

Caracterização genotípica e fenotípica de estirpes de *Escherichia coli* patogénicas, *Salmonella spp.* e *Campylobacter spp.* isoladas de aves em liberdade em Portugal continental

Genotypic and phenotypic characterization of pathogenic Escherichia coli, Salmonella spp. and Campylobacter spp. in free-living birds in mainland Portugal

Rita Batista¹, Margarida Saraiva², Teresa Lopes², Leonor Silveira³, Anabela Coelho⁴, Rosália Furtado⁴, Rita Castro³, Cristina Belo Correia⁴, David Rodrigues^{5,6}, Pedro Henriques^{5,7}, Sara Lóio⁸, Vanessa Soeiro⁸, Paulo Martins da Costa⁹, Mónica Oleastro³, Ângela Pista³

rita.batista@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Laboratório de Microbiologia, Unidade de Referência. Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

(3) Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(4) Laboratório de Microbiologia, Unidade de Referência. Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(5) Escola Superior Agrária de Coimbra- Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra, Portugal

(6) Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal

(7) Espaço de Visitação e Observação de Aves, Vila Franca de Xira, Portugal

(8) Centro de Recuperação de Fauna do Parque Biológico de Gaia, Vila Nova de Gaia, Portugal

(9) Laboratório de Microbiologia, Departamento de Produção Aquática. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, Portugal

Resumo

As aves são potenciais portadoras de microrganismos patogénicos que afetam os seres humanos, e podem ser disseminadoras de perigos no ambiente de produção primária de géneros alimentícios de origem vegetal e animal.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência, em fezes de aves em liberdade, em Portugal, de três bactérias zoonóticas causadoras de infeções no Homem. Para tal, foi avaliada a presença de *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella spp.* e *Campylobacter spp.* em 108 amostras individuais de fezes de aves e em uma amostra em *pool* de 50 amostras de fezes de galvotas.

Foi efetuada a caracterização fenotípica dos isolados (serotipagem e perfis de resistência a antibióticos) e detetados genes específicos associados à patogenicidade e à resistência a antimicrobianos, por PCR e/ou sequenciação total do genoma (WGS).

Isolados de *E. coli* patogénicos, *Salmonella spp.* e *Campylobacter spp.* foram detetados em 8,9%, 2,8% e 9,9% das amostras, respetivamente. A resistência a antimicrobianos foi testada em 54 isolados de *E. coli*, tendo sido detetada em 14 (25,9%). Onze destes isolados revelaram a presença de fatores de virulência, *E. coli* patogénicos. Dez dos isolados de *E. coli* revelaram ser resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDR) e sete eram produtores de β -lactamases de espectro alargado (ESBL). Relativamente aos isolados de *Salmonella spp.* (n=3) e *Campylobacter spp.* (n=9), apenas uma estirpe de *Campylobacter jejuni* foi identificada como MDR. A maioria dos serotipos e/ou Sequence Types (ST) identificados já tinham sido referenciados como associados a doença humana.

Estes resultados mostram que as aves que fazem parte da fauna portuguesa podem ser portadoras de bactérias patogénicas capazes de causar doença humana, algumas delas resistentes a antimicrobianos críticos.

Abstract

Birds are potential carriers of pathogens that affect humans and that may be spread in the primary production environment of foodstuffs of plant and animal origin.

Aiming to evaluate the occurrence of three important bacteria that may cause human disease, in free-living birds, in Portugal, we investigated 108 individual faecal samples from free-living birds and one pooled sample of gull faeces (n=50) for the presence of *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella spp.* and *Campylobacter spp.*

Virulence and antimicrobial resistance (AMR) genes were detected by PCR and/or Whole Genome Sequencing (WGS), and phenotypic (serotyping and AMR profiles) characterization was performed.

Overall, 8.9% of samples tested positive for pathogenic *E. coli*, 2.8% for *Salmonella spp.*, and 9.9% for *Campylobacter spp.* AMR was performed on 54 *E. coli* isolates being detected in 14 (25.9%) of them. Eleven of the AMR *E. coli* isolates contained several virulence factors, pathogenic *E. coli*. Ten of the tested *E. coli* isolates were multidrug resistant (MDR), and seven of them were Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producers. Among *Salmonella spp.* (n=3) and *Campylobacter spp.* (n=9), only one strain of *Campylobacter jejuni* was identified as MDR. Most of the identified serotypes/sequence types (ST) had already been associated with human disease.

These results show that free-living birds in Portugal may act as carriers of foodborne pathogens linked to human disease, some of them resistant to critically important antimicrobials.

_Introdução

Aproximadamente 60% de todas as doenças infecciosas humanas, e cerca de 75% das emergentes, são de origem zoonótica (1). A interação dinâmica entre seres humanos, animais e microrganismos, torna a abordagem *One Health* (uma só saúde) essencial para a identificação e controlo de doenças bacterianas zoonóticas emergentes (2). Em 2021, a campilobacteriose, a salmonelose e as infeções causadas por *E. coli* produtora de toxina *Shiga* (STEC) estavam entre as quatro principais zoonoses mais reportadas em humanos (95% de todos os casos), envolvendo mais de 23000 hospitalizações (3). As aves em liberdade podem ser reservatórios e/ou vetores destas bactérias patogénicas assim como dos seus genes de resistência a antimicrobianos (4-6). Muitas espécies de aves adaptaram-se com sucesso a ambientes dominados pelo Homem, entrando regularmente em contacto com explorações agrícolas, cursos de água, animais que se destinam à produção alimentar, animais domésticos e pessoas (7). Para além disso, muitas são migratórias, o que também pode contribuir para a ampla disseminação de microrganismos patogénicos (8,9). A informação sobre a ocorrência e caracterização de bactérias zoonóticas isoladas de aves em liberdade, na Europa, é escassa (10-18). Esta informação é ainda mais limitada se nos focarmos em Portugal (19-22).

_Objetivos

Este estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de estirpes de *E. coli* patogénicas, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp em amostras fecais de aves em liberdade, de diferentes regiões de Portugal continental. Adicionalmente, foram identificados os serotipos, os *Sequence types* (ST), os genes de patogenicidade, bem como os genes de resistência a antimicrobianos dos isolados de interesse. Considerando que as aves em liberdade podem ser reservatórios de bactérias contendo genes de resistência a antimicrobianos e potencialmente responsáveis pela ocorrência de ligações epidemiológicas entre bactérias isoladas de humanos, animais e ambiente, foi também determinado o perfil de resistência a antimicrobianos da maioria dos isolados de *E. coli* não patogénicos.

_Materiais e métodos

Populações estudadas e colheita de amostras

Este trabalho abrangeu três áreas geográficas distintas, uma no distrito de Lisboa (EVOA- Espaço de Visitação e Observação de Aves) e duas no norte de Portugal (Parque Biológico de Gaia e região da praia de Matosinhos).

Foram colhidas 108 amostras individuais de fezes frescas de aves em liberdade, correspondentes a 31 espécies diferentes. Adicionalmente, foi incluída no estudo uma amostra em *pool* composta por 50 amostras de fezes de gaivotas, colhidas pelo Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) na praia de Matosinhos.

Todas as amostras foram mantidas refrigeradas após a colheita, e processadas de imediato após chegada ao laboratório.

Métodos de isolamento e de caracterização fenotípica e genotípica

As estirpes foram isoladas recorrendo a métodos de isolamento convencionais. Para o caso de *E. coli* o isolamento foi efetuado como descrito em Pista *et al.* (23), para *Salmonella* spp., em conformidade com a ISO 6579-1:2017 (24), e para *Campylobacter* spp. em conformidade com a ISO 10272-1:2017 (25). A serotipagem de *Salmonella* spp. foi efetuada de acordo com o esquema de Kauffmann-White-Le Minor (26) por aglutinação dos antígenos O e H. Os perfis de resistência a antibióticos foram determinados por difusão em disco, seguindo as recomendações e os limites da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (27). A identificação de genes específicos associados à virulência e à resistência a antimicrobianos foi efetuada por PCR *multiplex* e/ou por sequenciação total do genoma (WGS).

_Resultados

Foram isoladas estirpes patogénicas de *E. coli*, de *Salmonella* spp. e de *Campylobacter* spp. em, respetivamente, 8,9% (14/158), 2,8% (3/108) e 9,9% (9/91) das amostras. Adicionalmente, foi possível isolar 54 estirpes de *E. coli* consideradas como não patogénicas (34,1%; 54/158) (tabela 1).

Relativamente aos patótipos de *E. coli*, o patótipo *E. coli* patogénica extraintestinal (ExPEC) foi o mais frequentemente identificado (9/14; 64,3%), seguido de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC), ambos com dois isolados cada (2/14; 14,3%), e de *E. coli* enteropatogénica (EPEC) (1/14; 7,1%). A resistência a antibióticos foi testada em 54 isolados de *E. coli*, tendo sido detetada em 14 (25,9%), 11 dos quais contendo genes codificadores de factores de virulência, *E. coli* patogénicos. Os perfis de resistência dos 14 isolados de *E. coli* com resistência a antibióticos, bem como os seus serotipos e *sequence types* STs estão resumidos na tabela 2. Os três isolados de *E. coli* patogénicos mas susceptíveis a antibióticos (e por isso não constantes da tabela 2) pertenciam ao ST34 (patótipo EAEC), ST13581 (ST novo identificado num isolado STEC) e ST583 (patótipo EPEC).

Relativamente às espécies de *Campylobacter* isoladas, *Campylobacter coli* foi detetada em quatro amostras, e *Campylobacter jejuni* em cinco amostras de fezes (tabela 1). Foram identificados dois ST diferentes nos isolados de *C. coli*, ST11400 e ST11401, e três ST nos isolados de *C. jejuni* ST990, ST1268 e ST8572. Um isolado de *C. jejuni* apresentou resistência à ciprofloxacina, tetraciclina e ampicilina. Este isolado exibia os genes de resistência *gyrA*_T86I, *tetO* e *bla*_{OXA-466}, associados a este fenótipo.

Salmonella spp., foi detetada em 3 amostras na população em estudo (3/108; 2,8%). Foram identificados os serotipos de *Salmonella enterica diarizonae* ser. 60:k:e,n,x,z15 e *Salmonella enterica enterica* ser. Typhimurium e Litchfield (tabela 1). Os três isolados foram caracterizados como pertencentes aos ST3127 (S. 60:k:e,n,x,z15), ST19 (S. Typhimurium), e ST214 (S. Litchfield). Todos os isolados de *Salmonella* spp. foram sensíveis aos antibióticos testados.

_Discussão

De acordo com diversos estudos europeus, a prevalência de *E. coli*, *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. em amostras de fezes de aves é muito variável. De facto, a deteção de *E. coli* patogénicas pode variar entre 6 e 30% (28-30), a de *Campylobacter* spp. entre 1 e 50% (11-14,16-18,29,31-33) e a de *Salmonella* spp. entre 0 e 53% (12-15,18,17,29).

A presença de β -lactamases de espectro alargado (ESBL), um grupo de enzimas que confere resistência, por exemplo, às cefalosporinas de 3.^a e 4.^a geração, tem vindo a aumentar nas bactérias da família das *Enterobacteriaceae*, constituindo um grave problema de saúde pública. As gaiotas, devido à sua vasta distribuição global e à interação próxima com ambientes influenciados pelos seres humanos, são aves particularmente expostas a resíduos do ecossistema onde os humanos se inserem. Não é, pois, surpreendente que outros autores também já tenham reportado a presença de *E. coli* produtoras de ESBL, em fezes de gaiotas (34-37). Os isolados produtores de ESBL identificados neste trabalho evidenciam semelhanças com isolados de produtos biológicos humanos. A ESBL do tipo CTX-M-15 identificada em três isolados ExPEC, é uma das ESBL mais frequentes em estirpes de *Enterobacteriaceae* com relevância clínica, em Portugal (38-40) e no mundo (41). As ESBL do tipo SHV-12 e CTX-M-1, encontradas, respetivamente, em duas e em uma ExPEC, têm igualmente sido identificadas em isolados de produtos biológicos humanos de casos clínicos em Portugal (42).

A deteção de isolados de *E. coli* resistentes a antibióticos, alguns deles multirresistentes e produtores de ESBL, alerta para a necessidade de controlar e gerir a utilização dos antibióticos na terapêutica de casos de doença em humanos e animais, bem como para a redução da utilização na agropecuária, e a melhoria do tratamento das águas residuais (urbanas, hospitalares e rurais) de forma a diminuir a contaminação ambiental.

Tabela 1: Caracterização de isolados de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em amostras de fezes de aves em liberdade, em Portugal.

Classificação das aves		#*	Escherichia coli					Salmonella spp.	Campylobacter spp.	
Ordem	Espécie (nº de amostras)		PCR			WGS	Não patogénicas			
			STEC	EAEC	EPEC	ExPEC				
EVOA	Anseriformes	<i>Anas crecca</i> (17)	17/17/10	1	0	0	0	15	0	0
		<i>Anas platyrhynchos</i> (1)	1/1/1	0	0	0	0	1	0	0
	Ciconiiformes	<i>Ixobrychus minutus</i> (1)	1/1/1	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Fulica atra</i> (2)**	2/2/2	0	0	0	0	2	0	2 <i>C. coli</i>
	Gruiformes	<i>Gallinula chloropus</i> (7)**	7/7/5	0	1	0	1	5	0	1 <i>C. coli</i> / 1 <i>C. jejuni</i>
		<i>Acrocephalus schoenobaenus</i> (1)	1/1/1	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Acrocephalus scirpaceus</i> (6)**	6/6/6	0	0	0	2	1	0	1 <i>C. coli</i>
		<i>Cettia cetti</i> (1)	1/1/1	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Carduelis chloris</i> (1)	1/1/1	0	0	0	0	0	0	0
	Passeriformes	<i>Emberiza calandra</i> (3)	3/3/3	0	0	0	0	2	0	0
		<i>Erithacus rubecula</i> (1)	1/1/1	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Euplectes afer</i> (7)	7/7/7	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Luscinia svecica</i> (6)	6/6/6	0	0	0	0	1	0	0
		<i>Oenanthe oenanthe</i> (1)	1/1/1	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Passer domesticus</i> (1)	1/1/1	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Phylloscopus collybita</i> (4)	4/4/4	0	0	0	0	1	0	0
		<i>Phylloscopus trochilus</i> (7)	7/7/7	0	0	0	0	1	0	0
		<i>Saxicola rubicola</i> (1)	1/1/1	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Strunus unicolor</i> (3)	3/3/3	0	0	0	0	1	0	0
	Total (%)	71/71/62	1 (1,4)	1 (1,4)	0 (0)	3 (4,2)	30 (42,2)	0 (0)	5 (8,1)	
CRFPBG	Accipitriformes	<i>Circaetus gallicus</i> (1)**	1/1/1	0	0	0	0	0	1 ^a	0
	Ciconiiformes	<i>Ciconia nigra</i> (1)	1/1/1	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Larus</i> spp. (18)**	18/18/14	0	0	1	0	10	0	4 <i>C. jejuni</i>
	Charadriiformes	<i>Larus fuscus</i> (1)	1/1/1	0	0	0	0	1	0	0
		<i>Fratercula arctica</i> (1)	1/1/1	0	0	0	0	0	0	0
	Columbiformes	<i>Columba livia</i> (1)**	7/7/6	1	0	0	0	5	2 ^b	0
		<i>Streptopelia decaocto</i> (3)	3/3/2	0	0	0	0	3	0	0
	Falconiformes	<i>Falco peregrinus</i> (1)	1/1/1	0	0	0	0	0	0	0
	Passeriformes	<i>Garrulus glandarius</i> (1)	1/1/1	0	0	0	0	1	0	0
	Pelecaniformes	<i>Nycticorax nycticorax</i> (1)	1/1/0	0	0	0	0	1	0	0
Strigiformes	<i>Athene noctua</i> (2)	2/1/1	0	0	0	0	2	0	0	
	Total (%)	37/37/29	1 (2,7)	0 (0)	1 (2,7)	0 (0)	24 (64,9)	3 (8,1)	4 (13,8)	
ICBAS	Charadriiformes	<i>Larus</i> spp. (50)**	50/0/0	0	1	0	6	0	NE	NE
		Total (%)	50/0/0	0	1 (2,0)	0 (0)	6 (12,0)	0 (0)	NE	NE
	Total (%)	158/108/91	2 (1,3)	2 (1,3)	1 (0,6)	9 (5,7)	54 (34,1)	3 (2,8)	3 (2,8)	

*#: número de amostras testadas para *E. coli* / *Salmonella* / *Campylobacter*; **: mais de um isolado por amostra; ***: uma amostra em *pool* composta por 50 fezes; a, *S.* 60:k:e,n,x,z15; b, *S.* Typhimurium e *S.* Litchfield; NE: não examinado; EVOA: Espaço de Visitação e Observação de Aves; CRFPBG: Centro de Recuperação de Fauna do Parque Biológico de Gaia; ICBAS: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar; WGS: Sequenciação total do genoma; PCR: Reação da polimerase em cadeia.

Tabela 2: Padrões de resistência a antimicrobianos detetados nos isolados de *Escherichia coli* (n=14/54) por espécies de aves.

Espécie	Patotipo	Serotipo/ST	Fenótipo de resistência	Genes associados a resistência (WGS)
<i>Anas crecca</i>	não patogénico	NE	AMP, TET	NE
<i>Larus fuscus</i>			AMC, AMP	
<i>Larus spp.</i>			AMP, TET	
<i>Larus spp.</i>	ExPEC	O55:H10 / ST162	AMP, CAZ, CIP, COX, FEP, NAL, SMX TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B'} <i>bla</i> _{SHV-12'} <i>gyrA</i> , <i>qnrB19</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> , <i>dfrA17</i>
		ONH:H16 / ST453	AMP, CAZ, CIP, COX, FEP, NAL, SMX TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B'} <i>bla</i> _{SHV-12'} <i>gyrA</i> , <i>qnrB19</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> , <i>dfrA14</i>
		OND:H9 / ST410	AMC, AMP, AZM, CAZ, CHL, CIP, COX FEP, NAL, SMX, TET, TMP	<i>aac(6')-lb-cr,mph(A)</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-15'} <i>bla</i> _{TEM-1A'} <i>bla</i> _{OXA-1'} , <i>floR</i> , <i>gyrA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i> , <i>dfrA17</i>
		O78:H4 / ST23	AMP, CAZ, CIP, COX, FEP, NAL, SMX, TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1'} <i>gyrA</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>
		O25:H4 / ST131	AMC, AMP, AZM, CAZ, CIP, COX, FEP, GMN, NAL, SMX, TET, TMP	<i>aac(6')-lb-cr,mph(A)</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-15'} <i>bla</i> _{SHV-55'} <i>bla</i> _{OXA-1'} <i>aac(3)-IIa</i> , <i>gyrA</i> , <i>qnrS1</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>dfrA14</i> , <i>dfrA17</i>
		O25:H4 / ST131	AMC, AMP, AZM, CAZ, CIP, COX, FEP, GMN, NAL, SMX, TET, TMP	<i>aac(6')-lb-cr,mph(A)</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-15'} <i>bla</i> _{SHV-55'} <i>bla</i> _{OXA-1'} <i>aac(3)-IIa</i> , <i>gyrA</i> , <i>qnrS1</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>dfrA17</i>
<i>Larus spp.</i>	EAEC	O111:H21 / ST40	AMC, AMP, CAZ, COX, FOX	<i>ampC-promoter</i> , <i>bla</i> _{TEM-1B}
<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	ExPEC	O101:H9 / ST10	AMP, CHL, CIP, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B'} <i>cmlA1</i> , <i>qnrB19</i> , <i>qnrB82</i> , <i>qnrB67</i> , <i>qnrB56</i> , <i>tet(A)</i>
		O101:H9 / ST10	AMP, CHL, CIP, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B'} <i>cmlA1</i> , <i>qnrB19</i> , <i>qnrB82</i> , <i>qnrB67</i> , <i>qnrB56</i> , <i>tet(A)</i>
<i>Gallinula chloropus</i>	ExPEC	O101:H9 / ST10	AMP, CHL, CIP, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B'} <i>cmlA1</i> , <i>qnrB19</i> , <i>qnrB82</i> , <i>qnrB67</i> , <i>qnrB56</i> , <i>tet(A)</i>
<i>Columba livia</i>	STEC	O45:H2 / ST20	SMX, TET, TMP	<i>sul1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>dfrA1</i>

NE: não examinado; ST: Sequence Type; EAEC: *E. coli* Enteroagregativa; ExPEC: *E. coli* Patogénica Extraintestinal; STEC: *E. coli* produtora de toxina Shiga; OND: antígeno O não determinado; AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina- Ácido Clavulânico; AZM: Azitromicina; FEP: Cefepima; COX: Cefotaxima; FOX: Cefoxitina; CZD: Ceftazidima; CRO: Ceftriaxona; CHL: Cloranfenicol; ERY: Eritromicina; GMN: Gentamicina; MEM: Meropenem; NAL: Ácido Nalidixico; CIP: Ciprofloxacina; SMX: Sulfametoxazole; TET: Tetraciclina; TGC: Tigeciclina; TMP: Trimetoprim; WGS: Sequenciação total do genoma.

A maioria dos ST de *E. coli* identificados neste estudo (ST10, ST20, ST23, ST34, ST40, ST453 e ST583) já foram documentados e associados a *E. coli* causadoras de diarreia, isolados entre 1950 e 2015, em 44 países da Ásia, América, África e Europa (43). Adicionalmente, os ST10, ST23 e ST131 aparecem no top 20 dos STs de ExPEC de origem humana (44).

Relativamente à caracterização dos isolados de *Salmonella* spp., é importante referir que os serotipos *S. Typhimurium* e *S. Litchfield* estão associados a casos de gastroenterite e bacteriemia em diversos países, sendo *S. Typhimurium* um dos serotipos mais associado a doença humana e animal. O ST19, identificado neste estudo, é o mais prevalente neste último serotipo (45). O serotipo *S. 60:k:e,n,x,z15* pertence à subespécie *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, que é normalmente identificada no ambiente e em animais de sangue frio, como é o caso da cascavel sul americana (*Crotalus durissus*) (46). No presente estudo, este serotipo foi identificado em fezes de águia cobreira (*Circaetus gallicus*), uma ave que se alimenta quase exclusivamente de cobras. Este facto reforça a possibilidade de as aves poderem estar envolvidas no transporte e na disseminação de microrganismos patogénicos. As duas espécies de *Campylobacter* identificadas (*C. jejuni* e *C. coli*) são as mais frequentemente reportadas em infeções humanas (47). *C. jejuni*, ST990, foi identificado em isolados de produtos biológicos humanos associados a gastroenterite e em galinhas; o ST1268 foi identificado em aves, águas, géneros alimentícios e em produtos biológicos humanos de casos clínicos de gastroenterite, e o ST8572 em aves na África do Sul (base de dados de *Campylobacter jejuni/coli* PubMLST, <https://pubmlst.org/organisms>).

_Conclusões

Os resultados deste estudo evidenciam que aves em liberdade, em Portugal continental, podem ser portadoras, e efetivos agentes de dispersão, de estirpes de *E. coli*, *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. que já foram anteriormente associadas a doença humana, algumas das quais resistentes, ou mesmo multirresistentes, a diversos antibióticos de importância crítica nos cuidados de saúde.

Estes resultados reforçam o já reconhecido conceito *One Health*, mostrando que a saúde humana e animal estão interligadas, e associadas à saúde dos ecossistemas que habitam.

Os resultados pormenorizados deste trabalho estão compilados em artigo publicado: Batista R, Saraiva M, Lopes T, Silveira L, Coelho A, Furtado R, Castro R, Correia CB, Rodrigues D, Henriques P, Lóio S, Soeiro V, da Costa PM, Oleastro M, Pista A. Genotypic and Phenotypic Characterization of Pathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Campylobacter* spp., in Free-Living Birds in Mainland Portugal. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Dec 23;20(1):223. doi: 10.3390/ijerph20010223

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Regional Office for South-East Asia. A brief guide to emerging infectious diseases and zoonoses. New Delhi: WHO Regional Office for South-East, 2014. Asia. <https://iris.who.int/handle/10665/204722>
- (2) Cntas L, Suer K. Review: the important bacterial zoonoses in "one health" concept. *Front Public Health*. 2014 Oct 14;2:144. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00144>
- (3) European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J*. 2022 Dec 13;20(12):e07666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- (4) Wang J, Ma ZB, Zeng ZL, et al. The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. *Zool Res*. 2017 Mar 18;38(2):55-80. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2017.003>
- (5) Boulonier T, Kada S, Ponchon A, et al. Migration, Prospecting, Dispersal? What Host Movement Matters for Infectious Agent Circulation? *Integr Comp Biol*. 2016 Aug;56(2):330-42. <https://doi.org/10.1093/icb/icw015>
- (6) Bonnedahl J, Järhult JD. Antibiotic resistance in wild birds. *Ups J Med Sci*. 2014 May;119(2):113-6. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.905663>
- (7) González-Lagos C, Cardador L, Sol D. Invasion success and tolerance to urbanization in birds. *Ecography*. 2021;44(11):1642-52. <https://doi.org/10.1111/ecog.05826>
- (8) Van Doren BM, Conway GJ, Phillips RJ, et al. Human activity shapes the wintering ecology of a migratory bird. *Glob Chang Biol*. 2021 Jun;27(12):2715-27. <https://doi.org/10.1111/gcb.15597>
- (9) Tryjanowski P, Sparks TH, Kuźniak S, et al. Bird migration advances more strongly in urban environments. *PLoS One*. 2013 May 8;8(5):e63482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063482>
- (10) Krawiec M, Rusiecki S, Kuczkowski M, et al. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. strains isolated from free-living birds. *Pol J Vet Sci*. 2017 Dec;20(4):635-642. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2017-0080>
- (11) Krawiec M, Woźniak-Biel A, Bednarski M, et al. Antimicrobial Susceptibility and Genotypic Characteristic of *Campylobacter* spp. Isolates from Free-Living Birds in Poland. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2017 Nov;17(11):755-763. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2116>
- (12) Palmgren H, Sellin M, Bergström S, et al. Enteropathogenic bacteria in migrating birds arriving in Sweden. *Scand J Infect Dis*. 1997;29(6):565-8. <https://doi.org/10.3109/00365549709035895>

- (13) Antilles N, Sanglas A, Cerdà-Cuellar M. Free-living Waterfowl as a Source of Zoonotic Bacteria in a Dense Wild Bird Population Area in Northeastern Spain. *Transbound Emerg Dis*. 2015 Oct;62(5):516-21. <https://doi.org/10.1111/tbed.12169>
- (14) Gargiulo A, Fioretti A, Russo TP, et al. Occurrence of enteropathogenic bacteria in birds of prey in Italy. *Lett Appl Microbiol*. 2018 Mar;66(3):202-206. <https://doi.org/10.1111/lam.12836>
- (15) Krawiec M, Kuczkowski M, Kruszewicz AG, Wieliczko A. Prevalence and genetic characteristics of Salmonella in free-living birds in Poland. *BMC Vet Res*. 2015 Jan 31;11:15. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0332-x>
- (16) Hughes LA, Bennett M, Coffey P, et al. Molecular epidemiology and characterization of Campylobacter spp. isolated from wild bird populations in northern England. *Appl Environ Microbiol*. 2009 May;75(10):3007-15. <https://doi.org/10.1128/AEM.02458-08>
- (17) Martín-Maldonado B, Montoro-Dasi L, Pérez-Gracia MT, et al. Wild Bonelli's eagles (*Aquila fasciata*) as carrier of antimicrobial resistant Salmonella and Campylobacter in Eastern Spain. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2019 Dec;67:101372. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101372>
- (18) Marin C, Palomeque MD, Marco-Jiménez F, et al. Wild griffon vultures (*Gyps fulvus*) as a source of Salmonella and Campylobacter in Eastern Spain. *PLoS One*. 2014 Apr 7;9(4):e94191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094191>
- (19) Santos T, Silva N, Igrejas G, et al. Dissemination of antibiotic resistant Enterococcus spp. and Escherichia coli from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe*. 2013 Dec;24:25-31. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.09.004>
- (20) Ahlstrom CA, Ramey AM, Woksepp H, Bonnedahl J. Early emergence of mcr-1-positive Enterobacteriaceae in gulls from Spain and Portugal. *Environ Microbiol Rep*. 2019 Oct;11(5):669-71. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12779>
- (21) Silva N, Igrejas G, Rodrigues P, et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum β -lactamase-containing Escherichia coli isolates in wild birds from the Azores Archipelago. *Avian Pathol*. 2011 Oct;40(5):473-9. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.599061>
- (22) Radhouani H, Poeta P, Gonçalves A, et al. Wild birds as biological indicators of environmental pollution: antimicrobial resistance patterns of Escherichia coli and enterococci isolated from common buzzards (*Buteo buteo*). *J Med Microbiol*. 2012 Jun;61(Pt 6):837-43. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.038364-0>
- (23) Pista A, Silveira L, Ribeiro S, et al. Pathogenic Escherichia coli, Salmonella spp. and Campylobacter spp. in Two Natural Conservation Centers of Wildlife in Portugal: Genotypic and Phenotypic Characterization. *Microorganisms*. 2022 Oct 27;10(11):2132. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112132>
- (24) ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1: Detection of Salmonella spp.
- (25) ISO 10272-1:2017. Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. - Part 1: Detection method
- (26) Grimont PAD, Weill FX; WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. 9th ed. Paris: Institute Pasteur, 2007. https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf
- (27) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022.
- (28) Hughes LA, Bennett M, Coffey P, et al. Risk factors for the occurrence of Escherichia coli virulence genes eae, stx1 and stx2 in wild bird populations. *Epidemiol Infect*. 2009 Nov;137(11):1574-82. <https://doi.org/10.1017/S0950268809002507>
- (29) Konicek C, Vodrážka P, Barták P, et al. Detection of Zoonotic Pathogens in Wild Birds in the Cross-Border Region Austria - Czech Republic. *J Wildl Dis*. 2016 Oct;52(4):850-61. <https://doi.org/10.7589/2016-02-038>
- (30) Kobayashi H, Pohjanvirta T, Pelkonen S. Prevalence and characteristics of intimin and Shiga toxin-producing Escherichia coli from gulls, pigeons and broilers in Finland. *J Vet Med Sci*. 2002 Nov;64(11):1071-3. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.1071>
- (31) Tryjanowski P, Nowakowski JJ, Indykiewicz P, et al. Campylobacter in wintering great tits *Parus major* in Poland. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020 Mar;27(7):7570-7577. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07502-y>
- (32) Waldenström J, Broman T, Carlsson I, et al. Prevalence of Campylobacter jejuni, Campylobacter lari, and Campylobacter coli in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Dec;68(12):5911-7. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5911-5917.2002>
- (33) Waldenström J, On SL, Ottvall R, Hasselquist D, Olsen B. Species diversity of campylobacteria in a wild bird community in Sweden. *J Appl Microbiol*. 2007 Feb;102(2):424-32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03090.x>
- (34) Zeballos-Gross D, Rojas-Sereno Z, Salgado-Caxito M, et al. The Role of Gulls as Reservoirs of Antibiotic Resistance in Aquatic Environments: A Scoping Review. *Front Microbiol*. 2021 Jul 23;12:703886. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703886>
- (35) Stedt J, Bonnedahl J, Hernandez J, et al. Carriage of CTX-M type extended spectrum β -lactamases (ESBLs) in gulls across Europe. *Acta Vet Scand*. 2015 Nov 2;57:74. <https://doi.org/10.1186/s13028-015-0166-3>
- (36) Atterby C, Börjesson S, Ny S, et al. ESBL-producing Escherichia coli in Swedish gulls-A case of environmental pollution from humans? *PLoS One*. 2017 Dec 28;12(12):e0190380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190380>
- (37) Aires-de-Sousa M, Fournier C, Lopes E, et al. High Colonization Rate and Heterogeneity of ESBL- and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Isolated from Gull Feces in Lisbon, Portugal. *Microorganisms*. 2020 Sep 28;8(10):1487. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101487>
- (38) Aires-de-Sousa M, Lopes E, Gonçalves ML, et al. Intestinal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae at admission in a Portuguese hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 Apr;39(4):783-90. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03798-3>
- (39) Jones-Dias D, Manageiro V, Ferreira E, et al.; Antibiotic Resistance Surveillance Program in Portugal (ARSIP) participants; Caniça M. Diversity of extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in Enterobacteriaceae isolates from Portuguese health care facilities. *J Microbiol*. 2014 Jun;52(6):496-503. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3420-x>
- (40) Rodrigues C, Machado E, Fernandes S, et al. An update on faecal carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae by Portuguese healthy humans: detection of the H30 subclone of B2-ST131 Escherichia coli producing CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Apr;71(4):1120-2. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv443>
- (41) Peirano G, Pitout JDD. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs*. 2019 Sep;79(14):1529-41. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01180-3>
- (42) Rodrigues C, Machado E, Pires J, et al. Increase of widespread A, B1 and D Escherichia coli clones producing a high diversity of CTX-M-types in a Portuguese hospital. *Future Microbiol*. 2015;10(7):1125-31. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.38>
- (43) Yu F, Chen X, Zheng S, et al. Prevalence and genetic diversity of human diarrheagenic Escherichia coli isolates by multilocus sequence typing. *Int J Infect Dis*. 2018 Feb;67:7-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.11.025>
- (44) Manges AR, Geum HM, Guo A, et al. Global Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli (ExPEC) Lineages. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Jun 12;32(3):e00135-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18>
- (45) Achtman M, Wain J, Weill FX, et al.; S. Enterica MLST Study Group. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in Salmonella enterica. *PLoS Pathog*. 2012;8(6):e1002776. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>
- (46) Solari CA, Mandarino JR, Panizzutti MH, et al. A new serovar and a new serological variant belonging to Salmonella enterica subspecies diarizonae. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003 Jun;98(4):501-2. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000400013>
- (47) Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, et al. Global Epidemiology of Campylobacter Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jul;28(3):687-720. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>
- (48) Batista R, Saraiva M, Lopes T, Silveira L, Coelho A, Furtado R, Castro R, Correia CB, Rodrigues D, Henriques P, Lóio S, Soeiro V, da Costa PM, Oleastro M, Pista A. Genotypic and Phenotypic Characterization of Pathogenic Escherichia coli, Salmonella spp., and Campylobacter spp., in Free-Living Birds in Mainland Portugal. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Dec 23;20(1):223. <https://doi.org/10.3390/ijerph20010223>