntas no  
538 laboratório de Microbiologia da EUVG;

539 - à D. Paula Amaral, à Dra. Cátia Pires e à Dra. Joana Paiva por todo o apoio técnico prestado no  
540 laboratório de Microbiologia da EUVG;

541 - à Inês Roque por estes seis anos de amizade e companheirismo, pelas gargalhadas e pelas lágrimas,  
542 por ter sido aquela que ficou sempre ao meu lado. Às minhas meninas do “6 Years a Slave to Education”  
543 Inês, Beatriz, Alicia, Filipa e Bárbara pela amizade e entre ajuda, com vocês foi muito mais fácil;

544 - à minha família, em especial à minha mãe, por me ter proporcionado a oportunidade de fazer este  
545 curso e ter sido sempre o meu maior pilar; ao meu namorado Luís pela paciência, carinho, compreensão  
546 e pela ajuda em todos os momentos; à minha Yara por ter sido a minha principal motivação.

547 Esta conquista não foi somente minha, foi proporcionada pela intervenção ativa de quem fez  
548 parte do meu percurso académico e pessoal.

549           A todos os que direta ou indiretamente, cruzaram o meu caminho e me ajudaram a alcançar este  
550 objetivo e a crescer como pessoa, o meu eterno obrigada!

551 **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

552 Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh,  
 553 minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International*  
 554 *Journal of Food Microbiology*, 123(1–2), 121–129.  
 555 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013>

556 Al-Kharousi, Z. S., Guizani, N., Al-Sadi, A. M., & Al-Bulushi, I. M. (2019). Antibiotic resistance of  
 557 Enterobacteriaceae isolated from fresh fruits and vegetables and characterization of their AmpC  
 558 b-lactamases. *Journal of Food Protection*, 82(11), 1857–1863. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-089>

560 Allydice-Francis, K., & Brown, P. D. (2012). Diversity of antimicrobial resistance and virulence  
 561 determinants in pseudomonas aeruginosa associated with fresh vegetables. *International Journal*  
 562 *of Microbiology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/426241>

563 Althaus, D., Hofer, E., Corti, S., Julmi, A., & Stephan, R. (2012). Bacteriological survey of ready-to-eat  
 564 lettuce, fresh-cut fruit, and sprouts collected from the swiss market. *Journal of Food Protection*,  
 565 75(7), 1338–1341. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-022>

566 Amin, N. E. L., Lund, B., Tjernlund, A., Lundberg, C., Jalakas, K., & Wretling, B. (2001). Mechanisms of  
 567 resistance to imipenem in imipenem-resistant, ampicillin-sensitive Enterococcus faecium. *Apmis*,  
 568 109(11), 791–797. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2001.d01-148.x>

569 Araújo, S., A.T. Silva, I., Tacão, M., Patinha, C., Alves, A., & Henriques, I. (2017). Characterization of  
 570 antibiotic resistant and pathogenic Escherichia coli in irrigation water and vegetables in household  
 571 farms. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 192–200.  
 572 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.020>

573 Baloch, A. B., Yang, H., Feng, Y., Xi, M., Wu, Q., Yang, Q., Tang, J., He, X., Xiao, Y., & Xia, X. (2017).  
 574 Presence and antimicrobial resistance of Escherichia coli in ready-to-eat foods in Shaanxi, China.  
 575 *Journal of Food Protection*, 80(3), 420–424. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-175>

576 Berger, C. N., Sodha, S. v., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., & Frankel, G. (2010). Fresh  
 577 fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental*  
 578 *Microbiology*, 12(9), 2385–2397. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x>

579 Bezanson, G. S., MacInnis, R., Potter, G., & Hughes, T. (2008). Presence and potential for horizontal  
 580 transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables.  
 581 *International Journal of Food Microbiology*, 127(1–2), 37–42.  
 582 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.008>

583 Boccella, M., Santella, B., Pagliano, P., de Filippis, A., Casolaro, V., Galdiero, M., Borrelli, A., Capunzo,  
 584 M., Boccia, G., & Franci, G. (2021). Prevalence and antimicrobial resistance of enterococcus  
 585 species: A retrospective cohort study in Italy. *Antibiotics*, 10(12), 1–9.  
 586 <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121552>

587 Botelho, J., Grosso, F., & Peixe, L. (2019). Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa –  
 588 Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*, 44(July), 100640.  
 589 <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.07.002>

590 Botelho, J., Mourão, J., Roberts, A. P., & Peixe, L. (2020). Comprehensive genome data analysis  
 591 establishes a triple whammy of carbapenemases, ICEs and multiple clinically relevant bacteria.  
 592 *Microbial Genomics*, 6(10), 1–10. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000424>

593 Brandão, M. L. L., Almeida, D. O., Bispo, F. C. P., Bricio, S. M. L., Marin, V. A., & Miagostovich, M. P.  
 594 (2014). Assessment of Microbiological Contamination of Fresh, Minimally Processed, and Ready-

- 595 to-Eat Lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. *Journal of Food Science*, 79(5).  
596 <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12459>
- 597 Campos, J., Mourão, J., Pestana, N., Peixe, L., Novais, C., & Antunes, P. (2013). Microbiological quality  
598 of ready-to-eat salads: An underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic  
599 resistance genes. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 464–470.  
600 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.005>
- 601 Chihab, W., Alaoui, A. S., & Amar, M. (2004). *Chryseomonas luteola* Identified as the Source of Serious  
602 Infections in a Moroccan University Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1837–1839.  
603 <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1837-1839.2004>
- 604 Da Silva, S. F., Reis, I. B., Monteiro, M. G., Dias, V. C., Machado, A. B. F., da Silva, V. L., & Diniz, C.  
605 G. (2021). Influence of human eating habits on antimicrobial resistance phenomenon: Aspects of  
606 clinical resistome of gut microbiota in omnivores, ovolactovegetarians, and strict vegetarians.  
607 *Antibiotics*, 10(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030276>
- 608 Direção Geral da Saúde, Direção Geral de Alimentação e Veterinária, Agência Portuguesa do Ambiente  
609 (2019). Plano Nacional de Combate à Resistência aos Antimicrobianos 2019-2023. Direção Geral  
610 de Saúde, 1–25. [https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/plano-nacional-de-combate-a-  
611 resistencia-aos-antimicrobianos-2019-2023.aspx](https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/plano-nacional-de-combate-a-resistencia-aos-antimicrobianos-2019-2023.aspx)
- 612 Drzewiecka, D. (2016). Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments.  
613 *Microbial Ecology*, 72(4), 741–758. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0720-6>
- 614 EFSA. (2013). Scientific Opinion on Carbapenem resistance in food animal ecosystems. *EFSA Journal*,  
615 11(12), 1–70. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3501>
- 616 EUCAST (2022). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables  
617 for interpretation of MICs and zone diameters, version 12.0, 2022  
618 [https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
- 619 Gross, K. C., Houghton, M. P., & Senterfit, L. B. (1975). Presumptive speciation of *Streptococcus bovis*  
620 and other group D streptococci from human sources by using arginine and pyruvate tests. *Journal*  
621 *of Clinical Microbiology*, 1(1), 54–60. <https://doi.org/10.1128/jcm.1.1.54-60.1975>
- 622 Hashem, Y. A., Amin, H. M., Essam, T. M., Yassin, A. S., & Aziz, R. K. (2017). Biofilm formation in  
623 enterococci: Genotype-phenotype correlations and inhibition by vancomycin. *Scientific Reports*,  
624 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05901-0>
- 625 European Medicines Agency. (2022). European Veterinary Big Data strategy 2022- 2027. 1–16.  
626 <https://www.ema.europa.eu/en/news/big-data-strategy-veterinary-medicines-eu>
- 627 Johnston, L. M., & Jaykus, L. A. (2004). Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from  
628 produce. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 3133–3137.  
629 <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.3133-3137.2004>
- 630 Jung, Y., Jang, H., & Matthews, K. R. (2014). Effect of the food production chain from farm practices to  
631 vegetable processing on outbreak incidence. *Microbial Biotechnology*, 7(6), 517–527.  
632 <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12178>
- 633 King, S., & Metzger, W. I. (1968). A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. I. hektoen  
634 enteric agar. *Applied Microbiology*, 16(4), 577–578. [https://doi.org/10.1128/aem.16.4.577-  
635 578.1968](https://doi.org/10.1128/aem.16.4.577-578.1968)
- 636 Kus, J. v., & Burrows, L. L. (2007). Infections due to citrobacter and enterobacter. *XPharm: The*  
637 *Comprehensive Pharmacology Reference*, 1998, 1–12. [https://doi.org/10.1016/B978-008055232-  
638 3.60868-2](https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60868-2)

- 639 Liu, L., Lan, R., Liu, L., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, Y., & Xu, J. (2017). Antimicrobial resistance and  
640 cytotoxicity of *Citrobacter* spp. in Maanshan Anhui Province, China. *Frontiers in Microbiology*,  
641 8(JUL), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01357>
- 642 Mielko, K. A., Jabłoński, S. J., Milczewska, J., Sands, D., Łukaszewicz, M., & Młynarz, P. (2019).  
643 Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World Journal of Microbiology and*  
644 *Biotechnology*, 35(11), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2739-1>
- 645 Mritunjay, S. K., & Kumar, V. (2017a). A study on prevalence of microbial contamination on the surface  
646 of raw salad vegetables. *3 Biotech*, 7(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0585-5>
- 647 Mritunjay, S. K., & Kumar, V. (2017b). Microbial quality, safety, and pathogen detection by using  
648 quantitative PCR of raw salad vegetables sold in Dhanbad City, India. *Journal of Food Protection*,  
649 80(1), 121–126. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-223>
- 650 Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies  
651 to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in*  
652 *Microbiology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
- 653 Ninh, D. T., Le, D. V., Van, K. van, Giang, N. T. H., Dang, L. T., & Hoai, T. D. (2021). Prevalence,  
654 virulence gene distribution and alarming the multidrug resistance of *aeromonas hydrophila*  
655 associated with disease outbreaks in freshwater aquaculture. *Antibiotics*, 10(5).  
656 <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050532>
- 657 Novais, C., Coque, T. M., Costa, M. J., Sousa, J. C., Baquero, F., & Peixe, L. v. (2005). High occurrence  
658 and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. *Journal of*  
659 *Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), 1139–1143. <https://doi.org/10.1093/jac/dki360>
- 660 Novais, C., Freitas, A. R., Silveira, E., Antunes, P., Silva, R., Coque, T. M., & Peixe, L. (2013). Spread  
661 of multidrug-resistant enterococcus to animals and humans: An underestimated role for the pig  
662 farm environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(12), 2746–2754.  
663 <https://doi.org/10.1093/jac/dkt289>
- 664 O'Neill, J. (2014). *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The*  
665 *Review on Antimicrobial Resistance Chaired. December.* <http://amr-review.org/>
- 666 Ono, S., Muratani, T., & Matsumoto, T. (2005). Mechanisms of resistance to imipenem and ampicillin in  
667 *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2954–2958.  
668 <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2954-2958.2005>
- 669 Österblad, M., Pensala, O., Peterzéns, M., Heleniusc, H., & Huovinen, P. (1999). Antimicrobial  
670 susceptibility of Enterobacteriaceae isolated from vegetables. *Journal of Antimicrobial*  
671 *Chemotherapy*, 43(4), 503–509. <https://doi.org/10.1093/jac/43.4.503>
- 672 Pesavento, G., Calonico, C., Ducci, B., Magnanini, A., & lo Nostro, A. (2014). Prevalence and antibiotic  
673 resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw  
674 meat. *Food Microbiology*, 41, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.008>
- 675 Pompilio, A., di Bonaventura, G., & Gherardi, G. (2019). An overview on streptococcus  
676 *bovis/streptococcus equinus* complex isolates: Identification to the species/subspecies level and  
677 antibiotic resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3).  
678 <https://doi.org/10.3390/ijms20030480>
- 679 Regulamento CE nº2073/2005. Regulamento (CE) Nº 2073/2005 - Critérios microbiológicos aplicáveis  
680 aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial Da União Europeia*, L 338, 1–26.
- 681 Regulamento (UE) 2019/6 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 11 de dezembro de 2018, relativo  
682 aos medicamentos veterinários e que revoga a Diretiva 2001/82/CE. (2019). *Jornal Oficial Da*  
683 *União Europeia*, L 4/43, 1-125.

- 684 Rehman, A., Patrick, W. M., & Lamont, I. L. (2019). Mechanisms of ciprofloxacin resistance in  
685 *Pseudomonas aeruginosa*: New approaches to an old problem. *Journal of Medical Microbiology*,  
686 68(1), 1–10. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000873>
- 687 Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS*  
688 *Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- 689 Ruppé, É., Woerther, P. L., & Barbier, F. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-  
690 negative bacilli. *Annals of Intensive Care*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s13613-015-0061-0>
- 691 Salmanov, A. G., Ushkalov, V. O., Shunko, Y. Y., Piven, N., Vygovska, L. M., Verner, O. M., &  
692 Kushnirenko, S. (2021). One Health: Antibiotic-Resistant Bacteria Contamination in Fresh  
693 Vegetables Sold At a Retail Markets in Kyiv, Ukraine. *Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland :  
694 1960)*, 74(1), 83–89. <https://doi.org/10.36740/wiek202101116>
- 695 Santos, T. S., Campos, F. B., Padovani, N. F. A., Dias, M., Mendes, M. A., & Maffei, D. F. (2020).  
696 Assessment of the microbiological quality and safety of minimally processed vegetables sold in  
697 Piracicaba, SP, Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, 71(2), 187–194.  
698 <https://doi.org/10.1111/lam.13305>
- 699 Schwaiger, K., Helmke, K., Hölzel, C. S., & Bauer, J. (2011a). Antibiotic resistance in bacteria isolated  
700 from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *International Journal*  
701 *of Food Microbiology*, 148(3), 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.001>
- 702 Schwaiger, K., Helmke, K., Hölzel, C. S., & Bauer, J. (2011b). Comparative analysis of the bacterial  
703 flora of vegetables collected directly from farms and from supermarkets in Germany. *International*  
704 *Journal of Environmental Health Research*, 21(3), 161–172.  
705 <https://doi.org/10.1080/09603123.2010.515672>
- 706 Slanetz, L. W., & Bartley, C. H. (1957). Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined  
707 by the membrane filter technique with an improved medium. *Journal of Bacteriology*, 74(5), 591–  
708 595. <https://doi.org/10.1128/jb.74.5.591-595.1957>
- 709 Stratev, D., & Odeyemi, O. A. (2016). Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from  
710 different food sources: A mini-review. *Journal of Infection and Public Health*, 9(5), 535–544.  
711 <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.10.006>
- 712 Taban, B. M., Aytac, S. A., Akkoc, N., & Akcelik, M. (2013). Characterization of antibiotic resistance in  
713 *Salmonella enterica* isolates determined from ready-to-eat (RTE) salad vegetables. *Brazilian*  
714 *Journal of Microbiology*, 44(2), 385–391. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000047>
- 715 Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C.,  
716 Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox,  
717 E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery,  
718 research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria  
719 and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- 721 Watts, J. E. M., Schreier, H. J., Lanska, L., & Hale, M. S. (2017). The rising tide of antimicrobial  
722 resistance in aquaculture: Sources, sinks and solutions. *Marine Drugs*, 15(6), 1–16.  
723 <https://doi.org/10.3390/md15060158>
- 724 Weinstein, M. P. (2001). Comparative evaluation of penicillin, ampicillin, and imipenem MICs and  
725 susceptibility breakpoints for vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus*  
726 *faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7), 2729–2731.  
727 <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2729-2731.2001>

728 World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health  
729 Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>

730 World Health Organization (2019). WHO list of critically important antimicrobials for human medicine  
731 (WHO CIA list). World Health Organization.  
732 <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528>

733 Yoon, E. J., & Jeong, S. H. (2021). Mobile Carbapenemase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*.  
734 *Frontiers in Microbiology*, 12(February). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.614058>

735 Zhou, S. Y. D., Wei, M. Y., Giles, M., Neilson, R., Zheng, F., Zhang, Q., Zhu, Y. G., & Yang, X. R. (2020).  
736 Prevalence of Antibiotic Resistome in Ready-to-Eat Salad. *Frontiers in Public Health*, 8(March),  
737 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00092>

738

## **ANEXO I. TABELAS SUPLEMENTARES**

**Tabela Suplementar 1** - Número de isolados bacilos de gram-negativo resistentes aos antimicrobianos nos diferentes subgrupos BF e BNF.

Bacilos de gram-negativo	n	Antibióticos															
		AMP	PRL	TZP	CAZ	FOX	ETP	MEM	IMP	NOR	CIP	AK	TOB	CN	C	TGC	SXT
BF	29	16/29	3/29	1/29	1/29	4/29	0/29	0/29	1/29	0/29	4/29	0/29	1/29	2/29	2/29	0/29	0/29
BNF	26	NA	26/26	26/26	26/26	NA	NA	5/26	26/26	NA	26/26	0/26	4/26	NA	NA	NA	NA
Total	55	16/29	29/55	27/55	27/55	4/29	0/29	5/55	27/55	0/29	30/55	0/55	5/55	2/29	2/29	0/29	0/29

AMP (ampicilina), PRL (piperacilina), TZP (piperacilina + tazobactam), CAZ (ceftazidima), FOX (cefoxitina), ETP (ertapenem), MEM (meropenem), IMP (imipenem), NOR (norfloxacina), CIP (ciprofloxacina), AK (amicacina), TOB (tobramicina), CN (gentamicina), C (cloranfenicol), TGC (tigeciclina) e SXT (sulfametoxazol/trimetoprim), BF (bacilos fermentativos), BNF (bacilos não fermentativos), NA (Não aplicável).

**Tabela Suplementar 2** - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana nos bacilos de gram-negativos em bacilos não fermentadores e bacilos fermentadores por amostra.

Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos	
BNF	BF
<i>Amostra / Antimicrobianos</i>	<i>Amostra / Antimicrobianos</i>
A.1 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	A.10 AMP
A.2 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	B.1 AMP - CIP
A.3 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	B.4 AMP - FOX
A.4 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	B.5 AMP - FOX
A.5 PRL - TZP - CAZ - IMP - MEM - CIP	B.6 AMP
A.6 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	B.9 AMP - FOX - C
B.2 PRL - TZP - CAZ - IMP - MEM - CIP	C.2 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP
B.3 PRL - TZP - CAZ - IMP - MEM - CIP	D.3 CN
B.7 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	D.5 AMP - FOX
B.8 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	E.1 AMP - TOB - CN - C
B.10 PRL - TZP - CAZ - IMP - MEM - CIP	E.2 AMP
D.1 PRL - TZP - CAZ - IMP - TOB - CIP	E.4 CIP
D.2 PRL - TZP - CAZ - IMP - MEM - CIP	E.5 CIP
D.4 PRL - TZP - CAZ - IMP - TOB - CIP	F.1 AMP
F.3 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	F.2 AMP
F.4 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	F.5 AMP
F.6 PRL - TZP - CAZ - IMP - TOB - CIP	F.11 AMP
F.7 PRL - TZP - CAZ - IMP - TOB - CIP	F.12 AMP - PRL
F.8 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	G.1 AMP - PRL
F.9 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	
F.10 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	
G.3 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	
G.4 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	
G.5 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	
G.8 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	
G.9 PRL - TZP - CAZ - IMP - CIP	

AMP (ampicilina), TGC (tigeciclina), SXT (sulfametoxazol/trimetoprim), CAZ (ceftazidima), FOX (cefotaxima), TOB (tobramicina), C (cloranfenicol), IMP (imipenem), CN (gentamicina), PRL (piperacilina), TZP (piperacilina + tazobactam), ETP (ertapenem), MEM (meropenem), CIP (ciprofloxacina), BNF (bacilos não fermentadores), BF (bacilos fermentadores).

**Tabela Suplementar 3** - Número de isolados de cocos de gram-positivo (*Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp.) resistentes aos antimicrobianos.

Cocos de Gram-positivo	n	AMP	IMP	NOR	Antibióticos							
					CIP	TEC	VA	CN	S	TGC	SXT	
<i>Enterococcus</i> spp.	20	0/20	20/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	3/20
<i>Streptococcus</i> spp.	2	0/2	2/2	1/2	NA	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2
Total	22	0/22	22/22	1/22	0/20	0/22	0/22	0/22	0/22	0/22	0/22	4/22

AMP (ampicilina), IMP (imipenem), NOR (norfloxacina), CIP (ciprofloxacina), TEC (Teicoplanina), VA (vancomicina), CN (Gentamicina), S (Estreptomicina), TGC (tigeciclina), SXT (sulfametoxazol/trimetoprim), NA (Não aplicável).

**Tabela Suplementar 4** - Perfil de suscetibilidade antimicrobiana em cocos de gram-positivo aos antimicrobianos por amostra.

Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos					
<i>Enterococcus</i> spp.				<i>Streptococcus</i> spp.	
Amostra / Antibióticos		Amostra / Antibióticos		Amostra / Antibióticos	
A.E.1	IMP	C.E.1	IMP	C.E.5	IMP
A.E.2	IMP	C.E.2	IMP	D.E.1	IMP - NOR - SXT
A.E.3	IMP	C.E.3	IMP		
A.E.4	IMP	C.E.4	IMP - SXT		
A.E.5	IMP	C.E.6	IMP		
B.E.1	IMP	C.E.7	IMP - SXT		
B.E.2	IMP	E.E.1	IMP		
B.E.3	IMP	E.E.2	IMP		
B.E.4	IMP	E.E.3	IMP - SXT		
B.E.5	IMP	E.E.4	IMP		

IMP (imipenem), SXT (sulfametoxazol/trimetoprim) e NOR (norfloxacina).

**Tabela Suplementar 5** - Espécies gram-negativas identificadas através do API 20E com respetiva percentagem de identificação e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.

Amostra	Espécie	Identificação (%)
A.10	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Pneumoniae</i>	98,9%
B.4	<i>Enterobacter cloacae</i>	93,6%
B.5	<i>Enterobacter cloacae</i>	91,4%
B.6	<i>Hafnia alvei</i>	99,9%
B.9	<i>Citrobacter braakii</i>	99,9%
C.2	<i>Pseudomonas luteola</i>	92,1%
D.1	<i>Aeromonas hydrophila/cavie/sobria 1</i>	95,5%
D.5	<i>Enterobacter cloacae</i>	91,4%
E.1	<i>Proteus vulgaris</i>	98,7%
E.2	<i>Providencia rettgeri</i>	97,8%
F.2	<i>Enterobacter cloacae</i>	95,6%
F.12	<i>Enterobacter cloacae</i>	97,7%
G.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98,6%
G.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98,6%
G.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,7%

AMP (ampicilina), FOX (cefotaxima), C (cloranfenicol), CAZ (ceftazidima), IMP (imipenem), CN (gentamicina), PRL (piperacilina), TZP (piperacilina + tazobactam), TOB (tobramicina) e CIP (ciprofloxacina).

**Tabela Suplementar 6** - Sistematização de estudos prévios realizados no mesmo âmbito do presente.

Estudo	País do estudo	Amostras (n); Origem	Isolados (n)	Espécies encontradas	Porcentagem de isolados portadores de perfis de resistência	Autor/Ano
1	Finlândia	Vegetais (137); Supermercados	536	<i>Cedecea davisae</i> ; <i>Citrobacter spp.</i> ; <i>Enterobacter spp.</i> ; <i>Escherichia spp.</i> ; <i>Hafnia alvei</i> ; <i>Klebsiella spp.</i> ; <i>Kluyvera spp.</i> ; <i>Leclercia adecarboxylata</i> ; <i>Rahnella aquatilis</i> ; <i>Serratia spp.</i>	TMP (0,2%), SMZ (1,3%), TET (5,5%), C (12%) e CXM (14%). Sem resistências aos antimicrobianos CTX, ATM, IMP, CN, NAL e CIP.	Österblad et al., 1999
2	Canadá	Vegetais (52); Comércio de retalho	205	<i>Pseudomonas fluorescens/putida complex</i> ; <i>Sphingobacterium spp.</i> ; <i>Acinetobacter baumannii</i> .	AMP (93,5%), KF (90,0%), C (35,7%), S (10,0%), NAL (4,2%), KAN (4,2%), CAZ (3%) e CN (2,8%).	Bezanson et al., 2008
3	Jamaica	Vegetais (95); Supermercados	91	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Escherichia coli</i>	IMP (100%), AMP (100%), CN (97%), CIP (93%), CAZ (79%), C (84%), SXT (83%), ATM (41%) e TET (29%).	Allydice-Francis & Brown, 2012
4	Portugal	Saladas prontas a consumir (50); Supermercados	108	<i>E.coli</i> ; <i>Rahnella aquatilis</i> ; <i>Citrobacter freundii complex</i> ; <i>Raoultella terrigena</i> ; <i>Hafnia alvei</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Enterobacter aerogenes</i> ; <i>Cronobacter sakazakii</i> ; <i>Enterococcus spp.</i>	Genes de resistência para beta-lactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim, estreptomicina, sulfonamidas e quinolonas.	Campos et al., 2013
5	Omã	Vegetais e frutas (105); Mercados locais	88	<i>Serratia spp.</i> ; <i>Raoultella planticola</i> ; <i>Rahnella aquatilis</i> ; <i>Pseudocitrobacter carotovorum</i> ; <i>Pantoea spp.</i> ; <i>Kluyvera intermedia</i> ; <i>Klebsiella spp.</i> ; <i>Escherichia spp.</i> ; <i>Erwinia spp.</i> ; <i>Enterobacter spp.</i> ; <i>Citrobacter freundii</i>	AMP (66%), KF (57%), AM-CL (33%), FOX (31%), TET (9%), NAL (7%), TMP (6%) e KAN (5%). Sem resistências à CAZ, ATM e CTX.	Al-Kharousi et al., 2019
6	China	Saladas pronta a consumir (10); Restaurantes	N.A.	<i>Pseudomonas</i> ; <i>Acinetobacter</i> ; <i>Exiguobacterium</i> ; <i>Weissella</i> ; <i>Enterobacter</i> ; <i>Leuconostoc</i> ; <i>Pantoea</i> ; <i>Serratia</i> ; <i>Erwinia</i> ; <i>Ewingella</i> .	Genes de resistência para aminoglicosídeos, beta lactâmicos, cloranfenicol, sulfonamida, tetraciclina, vancomicina, macrolídeo, lincosamidas e estreptogramina B.	Zhou et al., 2020
7	Ucrânia	Vegetais (13.694); Comércio de retalho	8179	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Enterobacter spp.</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>E. faecium</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Enterobacter spp.</i> : SAM (61.9%), AM-CL (60.2%), CIP (47.8%), CLI (52.2%), AMP (52.1%), AK (43.8%), CN (43.5%), CPZ (41.3%) e CRO (34.1%). Sem resistências à CFPM, MEM, IMP e ETP. <i>Klebsiella pneumoniae</i> : AMP (51.5%), AM-CL (41.4%), OFX (33.1%) e CIP (29.7%). Sem resistências à TZP e ETP. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : carbapenemos (35,3%).	Salmanov et al., 2021

TMP (trimetoprim), SMZ (sulfametoxazol), TET (tetraciclina), C (cloranfenicol), CXM (cefuroxima), CTX (cefotaxima), ATM (aztreonam), IMP (imipenem), CN (gentamicina), NAL (ácido nalidíxico), CIP (ciprofloxacina), AMP (ampicilina), KF (cefalotina), S (estreptomicina), KAN (canamicina), CAZ (ceftazidima), SXT (sulfametoxazol/trimetoprim), AM-CL (amoxicilina-ácido clavulânico), FOX (cefoxitina), SAM (ampicilina/sulbactam), CLI (clindamicina), AK (amicacina), CPZ (cefoperazona), CRO (ceftriaxona), CFPM (cefepima), MEM (meropenem), ETP (ertapenem), OFX (ofloxacina), TZP (piperacilina + tazobactam), NA (Não aplicável).

**Tabela Suplementar 7** - Número e classe de genes codificantes de carbapenemases presentes em *Pseudomonas aeruginosa* de acordo com o *GenBank* (NCBI). Adaptado de Botelho et al. (2020).

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>										
Genes codificantes de carbapenemases	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	<i>bla<sub>IMP</sub></i>	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	<i>bla<sub>GES</sub></i>	<i>bla<sub>SPM</sub></i>	<i>bla<sub>DIM</sub></i>	<i>bla<sub>FIM</sub></i>	<i>bla<sub>AFM</sub></i>	<i>bla<sub>GIM</sub></i>
Número de genomas (NCBI)	242	84	29	13	32	32	7	2	1	1
Classe/Subclasse	B1	B1	B1	A	A	B1	B1	B1	B1	B1

*bla<sub>VIM</sub>* (Verona Integron-Encoded Metallo-Beta-Lactamase); *bla<sub>IMP</sub>* (Imipenemase-type metallo-beta-lactamase); *bla<sub>NDM</sub>* (New Delhi metallo-beta-lactamase); *bla<sub>KPC</sub>* (Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase); *bla<sub>GES</sub>* (Guiana Extended-Spectrum beta-lactamase); *bla<sub>SPM</sub>* (São Paulo metallo-beta-lactamase); *bla<sub>DIM</sub>* (Dutch imipenemase); *bla<sub>FIM</sub>* (Florence imipenemase); *bla<sub>AFM</sub>* (Alcaligenes faecalis metallo-beta-lactamase); *bla<sub>GIM</sub>* (German imipenemase).

## **ANEXO II. CASUÍSTICA**



## REGISTO DE CASUÍSTICA

<b>Nome aluno (a):</b>	Inês Marques dos Santos
<b>Local (ais) de estágio :</b>	Laboratório veterinário INNO Laboratório de microbiologia da Escola Universitária Vasco da Gama
<b>Período estágio :</b>	04 /10/2021 a 31 / 03 /2022
<b>Breve contextualização do EC:</b>	O estágio curricular foi realizado na área de práticas laboratoriais em dois locais diferentes nomeadamente no laboratório veterinário INNO localizado em Braga, com uma duração de 2 meses e no laboratório de microbiologia localizado na EUVG, com duração de 4 meses.

Atividades desenvolvidas no laboratório INNO		TOTAL
1.	Realização e interpretação de hemogramas	375
1.1	Realização e interpretação de esfregaços sanguíneos	317
2.	Visualização e interpretação de citologias	222
2.1	Imunocitoquímicas	8
2.2	Estudos de efusão	20
3.	Visualização e interpretação de urinálises	65
3.1	Análise de sedimento urinário	5
4.	Visualização e interpretação de testes de coprologia	9
5.	Visualização e interpretação de testes de imunofluorescência indireta	12
6.	Visualização e interpretação de testes ELISA	116
<b>TOTAL</b>		<b>1149</b>

Atividades desenvolvidas no laboratório de microbiologia da EUVG		TOTAL
1.	Preparação de meios de cultura	28
2.	Repicagem de isolados de bactérias	388
3.	Realização e interpretação de antibiogramas	194
4.	Realização e identificação de bactérias por API 20E	32
<b>TOTAL</b>		<b>642</b>