

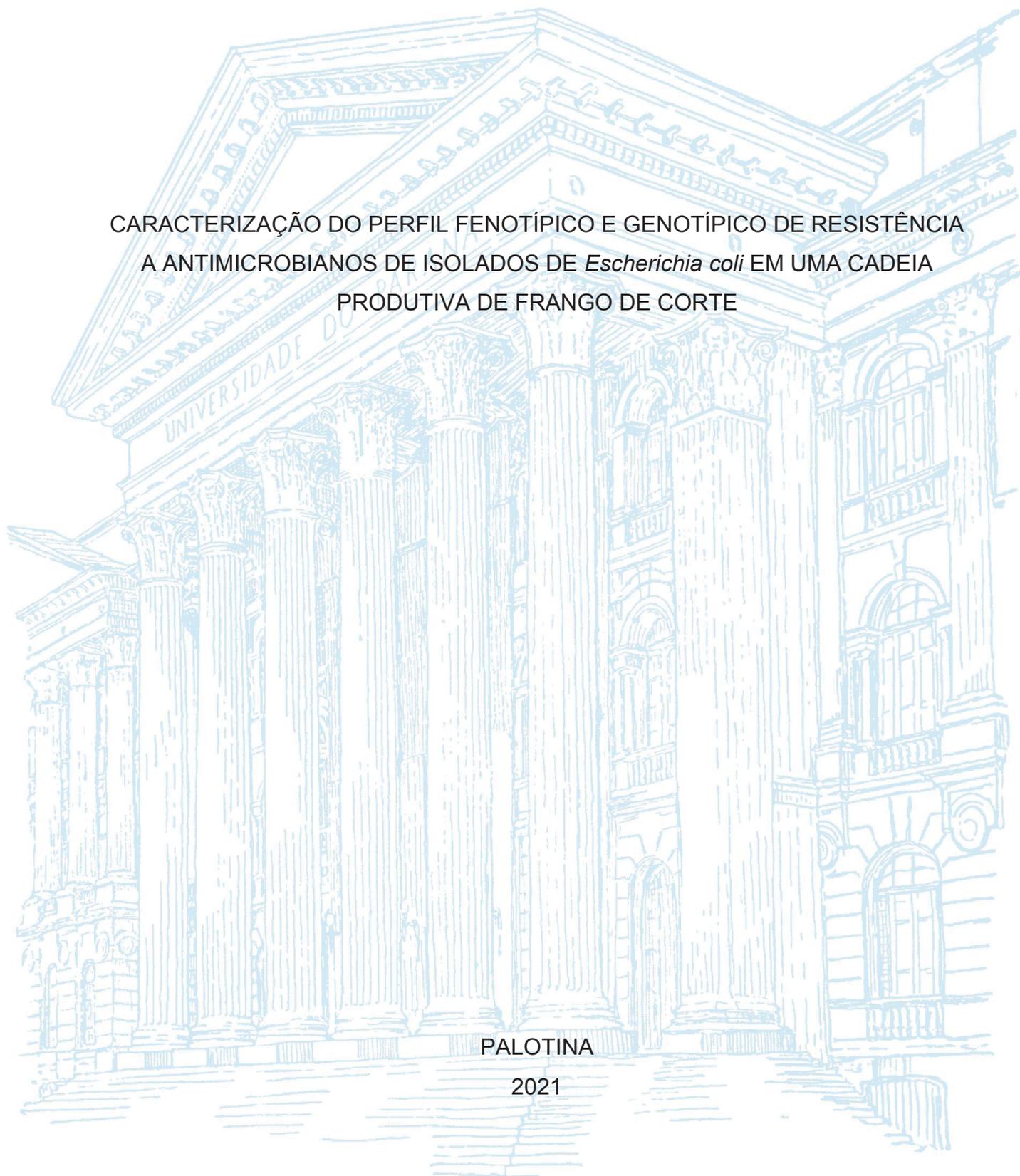
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JHENNIFER ARRUDA SCHMIEDT

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA  
A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* EM UMA CADEIA  
PRODUTIVA DE FRANGO DE CORTE

PALOTINA

2021



JHENNIFER ARRUDA SCHMIEDT

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA  
A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* EM UMA CADEIA  
PRODUTIVA DE FRANGO DE CORTE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot.

Coorientadora: Profa. Dra. Cibeli Viana

PALOTINA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S354 Schmiedt, Jhennifer Arruda  
Caracterização do perfil fenotípico e genotípico de resistência a antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* em uma cadeia produtiva de frango de corte / Jhennifer Arruda Schmiedt – Palotina, 2021.  
81f.

Orientador: Luciano dos Santos Bersot  
Coorientadora: Cibeli Viana  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. Resistência. 2. Saúde única. 3. Cadeia avícola. 4. *Breakpoint*.  
5. Disco-difusão. 6. Genes. I. Bersot, Luciano dos Santos. II. Viana, Cibeli. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 636.5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -  
40001018077P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de JHENNIFER ARRUDA SCHMIEDT intitulada: "CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* EM UMA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGO DE CORTE", sob orientação do Prof. Dr. LUCIANO DOS SANTOS BERSOT, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 15 de Março de 2021.

Assinatura Eletrônica

15/03/2021 14:46:46.0

LUCIANO DOS SANTOS BERSOT

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/03/2021 15:05:31.0

RICARDO SEITI YAMATOGLI

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA)

Assinatura Eletrônica

15/03/2021 14:59:06.0

LUÍS AUGUSTO NERO

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA)

---

R. Pioneiro, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil  
CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8529 - E-mail: ppgca.ufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 82718

**Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.pppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e inira o código 82718**

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

Jhennifer Arruda Schmiedt, filha de Elza Augusto de Arruda Schmiedt e Leomar Schmiedt, nascida em 18 de abril de 1995 no município de Assis Chateaubriand, estado do Paraná. Médica Veterinária formada no ano de 2018 pela Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina (UFPR). Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, na linha de pesquisa Microbiologia Aplicada à Produção Animal.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por nunca ter me desamparado e por sempre ter escutado as minhas orações e lamentações. Obrigada por ser meu alicerce, onde eu encontro abrigo e força para superar qualquer obstáculo.

Aos meus pais, Elza e Leomar, por tudo que fizeram e fazem por mim, vocês são meu exemplo e orgulho, o amor que sempre expressaram por mim é o que me deu forças para continuar. Obrigado por tudo, amo vocês.

Aos meus irmãos e amigos, Leidimar e Lucio, que sempre me ajudaram quando eu precisei, e por fazerem o possível e impossível para eu estar bem e conseguir realizar meus sonhos, vocês são demais, são minha inspiração, amo vocês.

Ao meu amigo e esposo Bruno, que esteve comigo e aguentou cada lágrima e meus momentos de estresse, você é essencial na minha vida, me dando suporte, conselhos, amor e muita ajuda, obrigada por ser maravilhoso, obrigada por me apoiar em tudo, te amo.

Agradeço também a minha tia Emilia, minha prima Emily, meu avô Geraldo e minha amiga Gisele, por sempre estarem me acompanhando e torcendo por mim, o apoio de vocês foi essencial nessa etapa, amo vocês.

A minha vó Rosa, que já não está mais entre nós, porém o seu amor e sua presença sempre estarão comigo, o orgulho que você tinha de mim, e a vontade de me ver vencer me dão forças para continuar e sempre fazer o meu melhor, te amarei para sempre.

Agradeço a equipe LACOMA, em especial aos meus amigos de convívio diário, Rosana, Emanoelli, Leonardo, Victor, Gabriela, Carol, Marina e Thiago que acompanhavam e viveram comigo de perto cada etapa do meu projeto, cada alegria e dificuldade, a ajuda de vocês foi essencial, obrigada por tudo. Também agradeço ao professor Vinicius, que também esteve presente na minha trajetória acadêmica.

Um agradecimento especial aos meus amigos Emanoelli e Leonardo, que muitas vezes pararam o que estavam fazendo para me ajudar, mesmo que isso durasse praticamente a noite toda. Obrigada por cada conselho e abraço, vocês foram essenciais para a conclusão do meu mestrado, amo vocês.

A minha co-orientadora Cibeli, obrigada por ter aceitado me orientar e contribuir com muito conhecimento para o projeto, sou grata por tudo que compartilhou comigo, ideias, ensinamentos e pela paciência.

Ao meu querido professor Luciano, sou muito grata por esses anos de orientação, por sempre estar contribuindo para minha evolução acadêmica, me ajudando a buscar mais conhecimento e também a ter mais confiança. Obrigada por cada ensinamento e cobrança, sua ajuda foi essencial para meu crescimento e amadurecimento.

Ao Professor Luís Augusto Nero e ao Professor Ricardo Seiti Yamatogi pelo aceite de compor a banca.

A CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq pelo auxílio financeiro para execução do projeto.

E por fim, à todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para conclusão dessa etapa.

Meu muito obrigada!

“Elevo os meus olhos para os montes; de onde me virá o socorro? O meu socorro vem do Senhor, que fez o céu e a terra.”

Salmos 121:1-2

## RESUMO

O objetivo do estudo foi caracterizar o perfil de resistência de isolados de *Escherichia coli* obtidos de amostras da cadeia produtiva de frangos corte. Foram coletadas 495 amostras em um abatedouro de aves regularmente fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal, localizado no estado do Paraná (Brasil). O isolamento de *E. coli* foi realizado em ágar MacConkey e as colônias com morfologia típica de *E. coli* foram confirmadas bioquimicamente. Os isolados confirmados seguiram para os testes de diluição em ágar, realizado como triagem, onde os antimicrobianos testados foram: amoxicilina - AMO (32 µg), ceftiofur – CTF (8 µg), cloranfenicol - CLO (32 µg), tetraciclina - TET (16 µg), ciprofloxacina - CIP (1 µg) e sulfametaxazol + trimetropim - SUT (76/4 µg). Para o teste disco-difusão em ágar os antimicrobianos utilizados foram AMO (10 µg); CTF (30 µg); aztreonam - ATM (30 µg); imipenem – IPM (10 µg); CIP (5 µg); TET (30 µg); gentamicina - GEN (10 µg), SUT (23,75/1,25 µg), CLO (30 µg) e azitromicina - AZI (15 µg). Para a detecção de *E. coli* produtora de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), foram utilizados quatro antimicrobianos: amoxicilina com ácido clavulânico (20/10 µg), ceftazidima – 30 µg, cefotaxima – 30 µg e cefepima – 30 µg. Para caracterização molecular, os genes *blaTEM*; *aac(3)-II*; *tetA*; *qnrS*; *dhfrI*; *sul1*; *cmlA5* e *floR* foram avaliados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Um total de 1128 isolados de *E. coli* foram identificados nas amostras de carcaça de frango após a sangria, após depenagem, após evisceração e após a saída do *chiller*, água residual da escaldagem e *chiller*, caixa de transporte das aves e fezes funcionário. Nenhum isolado foi detectado na água industrial. A resistência mais comumente detectada no *Breakpoint* foi para os antimicrobianos SUT, TET e AMO. Para o teste de disco-difusão em ágar, 701 isolados foram avaliados, onde uma alta resistência foi detectada para a CIP (94,1%), TET (56,3%), SUT (54,3%) e AMO (48,1%), sendo um resultado preocupante, já que alguns desses antimicrobianos são utilizados para tratamento de casos graves em humanos e também de forma ampla na avicultura. Dentre os isolados, 578 foram multidroga resistente e apenas 15 isolados (2,2%) foram ESBL positivas. A resistência antimicrobiana entre os isolados de amostras dos funcionários e as demais amostras da cadeia avícola foram muito semelhantes, sendo um sinal de alerta, já que a exposição a esses antimicrobianos podem selecionar micro-organismos e resistentes. Um total de 74 isolados (42%) apresentaram a presença de um ou mais genes de resistência antimicrobiana. Os genes mais detectados nos isolados foram *cmlA5*, *sul1* e *dhfrI*, totalizando 21,6%, 21% e 12,5% respectivamente. Em relação a correlação dos resultados fenotípicos e genotípicos observados pelo teste Kappa, amoxicilina demonstrou uma concordância pobre, já os demais antimicrobianos uma concordância leve. O assunto envolvendo a resistência antimicrobiana deve ser tratado com cuidado, procurando maneiras para redução do uso de antimicrobianos, já que os efeitos adversos do uso incorreto e exagerado pode contribuir para disseminação de genes de resistência entre os micro-organismos e pelo ecossistema.

Palavras-chave: Resistência. Saúde única. Cadeia avícola. *Breakpoint*. Disco-difusão. Genes.

## ABSTRACT

The objective of the study was to characterize the resistance profile of *Escherichia coli* isolates obtained from samples of the broiler production chain. 495 samples were collected in a poultry slaughterhouse regularly inspected by the Federal Inspection Service, located in the state of Paraná (Brazil). *E. coli* isolation was performed on MacConkey agar and colonies with typical *E. coli* morphology were confirmed biochemically. The confirmed isolates went to the agar dilution tests, performed as a screening, where the tested antimicrobials were: amoxicillin - AMO (32 µg), ceftiofur - CTF (8 µg), chloramphenicol - CLO (32 µg), tetracycline - TET (16 µg), ciprofloxacin - CIP (1 µg) and sulfametaxazole + trimethoprim - SUT (76/4 µg). For the disk-diffusion test on agar, the antimicrobials used were AMO (10 µg); CTF (30 µg); aztreonam - ATM (30 µg); imipenem - IPM (10 µg); CIP (5 µg); TET (30 µg); gentamicin - GEN (10 µg), SUT (23.75 / 1.25 µg), CLO (30 µg) and azithromycin - AZI (15 µg). For the detection of *E. coli* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), four antimicrobials were used: amoxicillin with clavulanic acid (20/10 µg), ceftazidime - 30 µg, cefotaxime - 30 µg and cefepime - 30 µg. For molecular characterization, the *blaTEM* genes; *aac (3) -II*; *theta*; *qnrS*; *dhfrI*; *sul1*; *cmIA5* and *floR* were evaluated using the polymerase chain reaction (PCR) technique. A total of 1128 *E. coli* isolates were identified in the chicken carcass samples after bleeding, after plucking, after evisceration and after the *chiller* left, scalding and chiller residual water, poultry and employee feces transport box. No isolates were detected in industrial water. The most commonly detected resistance at agar dilution tests was for the antimicrobials SUT, TET and AMO. For the agar disc-diffusion test, 701 isolates were evaluated, where a high resistance was detected for CIP (94.1%), TET (56.3%), SUT (54.3%) and AMO (48.1%), being a worrying result, since some of these antimicrobials are used to treat severe cases in humans and also in a wide way in poultry. Among the isolates, 578 were multidrug resistant and only 15 isolates (2.2%) were ESBL positive. The antimicrobial resistance between isolates from employee samples and other samples from the poultry chain were very similar, being a warning sign, since exposure to these antimicrobials can select microorganisms and resistant. A total of 74 isolates (42%) presented the presence of one or more antimicrobial resistance genes. The most detected genes in the isolates were *cmIA5*, *sul1* and *dhfrI*, totaling 21.6%, 21% and 12.5% respectively. Regarding the correlation between the phenotypic and genotypic results observed by the Kappa test, amoxicillin showed a poor agreement, while the other antimicrobials showed a slight agreement. The issue involving antimicrobial resistance should be treated with care, looking for ways to reduce the use of antimicrobials, since the adverse effects of incorrect and exaggerated use can contribute to the spread of resistance genes among microorganisms and the ecosystem.

Keywords: Resistance. Resistance. *One health*. Poultry chain. *Breakpoint*. Disk diffusion. Genes.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

TABELA 1: GENES ALVO, SEQUÊNCIAS DOS NUCLEOTÍDEOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS, TAMANHO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS, TEMPERATURA DE ANELAMENTO E REFERÊNCIAS PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA.....	42
Tabela 2. Local de amostragem e número de amostras coletadas (n= 495), número e percentual de amostras positivas e número total de isolados obtidos das amostras na Cadeia de Frango de Corte.....	44
Tabela 3. Número e percentual de resistência antimicrobiana encontrado para os 1128 isolados de <i>Escherichia coli</i> pela técnica do <i>Breakpoint</i> , frente a seis antimicrobianos testados pertencentes a seis distintas classes, obtidos em Cadeia de Frango de Corte.....	45
Tabela 4. Número e percentual de resistência antimicrobiana encontrado para os 701 isolados de <i>Escherichia coli</i> pelo método de Disco-Difusão, frente a dez antimicrobianos, obtidos de diferentes amostras da Cadeia de Frango de Corte.....	47
Tabela 5. Padrão de resistência Múltipla a Drogas (MDR) mais prevalentes entre os isolados de <i>Escherichia coli</i> (acima de cinco isolados por perfil MDR) obtidos da Cadeia de Frango de Corte.....	48
Tabela 6. Número de antimicrobianos aos quais os 701 isolados de <i>Escherichia coli</i> obtidos apresentaram resistência antimicrobiana, variando de um a até dez classes de antimicrobianos.....	49
Tabela 7. Frequências de genes de resistência observados em isolados de <i>Escherichia coli</i> (n = 176) obtidos de amostras coletadas na cadeia produtiva de frango de corte com resistência a diferentes antimicrobianos.....	51
Tabela 8. Perfil genotípico dos 14 isolados de <i>Escherichia coli</i> que apresentaram três ou mais genes de resistência e seus respectivos pontos de coleta na cadeia produtiva de frango de corte.....	52
Tabela 9. Correlação entre os resultados fenotípicos (FEN) e genotípicos (GEN) para resistência antimicrobiana de isolados de <i>Escherichia coli</i> (n = 176) obtidos em uma cadeia produtiva de frango de corte.....	53

## Apêndice

Tabela 1. Perfil de resistência antimicrobiana de 701 isolados de <i>Escherichia coli</i> pelo método de Disco-difusão, frente a dez antimicrobianos, obtidos de diferentes amostras da Cadeia de Frango de Corte.....	80
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

APT	- Água peptonada tamponada a 1%
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
IN	- Instrução Normativa
MC	- Ágar MacConkey
MDR	- Multidroga Resistente
PBP	- Proteínas de ligação à penicilina
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
RAM	- Resistência antimicrobiana
TSA	- Ágar Trypticase de Soja
TSB	- Caldo Trypticase de Soja

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
2.1 Resistência antimicrobiana: uma perspectiva sob o contexto de “One Health” ..	17
2.2. <i>Escherichia coli</i> como indicador de resistência antimicrobiana .....	20
2.3 Resistência antimicrobiana na cadeia de frango de corte .....	21
2.4 Mecanismos de ação dos antimicrobianos e mecanismos de resistência antimicrobiana .....	22
2.4.1 $\beta$ -Lactâmicos e Enzimas inativadoras de $\beta$ -Lactâmicos.....	22
2.4.2 Tetraciclina .....	25
2.4.3 Aminoglicosídeos .....	25
2.4.4 Anfencóis .....	26
2.4.5 Quinolonas .....	27
2.4.6 Inibidores da via folato.....	28
2.4.7 Macrolideo .....	29
2.5 Transferência de resistência antimicrobiana entre animais, humanos, alimentos e ambiente.....	29
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
3.1. Objetivo geral .....	31
3.1.1. Objetivos específicos.....	31
<b>4 CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> EM UMA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGO DE CORTE</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.2.1 Amostragem .....	36
4.2.2 Isolamento de <i>Escherichia coli</i> .....	37
4.2.3 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos pela técnica de diluição em ágar ( <i>Breakpoint</i> ).....	37
4.2.4 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos pela técnica do Disco-difusão e detecção de <i>E. coli</i> produtora de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) ..	38
4.2.5 Caracterização molecular dos genes de resistência dos isolados.....	39
4.2.6 Análise estatística.....	42
<b>4.3. RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
4.3.1. Isolados de <i>E. coli</i> .....	42

4.3.2. Susceptibilidade antimicrobiana de isolados de <i>E. coli</i> pela técnica de diluição em ágar .....	43
4.3.3. Resistência antimicrobiana de isolados de <i>E. coli</i> por Disco-difusão e ESBL .....	46
4.3.4 Caracterização genotípica de resistência .....	49
4.4 DISCUSSÃO .....	53
4.5 CONCLUSÃO .....	58
4.6 REFERÊNCIAS .....	60
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Para otimizar a produção e suprir a crescente demanda de proteína animal, o uso de antimicrobianos tem sido ampliado ano a ano, utilizados principalmente na forma terapêutica, profilática e como promotor de crescimento. Dada a relevância do sistema de produção avícola na cadeia produtiva de proteína animal, e as perdas econômicas decorrentes das doenças nas aves, o uso de antimicrobianos é importante, pois auxilia na redução da mortalidade e no controle e prevenção de infecções bacterianas. Porém, devido a essa constante exposição desses animais a doses subterapêuticas de antimicrobianos, principalmente na forma de tratamento não individualizado e como promotores de crescimento, criou-se uma maior pressão seletiva sobre os micro-organismos (AARESTRUP, 2005; FOUNOU et al., 2016) havendo grandes riscos de seleção de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos, que possuem mecanismos de troca de material genético e uma facilidade de disseminação desses genes de resistência, sendo um problema mundial que afeta a saúde humana e animal.

As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes à determinada classe de antimicrobiano ou então adquirir essa resistência como resultado da incorporação, inativação e mutação de genes específicos. Muitos genes de resistência aos antimicrobianos estão abrigados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, que podem ser transferidos de maneira horizontal para outros micro-organismos. Essa transferência de determinantes de resistência pode ocorrer não apenas de isolados da mesma espécie, mas também advindo de gêneros bacterianos distintos (APLEY et al., 2001; PALHARES et al., 2014; FERNANDES et al., 2016).

A ocorrência de enterobactérias multirresistentes a drogas (MDR) de importância terapêutica têm sido evidenciada em uma diversidade de animais de produção, ambientes de processamento, alimentos de origem animal e casos clínicos ao redor do mundo (ABRAHAM et al., 2015; BONELLI et al., 2014; CANTÓN et al., 2008; NORIZUKI et al., 2017). Inicialmente, a preocupação com a emergência da resistência estava centrada em bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE). Atualmente, existe um consenso de que a disseminação da resistência em bactérias Gram-negativas, principalmente as enterobactérias, representa um risco emergente, pois genes de resistência presentes em plasmídeos

podem se espalhar facilmente entre populações bacterianas em nível global, devido ao intenso trânsito de pessoas e produtos.

*Escherichia coli* é um micro-organismo pertencente à família Enterobacteriaceae, habitante regular da microbiota do trato gastrointestinal de animais e humanos, onde desempenha um papel importante na manutenção da fisiologia intestinal, no entanto, a troca de material genético entre os diversos clones desse agente, permitiram sua adaptação a novos ambientes podendo, em alguns casos, causar doenças graves. *E. coli* é utilizada como indicadora de resistência antimicrobiana, devido a facilidade de aquisição de genes de resistência e transferência gênica horizontal, não apenas a outras cepas de *E. coli*, mas também a outros micro-organismos. A pecuária tem sido relacionada como potencial reservatório de *E. coli* multirresistentes, e à disseminação da resistência usualmente associada a cepas portadoras de plasmídeos (EWERS et al., 2012; ZHENG et al., 2012; HAENNI et al., 2018).

Devido a relevância do tema, a resistência antimicrobiana (RAM) é considerada como um dos grandes desafios para a saúde humana nos dias atuais e para os próximos anos, demanda uma abordagem multidisciplinar e translacional, em sintonia com o conceito de Saúde Única (*One Health*), portanto envolvendo humanos, animais e ambiente.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Resistência antimicrobiana: uma perspectiva sob o contexto de “One Health”**

A resistência antimicrobiana não é um assunto novo e o surgimento de micro-organismos resistentes aos medicamentos é muito mais acelerado do que o desenvolvimento de novas moléculas com ação antimicrobiana, além disso, a pressão seletiva que ocorre nos micro-organismos acaba sendo favorecida pelo uso incorreto ou excessivo do antimicrobiano, seja na cadeia de produção animal ou o uso terapêutico em humanos (SOUFI et al., 2011; ABO-AMER et al., 2018). Na terapêutica veterinária e humana o controle da eficácia dos antimicrobianos é essencial contra o micro-organismo alvo, a fim de se evitar o insucesso do tratamento e, em

consequência, a maior permanência dos pacientes nos hospitais, a perdas econômicas, aumento da mortalidade (CANTAS et al., 2013; ANVISA, 2017). Estima-se que até 2050, a resistência antimicrobiana seja a principal causa de mortes em todo o mundo com uma estimativa de cerca de 10 milhões de mortes (O'NEILL, 2014).

A RAM pode ser intrínseca ou adquirida, a resistência intrínseca é geralmente mediada por cromossomos, algo fisiológico do micro-organismo ou ainda, características morfológicas da bactéria, onde a maioria ou todos as espécies e gêneros da bactéria tem uma determinada característica capaz de oferecer resistência (ABUSHAHEEN et al., 2020). Já a resistência adquirida, geralmente ocorre devido a mutações cromossômicas, modificação de enzimas ou inativação de agentes antimicrobianos, bombas de efluxo ou também por transferência de genes de resistência, principalmente via plasmídeos (VAN HOEK et al., 2011; FERRI et al., 2017; HERNANDO-AMADO et al., 2016).

Essa transferência horizontal de genes de resistência é um processo rápido de disseminação entre os micro-organismos que por estarem alocados em elementos genéticos móveis, como transposons, integrons e plasmídeos, podem transferir esses genes de micro-organismos comensais, para os patogênicos (ROTH et al., 2019). A transferência horizontal, pode ocorrer por transformação, onde ocorre a lise da bactéria e a liberação do material genético para o meio, onde outra bactéria poderá captar o DNA e incorporar o genoma; transdução, onde há incorporação acidental do DNA bacteriano cromossômico ou plasmidial por um bacteriófago durante a infecção celular, assim após a lise da bactéria, o bacteriófago vai ser como um vetor ao infectar uma nova célula e por conjugação, onde é necessário haver contato entre os micro-organismos e transferência do material genético por fimbria ou pilus a outra receptora, é principalmente codificada por plasmídeos (VAN HOEK et al., 2011; AMÁBILE-CUEVAS, 2013; FERRI et al., 2017).

A facilidade do transporte dos animais, alimentos e o tráfego de pessoas pelo mundo favorecem a disseminação de genes de RAM, contribuindo ainda mais para a complicada epidemiologia da resistência (SKOV & MONNET, 2016; LIU et al., 2016; DOUMITH et al., 2016; MAGOURAS et al., 2017). Micro-organismos resistentes podem estar presentes na microbiota humana e animal, no ambiente e alimento, devido à importância na cadeia produtiva, os humanos podem ser expostos por fontes diversas (CHANG et al., 2014; FERRI et al., 2017). Uma das maneiras de bactérias resistentes ou genes de resistência chegarem até o intestino humano, é através do

consumo de alimento, já que os processos que estes são submetidos não o deixam livre de contaminações (LOSASSO et al., 2018; ANTONELLI et al., 2019). Além disso, a contaminação cruzada com outros alimentos ou o cozimento inadequado também podem contribuir para a exposição humana (FERRI et al., 2017; LAMBRECHT et al., 2019). O intestino humano é um ótimo reservatório de genes de resistência, principalmente pelo grande número de bactérias presentes, assim, a exposição aos antimicrobianos pode contribuir para dissipar os genes entre os micro-organismos ali presentes, favorecendo disseminação (HUDDLESTON, 2014).

Os animais, principalmente os de produção, devido ao uso de antimicrobianos para fins terapêuticos, profiláticos ou como promotores de crescimento, passam a ser fontes de disseminação de micro-organismos e genes resistência (MARSHALL & LEVY, 2011; DA COSTA et al., 2013; WOOLHOUSE et al., 2015; ARGUDÍN et al., 2017). Estudos que avaliaram o banimento do uso de alguns antimicrobianos, observaram uma redução de micro-organismos resistentes e também dos seus genes de resistência, evidenciando um aspecto positivo na interrupção do uso desses medicamentos (HIKI et al., 2015; VERRETTE et al., 2019). Porém, mesmo após a redução do uso de antimicrobianos, a resistência pode se manter, devido a presença de genes de resistência, transferência horizontal de genes, e mutações, que acabam contribuindo para re-emergência ou manutenção da resistência (JOHNSEN et al., 2009).

Evidências indicam que a presença de genes de resistência nos genomas de bactérias no ambiente é algo antigo e natural (BHULLAR et al., 2012). Assim, o ambiente pode ser fonte de genes de resistência para humanos (FORSBERG et al., 2012; LUPO et al., 2012). Devido a maioria dos antimicrobianos serem excretados de forma ativa nas fezes, o meio ambiente passa a ser um reservatório de genes de resistência, já que as fezes dos animais podem ser utilizadas como esterco, contaminando o solo, água, alimentos e humanos (HEUER et al., 2011; BOOTH et al., 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um relatório que classificou os antimicrobianos como “criticamente importantes”, “altamente importantes” ou “importantes”, com base em sua importância para a medicina humana (WHO, 2019). A referida classificação teve por base alguns critérios: 1) ser a única, ou uma das terapias limitadas disponíveis, para tratar infecções bacterianas graves em pessoas; 2) para ser usado no tratamento de infecções em pessoas causadas por: (i) bactérias

que podem ser transmitidas aos seres humanos a partir de fontes não humanas, ou (ii) bactérias que podem adquirir genes de resistência de fontes não humanas. Se os antimicrobianos atendem ao critério 1 e 2, são considerados criticamente importantes, se atendem apenas ao critério 1 ou 2, são altamente importantes e se não se encaixam em nenhum dos critérios, são consideradas importantes. Sendo que as fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira e quarta geração, macrólidos, glicopeptídeos e polimixinas como antimicrobianos criticamente importantes para medicina humana, devido à disponibilidade limitada de alternativas para o tratamento de infecções bacterianas, utilizados principalmente para o tratamento de infecções humanas graves (WHO, 2019).

Entre as classes mais utilizadas para tratamento em humanos, estão os macrolídeos, penicilinas e fluoroquinolonas, já os mais frequentes para os animais são penicilinas, sulfonamidas e tetraciclina (VAN BOECKEL et al., 2017; XIONG et al., 2018). Alguns antimicrobianos são de uso exclusivo para a veterinária, como pramicina, ceftiofur, tilosina, enrofloxacina e florfenicol, porém antimicrobianos das mesmas classes são utilizadas para tratamento em humano (RABELLO et al., 2020; VAN et al., 2020). Indicando mais uma vez a importância de uma abordagem *One health* para controle da resistência. A OMS juntamente com os membros da Organização das Nações Unidas, tem elaborado planos de vigilância e monitoramento da RAM, focando no uso racional dos antimicrobianos.

## 2.2. *Escherichia coli* como indicador de resistência antimicrobiana

*Escherichia coli* é um micro-organismo da família Enterobacteriaceae, um bacilo gram negativo, não formadores de esporos, móvel pela produção de flagelos peritríquios, anaeróbios facultativos, catalase positiva, oxidase negativa, possuem a capacidade de fermentação da lactose, e possuem uma temperatura de crescimento ótima de 37°C (KONEMAN et al., 2001). Apesar da maioria dos isolados de *E. coli* fermentarem a lactose, algumas podem não fermentar, chamadas de lactose negativas (BARNES; VAILLANCOUT; GROSS, 2003).

*E. coli* é comensal da microbiota de animais de sangue quente, humanos e ambiente, é muito utilizada como um indicador de contaminação ambiental, porém algumas cepas podem ser patogênicas para o homem, animais e plantas, sendo

classificadas em *E. coli* diarreio gênicas (DEC) e patogênica extra-intestinal (ExPEC) (SCHROEDER et al., 2002; CROXEN & FINLAY, 2010; VIEIRA et al., 2011). Além disso, as carcaças durante e após o abate e processamento podem ser contaminadas por *E. coli*, seja pela evisceração das carcaças, manuseio da carcaça ou água contaminada (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ et al., 2013)

Um dos principais micro-organismos utilizados para o monitoramento de RAM é *Escherichia coli*, devido a sua facilidade de aquisição e transferência de genes de resistência para outras bactérias, constituindo assim, um relevante indicador da situação de RAM (JIANG et al., 2011; KAESBOHRER et al., 2012). A RAM em *E. coli* se desenvolve principalmente por mutações, aquisição de elementos genéticos móveis, além de outros mecanismos como bomba de efluxo, alteração da permeabilidade da membrana e produção de  $\beta$ -lactamases (BLAIR et al., 2014). Além disso se torna um ótimo micro-organismo para a pesquisa envolvendo um aspecto de saúde única, já que sua presença ocorre em variados locais e espécies. A presença de *E. coli* resistentes a antimicrobianos em carne de frango já é muito relatada, assim como no ambiente de criação e abate, favorecendo uma disseminação para o produto final, e sendo uma fonte possível de contaminação para os humanos (LEVERSTEIN-VAN HALL et al., 2011).

Assim, o uso de antimicrobianos nos animais pode selecionar dentro da microbiota comensal, micro-organismos resistentes e disseminadores de genes resistência, onde a rastreabilidade de resistência em isolados de *E. coli* na cadeia alimentar pode evidenciar a possível disseminação para os demais micro-organismos, incluindo os patógenos presentes em alimentos de origem animal (EFSA e ECDC, 2019).

### 2.3 Resistência antimicrobiana na cadeia de frango de corte

A avicultura tem se desenvolvido muito nos últimos anos, principalmente na produção de frangos de corte. Por ser uma produção rápida e em grande escala, o uso de antimicrobianos na avicultura algumas vezes é necessário, principalmente na forma tratamento, prevenção e como promotores de crescimento, sendo que este uso em sua maioria não é individual, mas em todos os animais (POOLE & SHEFFIELD, 2013; LANDONI & ALBARELLOS, 2015; SIVAGAMI et al., 2020). Porém, devido às restrições impostas pelos padrões de exportação, o consumo de antimicrobianos deve

ser controlado, considerando que alguns países não permitem o uso de aditivos na criação ou o uso é restrito a só alguns antimicrobianos como promotor de crescimento (MARON et al., 2013).

As aves são uma das espécies que mais utilizam antimicrobianos (WALL et al., 2016), passando a ser um problema, já que muitos dos antimicrobianos utilizados são excretados ainda na sua forma ativa, assim o risco de resíduos no ambiente pecuário é grande, contribuindo para o surgimento e disseminação de resistência (MARSHALL & LEVY, 2011; SIVAGAMI et al., 2020). As classes de antimicrobianos mais utilizados na cadeia avícola são os beta-lactâmicos, polipeptídeos, aminoglicosídeos, macrólidos, lincosamidas, florfenicol, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e fluoroquinolonas e ionóforos (HOFACRE et al., 2013).

O trato gastrointestinal das aves é considerado reservatório de *E. coli* produtora de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL) ou  $\beta$ -lactamase do tipo AmpC (enzimas que conferem resistência a cefalotina, cefazolina, cefoxitina, maioria das penicilinas e também inibidores das  $\beta$ -lactamases) e potencialmente uma fonte de contaminação para os humanos (DIERIKX et al., 2013; BROLUND, 2014), também já foi verificada a detecção dessas cepas em alimentos de animais de produção, principalmente de aves (OVERDEVEST et al., 2011; KLUYTMANS et al., 2013; CRECENCIO et al., 2020). Alguns estudos indicam que a carne de frango pode ser um reservatório e contribuir para a disseminação de enterobactérias produtoras de ESBL no Brasil (CASELLA et al., 2015; KOGA et al., 2015).

## 2.4 Mecanismos de ação dos antimicrobianos e mecanismos de resistência antimicrobiana

### 2.4.1 $\beta$ -Lactâmicos e Enzimas inativadoras de $\beta$ -Lactâmicos

Os  $\beta$ -Lactâmicos são considerados os antimicrobianos mais utilizados, devido à sua importância terapêutica e baixa toxicidade. Esses antimicrobianos possuem um anel beta-lactâmico, que não só determina o mecanismo de ação, inibição da biossíntese de peptidoglicanos, como também o mecanismo de resistência pela maioria dos micro-organismos (enzimas  $\beta$ -lactamases) (AZEVEDO, 2014). A família

dos  $\beta$ -Lactâmicos não contém a mesma estrutura do anel, isto é, apesar de todos possuírem o anel beta-lactâmico, a sua estrutura química não é igual, podendo conter diferentes tipos de cadeias lineares, diferenciando assim as suas características, ação e resistências às  $\beta$ -lactamases (BAPTISTA, 2013). Sendo assim dependendo dos anéis presentes, esse grupo de antimicrobianos pode ser dividido em: penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactâmicos e alguns inibidores de beta-lactamases. Os inibidores das  $\beta$ -lactamases (como o ácido clavulânico), são também considerados beta-lactâmicos, por possuírem igualmente a estrutura base, porém possuem uma cadeia lateral modificada, apresentando assim uma estrutura bicíclica, desta forma, os inibidores de  $\beta$ -lactamases, ligam-se de forma irreversível as  $\beta$ -lactamases, fazendo com que a ação do antimicrobiano não seja perdida (AZEVEDO, 2014).

As penicilinas pertencem a um dos grupos de antimicrobianos mais importantes, pois são utilizados para o tratamento de muitas doenças, tanto na cadeia animal, quanto o uso em humanos. Assim como as cefalosporinas, que também são utilizadas em humanos e animais, seu uso em animais de produção é preocupante, devido a sua importância clínica. As cefalosporinas são divididas em cinco gerações, que variam de acordo com o grupo químico que é adicionado e o espectro de ação. Por exemplo, o ceftiofur, é uma cefalosporina de terceira geração, utilizado exclusivamente para animais, ainda assim, a resistência a ceftiofur em animais é um problema para a saúde pública, já que pode apresentar resistência cruzada à ceftriaxona e a outras cefalosporinas de terceira geração de importância para o tratamento em humanos (JAHANBAKHSI et al., 2016; HAO et al., 2016).

O mecanismo de ação desse grupo é através da inibição da biossíntese de peptidoglicanos, que enfraquecem a parede celular bacteriana durante a divisão celular, levando a lise (PALZKILL, 2012). A resistência dessa classe em microorganismos gram-negativos é principalmente através da produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, que tem a capacidade de hidrolisar e causar resistência a vários tipos de  $\beta$ -Lactâmicos, também pode ocorrer por meio da alteração de proteínas de ligação à penicilina (PBP) (TANG et al., 2014; JEON et al., 2019). As PBP estão localizadas em bactérias Gram-negativas no espaço periplásmico, e para atingir o local alvo, os  $\beta$ -Lactâmicos precisam atravessar a membrana externa através de porinas, assim, se ocorrer qualquer alteração nessas proteínas ou extrusão do medicamento via bomba de efluxo, sucedera na resistência ao antimicrobiano (TANG et al., 2014).

As  $\beta$ -lactamases podem ser codificadas por genes presentes nos plasmídeos ou cromossomos, sendo caracterizada por espectro estreito (penicilinasas e cefalosporinas) e espectro amplo ( $\beta$ -lactamases de espectro estendido - ESBL), esse segundo grupo é capaz de hidrolisar vários betalactâmicos, como cefalosporinas (como cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime) e a monobactâmicos (como aztreonam), exceção dos carbapenêmicos, impedindo assim a inibição da PBP (MEYER; PICOLI, 2011; RUPPÉ et al., 2015).

As  $\beta$ -lactamases são classificadas de acordo com dois modelos, o primeiro é o de Ambler (1980), que separa em classes (A – D), de acordo com a estrutura molecular da enzima e o segundo é de acordo com Bush e Jacoby, que separam em grupos, de acordo com as propriedades bioquímicas da enzima, estrutura molecular e segregação nucleotídica (AMBLER, 1980; BUSH & JACOBY, 2010). As ESBL mais comuns registradas são *TEM*, *SHV* e *CTX-M* (BUSH & JACOBY, 2010). Onde as variantes da *CTX-M* (*CTX-M-2*, *CTX-M-8* e *CTX-M-15*) já foram relatadas em animais e humanos, evidenciando o potencial de disseminação através da cadeia alimentar, com destaque na carne de frango (KIIRU et al., 2012; EGERVÄRN et al., 2014; KAWAMURA et al., 2014). A presença de *E. coli* produtora de ESBL em animais e produtos de origem animal, pode ser devido ao uso do ceftiofur, na cadeia animal (HAMMERUM et al., 2009).

Os genes mais comumente envolvidos na resistência aos beta-lactâmicos são os genes *blaSHV-1*, *blaTEM*, *blaTEM-1*, *blaOXA-1*, *blaCMY-2* e *blaCTX-M*, sendo esse último amplamente detectado em enterobactérias isoladas de humanos, animais e alimentos (BUSH & JACOBY, 2010; D'ANDREA et al., 2013; DAY et al., 2016). Uma das possíveis explicações para a fácil disseminação do gene *CTX-M* é pelo mesmo estar presente em plasmídeos e esses, na sua maioria, são transmitidos por conjugação (BONNET, 2004). Além disso, micro-organismos que carregam o gene *CTX-M* podem apresentar resistência a outros antimicrobianos, como aminoglicosídeos e fluorquinolonas, aumentando o risco para a saúde pública. Outra preocupação é que a maioria dos ESBL está associada a plasmídeos, que podem carregar genes de outros antimicrobianos, como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, sulfametoxazol + trimetoprim e cloranfenicol, que tem importância para o tratamento em humanos (BENNETT, 2008; HUNTER et al., 2010; BROLUND et al., 2014; YASIR et al., 2020).

#### 2.4.2 Tetraciclina

As tetraciclinas são muito conhecidas pelo seu uso nos animais de produção, principalmente pelo seu amplo espectro e baixo custo. As tetraciclinas de primeira geração, como tetraciclina, clortetraciclina e oxitetraciclina, são mais utilizadas como promotores de crescimento, enquanto a de segunda geração são para o tratamento terapêutico em animais e humanos (KOO & WOO, 2011). No Brasil, o uso das tetraciclinas é proibido como aditivo melhorador de desempenho animal desde o ano de 2009, pela Instrução Normativa n. 26 (BRASIL, 2009). O seu mecanismo de ação é baseado na inibição da síntese proteica nos ribossomos, se ligando na subunidade ribossômica 30S (CHOPRA & ROBERTS, 2001), já um dos principais mecanismos de resistência à tetraciclina são através da atividade da bomba de efluxo, a proteção ribossômica e a inativação enzimática, onde vários genes *tet* conferem resistência por estes mecanismos (ROBERTS, 2005).

Os genes mais conhecidos que conferem resistência à tetraciclina são *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetJ*, *tet L* e *tetY* associados a uma proteína de efluxo em *Escherichia spp.*, onde o *tetB* é o mais encontrado em Gram-negativas (ROBERTS, 2005; ROBERTS & SCHWARZ, 2016). Além disso, foi verificado que a resistência a tetraciclina é capaz de selecionar microrganismos resistentes a outros antimicrobianos, pois o gene *tet* estão localizados nos mesmos elementos genéticos móveis que outros genes de resistência (LEVY, 2002; COX & POPKEN, 2010).

#### 2.4.3 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos de amplo espectro, os mais conhecidos são estreptomicina, canamicina, neomicina, gentamicina, amicacina, netilmicina e tobramicina, se enquadram neste grupo muito utilizado para o tratamento em humanos e animais, sua ação ocorre pela inibição da síntese de proteína. Uma redução do uso ocorreu nos anos 80, devido a sua toxicidade, sendo substituído por outros antimicrobianos (fluorquinolonas, cefalosporina de terceira geração e carbapenêmicos) que apresentavam baixa toxicidade e apresentavam um espectro de ação maior, porém, a resistência a esses antimicrobianos aumentou, e o uso de

aminoglicosídeos voltou a ser viável, buscando uma dosagem de menor toxicidade e a descoberta de novos agentes dessa classe (KRAUSE et al., 2016).

A ação desse antibiótico ocorre pela ligação com a região altamente conservada do rRNA 16S e da subunidade ribossômica 30S, que leva a interrupção da síntese de proteína do micro-organismo (KRAUSE et al., 2016). A resistência aos aminoglicosídeos assume muitas formas diferentes, incluindo modificação enzimática, modificação do local alvo por meio de uma enzima ou mutação cromossômica e bombas de efluxo (WACHINO et al., 2020).

Micro-organismos Gram-negativos podem produzir enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, que tem a capacidade de inativar a ligação com as subunidades do ribossomo, que contribui fortemente para a resistência a essa classe de antimicrobianos (BLAIR et al., 2014). Alguns genes estão relacionados com essa capacidade, como *aac(3)-II* e *aac(3)-IV*, que podem estar abrigados em elementos genéticos móveis, facilitando a transferência para outros micro-organismos ou carregar outros genes de resistência, contribuindo para que os isolados apresentem multirresistência (MAYNARD et al., 2004; KRAUSE et al., 2016). Em um estudo realizado com isolados de *E. coli* de origem humana e animal, verificou que a resistência a gentamicina está correlacionada com a resistência a outros antimicrobianos, como tetraciclina, ampicilina e sulfametoxazol (SZMOLKA et al., 2012).

#### 2.4.4 Anfenicóis

Os antimicrobianos da classe anfenicóis são muito utilizados, já que são de amplo espectro, porém, apresentam algumas restrições, por exemplo no caso de cloranfenicol, o seu uso é exclusivo para a saúde humana, mas seu uso é realizado com cautela e em últimos casos em infecções fatais, pois apresentam alguns efeitos adversos, como anemia aplástica irreversível (SHAW, 1983).

Além disso, foi proibido o uso dos princípios ativos de cloranfenicol em animais de produção e qualquer produto de origem animal, já que podem apresentar resíduos que representam um risco para saúde humana (BRASIL, 2003). Para o uso em animais, como suínos e bovinos, o mais indicado é o florfenicol, que é um derivado fluorado do cloranfenicol, onde os efeitos adversos não foram demonstrados em

animais (SCHWARZ et al., 2004). Sua ação ocorre pela inibição da biossíntese de proteínas, onde ocorre uma ligação reversível ao centro da peptidiltransferase na subunidade ribossômica 50S dos ribossomos 70S, impedindo o alongamento da cadeia peptídica (SCHWARZ et al., 2004).

Os mecanismos de resistência do micro-organismo podem ser por sistemas de efluxo, inativação por fosfotransferases, mutações do local alvo, barreiras de permeabilidade e também por inativação enzimática por acetilação da droga por meio de diferentes tipos de cloranfenicol acetiltransferases (CAT) (SHAW, 1983; MURRAY & SHAW, 1997; SCHWARZ et al., 2004). O gene *catA*, geralmente localizado em elementos genéticos móveis, codifica as cloranfenicol acetiltransferases, sendo capaz de inativar a ação do cloranfenicol, porém, devido a alteração estrutural que ocorreu no florfenicol, uma substituição do grupo hidroxila em C-3 por um resíduo de flúor, este se tornou resistente a inativação da enzima CAT, assim, isolados que são resistentes a cloranfenicol por este mecanismo, são sensíveis ao florfenicol (CANNON et al., 1990).

O gene *cmIA* e *floR*, codificam a resistência através de bombas de efluxo específicas, no caso do *cmIA* não conseguem exportar florfenicol da célula microbiana, assim, os isolados com esse gene acabam sendo suscetíveis ao florfenicol, e a resistência ao cloranfenicol e florfenicol é principalmente através da presença do gene *floR* (ROBERTS & SCHWARZ, 2016).

#### 2.4.5 Quinolonas

A primeira quinolona descrita foi o ácido nalidíxico, sendo que outras foram desenvolvidas, buscando aprimorar seu espectro de ação. Assim, a adição de um anel quinolônico a um átomo de flúor, deu origem às fluorquinolonas, com o principal representando a ciprofloxacina. O átomo de flúor que foi adicionado, melhorou a passagem desse antimicrobiano na parede celular bacteriana, dando uma ação mais ampla, menor toxicidade e passaram a ser mais eficientes em relação ao ácido nalidíxico, tornando-se uma opção melhor e mais utilizada para tratamento em humanos (ALDRED et al., 2014; CORREIA et al., 2017). Na produção animal, a enrofloxacin tem sido muito utilizada, principalmente na avicultura, onde, após a

administração, este composto perde um grupo etila, obtendo a ciprofloxacina como metabólito ativo (MOGHADAM et al., 2018).

O mecanismo de ação ocorre devido a inibição da síntese de DNA de micro-organismos por interromper a topoisomerase bacteriana tipo II e inibir a atividade catalítica da DNA girase e topoisomerase IV (ANDERSON & OSHEROFF, 2001). A resistência às quinolonas são principalmente causadas por mutações nos alvos das quinolonas, como DNA girase e Topoisomerase IV, bem como por mutações que alteram a permeabilidade da membrana externa, fazendo com que a droga seja expelida por transporte ativo e também através da aquisição de plasmídeos resistentes pela transferência horizontal (LINDGREN et al., 2003; REZAZADEH et al 2016). A resistência às quinolonas mediada por plasmídeo (PMQR) é determinada pelos genes *qnr*, que codificam proteínas que protegem o alvo (DNA girase e topoisomerase IV), sendo os principais *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* e *qnrS* (MINARINI et al., 2008; STRAHILEVITZ et al., 2009; REZAZADEH et al 2016).

#### 2.4.6 Inibidores da via folato

Sulfametoxazol é uma sulfonamida, comumente empregado em associação com o trimetoprim, que é um diamino-pirimidina, é muito utilizado na produção animal, para tratamento e como promotor de crescimento, e também empregado para o tratamento de infecções bacterianas em humanos. Tanto as sulfonamidas quanto a trimetoprima atuam na via do ácido fólico, interferindo na produção de ácido diidrofólico. O sulfametoxazol inibe competitivamente a diidropteroato sintase (DHPS), e o trimetoprim inibe a enzima dihidrofolato redutase (DHFR), ligando competitivamente ao seu sítio ativo (FRYE & JACKSON, 2013).

A resistência a esses antimicrobianos é muito comum e disseminam rapidamente, principalmente pela transferência horizontal de genes, a resistência ocorre pela aquisição de genes que codificam enzimas que não se ligam a esses compostos, como os genes *sul1* e *sul2*, que codificam a enzima diidropteroato sintetase insensíveis e a resistência ao trimetoprim, é pelos genes que codificam DHFR, tanto *dhfr* quanto *dfr*, que codificam a enzima dihidrofolato redutase insensível (SKOLD, 2001; FRYE & JACKSON, 2013).

#### 2.4.7 Macrolídeo

Os macrolídeos que mais são utilizados para o tratamento na medicina humana e veterinária são eritromicina, roxitromicina, azitromicina e claritromicina, principalmente para micro-organismos Gram-positivos, mas também utilizada para Gram-negativos, esses agentes, inibem a síntese das proteínas através da sua ligação reversível à subunidade 50s (FYFE et al., 2016).

O mecanismo de resistência aos antibióticos macrolídeos é através da modificação do ribossomo bacteriano ou da molécula do antibiótico e devido ao efluxo de macrolídeos da célula bacteriana, decorrente de alteração, seja a permeabilidade da membrana ou a expressão da bomba de efluxo (FYFE et al., 2016). Dentre os genes relacionados a resistência, a expressão de macrolídeo 2'-fosfotransferases é codificado pelo gene *mph* (A) e em sua maioria é encontrado em elementos genéticos móveis, onde podem conter outros genes de resistência a macrolídeos e genes que conferem resistência a outras classes de antibióticos (FYFE et al., 2016; DINOS, 2017).

#### 2.5 Transferência de resistência antimicrobiana entre animais, humanos, alimentos e ambiente

O problema da resistência antimicrobiana envolve uma abordagem dentro do contexto da saúde única, pois micro-organismos resistentes estão presentes em variados nichos, contribuindo como um reservatório de resistência (ROBINSON et al., 2016). Um risco envolvendo o uso indiscriminado desses antimicrobianos em animais e humanos é que essas bactérias são submetidas a muitas doses e diferentes tipos antimicrobianos, favorecendo o desenvolvimento de mecanismos de resistência a esses agentes. Inicialmente a preocupação da resistência tinha o foco em micro-organismos patogênicos, porém, as capacidades de disseminação dos genes entre as bactérias, sejam elas comensais ou patogênicas, demonstram que a resistência em micro-organismos de forma geral é um risco (MARSHALL & LEVY, 2011).

O uso de antimicrobianos tem selecionado micro-organismos resistentes, que tem a capacidade de transferir genes de resistência, quando localizados em elementos genéticos móveis, contribuindo com que possam atravessar fronteiras

(SKOV & MONNET, 2016; LIU et al., 2016; MAGOURAS et al., 2017). Mesmo quando um antimicrobiano não é mais utilizado, a resistência pode permanecer, pois os genes que codificam resistência a múltiplas drogas podem ter um elemento comum, propagando essas características de resistência que estão ligadas (PAL et al., 2015; VAN et al., 2020).

O ambiente de criação dos animais, água residual e resíduos de fezes dos animais podem ser uma fonte de perpetuação de micro-organismos e genes de resistência (WITTE, 2000; CHANG et al., 2014). Portanto, micro-organismos resistentes nos animais podem chegar até os humanos por contato direto ou indireto, como a ingestão de alimentos, disseminando pela microbiota, transferindo a resistência para os micro-organismos ali presentes (VAN DEN BOGAARD et al., 2001; MA et al., 2020). Isolados de *E. coli* resistentes a antimicrobianos também foram detectados em trabalhadores de frigoríficos ou de granja, indicando essa possível disseminação de bactérias e genes de resistência entre animais e humanos (WOOLHOUSE et al., 2015; TANSAWAI et al., 2019).

Em um estudo envolvendo três continentes diferentes, foi possível observar que os indivíduos que apresentaram maior diversidade de genes de resistência eram aqueles que faziam uso de antimicrobianos (YANG et al., 2016). Isso evidencia que a microbiota animal e humana possui uma diversidade de micro-organismos e genes de resistência, que variam para cada indivíduo, devido a alguns fatores como alimentação, meio em que vive e o uso de antimicrobianos (WATKINS & BONOMO, 2020).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Caracterizar o perfil de resistência de isolados de *Escherichia coli* obtidos de amostras da cadeia produtiva de frangos corte.

##### 3.1.1. Objetivos específicos

- Realizar a caracterização fenotípica de resistência a antimicrobianos;
- Detectar genes que conferem resistência aos antimicrobianos;
- Correlacionar os perfis fenotípicos com os genotípicos dos isolados.

#### 4 CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* EM UMA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGO DE CORTE

O objetivo do estudo foi caracterizar o perfil de resistência de isolados de *Escherichia coli* obtidos de amostras da cadeia produtiva de frangos corte. Foram coletadas 495 amostras em um abatedouro de aves regularmente fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal, localizado no estado do Paraná (Brasil). O isolamento de *E. coli* foi realizado em ágar MacConkey e as colônias com morfologia típica de *E. coli* foram confirmadas bioquimicamente. Os isolados confirmados seguiram para os testes de diluição em ágar, realizado como triagem, onde os antimicrobianos testados foram: amoxicilina - AMO (32 µg), ceftiofur – CTF (8 µg), cloranfenicol - CLO (32 µg), tetraciclina - TET (16 µg), ciprofloxacina - CIP (1 µg) e sulfametaxazol + trimetropim - SUT (76/4 µg). Para o teste disco-difusão em ágar os antimicrobianos utilizados foram AMO (10 µg); CTF (30 µg); aztreonam - ATM (30 µg); imipenem – IPM (10 µg); CIP (5 µg); TET (30 µg); gentamicina - GEN (10 µg), SUT (23,75/1,25 µg), CLO (30 µg) e azitromicina - AZI (15 µg). Para a detecção de *E. coli* produtora de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), foram utilizados quatro antimicrobianos: amoxicilina com ácido clavulânico (20/10 µg), ceftazidima – 30 µg, cefotaxima – 30 µg e cefepima – 30 µg. Para caracterização molecular, os genes *blaTEM*; *aac(3)-II*; *tetA*; *qnrS*; *dhfrI*; *sul1*; *cmIA5* e *floR* foram avaliados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Um total de 1128 isolados de *E. coli* foram identificados nas amostras de carcaça de frango após a sangria, após depenagem, após evisceração e após a saída do *chiller*, água residual da escaldagem e *chiller*, caixa de transporte das aves e fezes funcionário. Nenhum isolado foi detectado na água industrial. A resistência mais comumente detectada no *Breakpoint* foi para os antimicrobianos SUT, TET e AMO. Para o teste de disco-difusão em ágar, 701 isolados foram avaliados, onde uma alta resistência foi detectada para a CIP (94,1%), TET (56,3%), SUT (54,3%) e AMO (48,1%), sendo um resultado preocupante, já que alguns desses antimicrobianos são utilizados para tratamento de casos graves em humanos e também de forma ampla na avicultura. Dentre os isolados, 578 foram multidroga resistente e apenas 15 isolados (2,2%) foram ESBL positivas. A resistência antimicrobiana entre os isolados de amostras dos funcionários e as demais amostras da cadeia avícola foram muito semelhantes, sendo um sinal de alerta, já que a exposição a esses antimicrobianos podem selecionar micro-organismos e resistentes. Um total de 74 isolados (42%) apresentaram a presença de um ou mais genes de resistência antimicrobiana. Os genes mais detectados nos isolados foram *cmIA5*, *sul1* e *dhfrI*, totalizando 21,6%, 21% e 12,5% respectivamente. Em relação a correlação dos resultados fenotípicos e genotípicos observados pelo teste Kappa, amoxicilina demonstrou uma concordância pobre, já os demais antimicrobianos uma concordância leve. O assunto envolvendo a resistência antimicrobiana deve ser tratado com cuidado, procurando maneiras para redução do uso de antimicrobianos, já que os efeitos adversos do uso incorreto e exagerado pode contribuir para disseminação de genes de resistência entre os micro-organismos e pelo ecossistema.

Palavras-chave: Resistência. Saúde única. Antimicrobianos. Caracterização fenotípica. Genes.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A avicultura tem se desenvolvido muito nos últimos anos, principalmente na produção de frangos de corte, onde o consumo e a demanda dessa proteína vem aumentando. Com todo esse desenvolvimento, o uso de antimicrobiano na cadeia avícola se faz necessário, tanto na forma profilática, terapêutica ou como promotor de crescimento. A exposição constante desses animais a doses subterapêuticas de antimicrobianos, principalmente na forma de tratamento não individualizado, através da ração e água, criou-se uma maior pressão seletiva sobre os micro-organismos, favorecendo o desenvolvimento da resistência antimicrobiana (MIRANDA et al., 2008).

A resistência antimicrobiana é um processo natural, que acaba sendo acelerado pelo uso de antimicrobianos, que favorece com que micro-organismos sensíveis morram e os resistentes sobrevivam, possibilitando a transferência dessa resistência para outros micro-organismos (BHUSHAN et al., 2017). A resistência pode ser intrínseca, na qual já existe o conhecimento que o micro-organismo é resistente ao antimicrobiano, ou a resistência adquirida, que pode advir de mutações ou por aquisição de genes de resistência, através da transferência horizontal genes (NIKAIDO, 2009; DA COSTA et al., 2013; MADEC et al., 2018). Assim, a produção animal tem sido uma potencial fonte disseminação de resistência antimicrobiana para a microbiota intestinal humana, seja pelo contato direto com os animais, ambiente de criação, carcaças durante abate ou através do consumo de alimento de origem animal, que passam a ser uma forma de propagação de micro-organismos resistentes e genes de resistência (BENNETT, 2008; CHANG et al., 2014; FERRI et al., 2017).

Antigamente, a maior preocupação da resistência era com micro-organismos patogênicos, que poderiam causar alguma doença em humanos, porém, atualmente já é conhecido que algumas bactérias comensais, como *Escherichia coli*, tem a facilidade de aquisição e disseminação de resistência para outros micro-organismos, mesmo não sendo da mesma espécie (SHOUSA et al., 2015; FANG, 2019; RAGUPATI et al., 2019). Compreendendo que o problema da resistência antimicrobiana pertence a uma abordagem *One Health*, estudos envolvendo a pesquisa de *E. coli* como um micro-organismo indicador de resistência antimicrobiana, é importante, para verificação da real situação da resistência antimicrobiana. Sendo assim, este trabalho tem o objetivo de caracterizar o perfil de resistência de isolados

de *Escherichia coli* obtidos de amostras de animais, ambiente, produtos e humanos na cadeia produtiva de frangos corte contemplando uma perspectiva em Saúde Única.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Amostragem

Para o desenvolvimento deste estudo foi selecionado um abatedouro de aves regularmente fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal, localizado no estado do Paraná (Brasil), que abate em média cerca de 600 mil frangos por dia, onde foram realizadas quatro coletas no período de julho a setembro de 2018. Foram coletadas 495 amostras na cadeia produtiva de frangos de corte, obtidas de dez lotes de aves diferentes.

Foram coletadas amostras de carcaças de frango no frigorífico após sangria, depenagem e evisceração, onde as carcaças foram submetidas à técnica de rinsagem de superfície, com 200 mL de APT (Água peptonada tamponada a 1%), totalizando 100 carcaças por ponto, seguindo a metodologia da USDA com modificações (USDA, 2013). Foram coletadas dez amostras de água residual da escaldagem (n=10), água residual do *chiller* (n=10) e água industrial (n=10), aproximadamente 50 mL cada. Também foram coletadas amostras de carcaças após a saída do *chiller*, também pela técnica de rinsagem de superfície das carcaças em 200 mL de APT (n=100). Foram coletadas amostras de superfície do piso da caixa de transporte das aves a partir da técnica de *swab* de superfície, de quatro áreas com esponjas estéreis (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA), pré-umedecidas com 20 mL de solução salina peptona tamponada (BPS, com peptona a 0,01%, p/v, e NaCl a 0,85%, p/v), totalizando 50 amostras de 400 cm<sup>2</sup>.

Para as amostras dos humanos, foram representadas pelo *swab* fecal de 15 funcionários envolvidos na etapa da cadeia de produção avícola (propriedades rurais e abatedouro frigorífico), saudáveis, sem envolvimento em surto de origem alimentar ou que apresentassem qualquer patologia gastrointestinal, distribuídos em cinco funcionários da área limpa/fria do abatedouro, cinco da área suja/quente e cinco amostras de Médicos Veterinários do fomento. Todos os funcionários que participaram desse projeto, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, cuja o número do parecer: 3.454.359, de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres

Humanos.

Todas as amostras foram armazenadas em recipientes adequados, mantidos sob refrigeração e transportadas ao Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água – LACOMA da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, material foi devidamente acondicionado em recipientes isotérmicos e mantido sob refrigeração até o momento das análises laboratoriais

#### 4.2.2 Isolamento de *Escherichia coli*

As amostras de *swab* fecal foram semeadas diretamente no ágar MacConkey (MC, Oxoid) e incubados por 37 °C por 18 h. As amostras de esponjas das caixas de transporte foram acrescidas de 180 mL de Água Peptonada Tamponada 1% (APT, Oxoid), as amostras foram homogeneizadas em equipamento tipo *Stomacher* (*Stomacher* 400®, Seward, Worthing, Reino Unido) a 185 rpm por 2 min, e incubadas a 37 °C por 18 h (pré-enriquecimento) e, em seguida, semeadas em ágar MC. As amostras ambientais (de água) foram processadas adicionando-se um total de 225 mL de APT em 25 mL da amostra, homogeneizados em *Stomacher* por 2 min e incubados a 37 °C por 18 h e após incubação estriadas em ágar MC. As amostras de carcaças e produto final que já possuíam APT foram incubados por 37 °C por 18 h e, sem seguida, semeados em ágar MC. Após incubação, cinco colônias com morfologia típica para *E. coli* foram transferidas para Ágar Triptona de Soja (TSA, Difco™) e incubado a 36 °C por 24 h. A confirmação da *E. coli* foi feita pelos testes bioquímicos: Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato. Após confirmação, os isolados foram armazenados em caldo tripticase de soja (TSB, Difco™) com glicerol para testes posteriores.

#### 4.2.3 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos pela técnica de diluição em ágar (*Breakpoint*)

Os isolados de *E. coli* foram submetidos a testes de sensibilidade antimicrobiana a diferentes antimicrobianos, seguindo a metodologia de diluição em ágar, conforme a *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2015). Os

antimicrobianos e suas concentrações mínimas inibitórias (MIC) foram determinados conforme CLSI (2020) e CLSI VET (2018) para determinação de resistência por enterobactérias, sendo eles: amoxicilina - AMO (32 µg), ceftiofur – CTF (8 µg), cloranfenicol - CLO (32 µg), tetraciclina - TET (16 µg), ciprofloxacina - CIP (1 µg) e sulfametaxazol + trimetropim - SUT (76/4 µg). Todos os antimicrobianos testados eram da marca Sigma®. Os isolados foram cultivados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid) e incubados a 37 °C por 18 h. Posteriormente os subcultivos foram ajustados na escala 0,5 de McFarland em BHI, o que corresponde a aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL. Após essa etapa, 200 µL da cultura bacteriana turva, foram adicionadas a uma placa de 96 poços, e com o auxílio de um *pin-replicator*, foram transferidas para as placas contendo ágar Mueller-Hinton (MH, Oxoid) suplementado com a concentração selecionada dos diferentes antimicrobianos. Após a incubação a 37 °C por 16 h, os resultados foram interpretados como sensíveis e resistentes. Para cada ensaio, uma cepa pan-suscetível (*E. coli* ATCC 25922) foi incluída como controle negativo, para validar o desempenho do teste e uma placa de Ágar MH sem antimicrobianos foi utilizada para verificação da viabilidade dos isolados avaliados.

#### 4.2.4 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos pela técnica do Disco-difusão e detecção de *E. coli* produtora de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)

Com base na triagem dos isolados através do *Breakpoint*, 50% dos isolados que foram considerados sensíveis de cada ponto de coleta, juntamente com os isolados que apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano testado, totalizando 701 isolados, foram submetidos ao teste de difusão em disco de ágar (método Kirby-Bauer) usando ágar MH, conforme recomendado pelos protocolos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). Todos os antimicrobianos testados eram da marca Cecon®. Foram testados antimicrobianos pertencentes à dez classes distintas, utilizadas na produção animal e para a saúde humana: Penicilinas: amoxicilina - AMO (10 µg); Cefalosporina de terceira geração: ceftiofur - CTF (30 µg); Monobactam: aztreonam - ATM (30 µg); Carbapenema: imipenem - IPM (10 µg); fluoroquinolona: ciprofloxacina - CIP (5 µg); tetraciclina: tetraciclina - TET (30 µg); aminoglicosídeo: gentamicina - GEN (10 µg), inibidores do folato: sulfametoxazol + trimetoprima - SUT (23,75/1,25 µg), anfenicóis: cloranfenicol - CLO (30 µg) e

macrolídeo: azitromicina - AZI (15 µg). Os isolados foram cultivados em caldo BHI e incubados a 37 °C por 18 h. Posteriormente os subcultivos foram ajustados na escala 0,5 de McFarland em BHI, estriados em placa de ágar MH e após foi realizado a aplicação dos discos. O controle do teste foi realizado com uma cepa pan-suscetível de *Escherichia coli* ATCC® 25922. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 h, e realizado leitura. Os resultados foram interpretados com base nas diretrizes do CLSI (CLSI, 2020).

Na triagem para detecção de ESBL foram utilizados dois antimicrobianos, ceftazidima – CAZ (10 µg) e cefotaxima - CTX (5 µg), ambos cefalosporinas de terceira geração (EUCAST, 2013). Os isolados que apresentaram resultados com halos de inibição para ceftadizima e cefotaxima menores do que 22 e 21 mm, respectivamente, foram submetidos ao teste fenotípico confirmatório de ESBL que consistiu na realização do método de disco-difusão duplo (EUCAST, 2013). Para isso, os isolados foram cultivados em caldo BHI e incubados a 37 °C por 18 h. Posteriormente os subcultivos foram ajustados na escala 0,5 de McFarland em BHI, estriados em placa de ágar MH e realizado a aplicação dos discos: um disco central contendo a combinação de amoxicilina com ácido clavulânico - AMC (20/10 µg) e, em um raio de 20 mm a partir do disco central, foram aplicados três discos, dois de cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima – CAZ – 30 µg e cefotaxima – CTX – 30 µg) e uma cefalosporina de quarta geração (cefepima – CPM – 30 µg). O controle do teste foi realizado com uma cepa pan-suscetível de *Escherichia coli* ATCC® 25922. Foram considerados positivos para produção de enzimas ESBL os isolados de *E. coli* que apresentaram zonas de inibição aumentadas em torno de qualquer cefalosporina na direção do disco com amoxicilina com ácido clavulânico (EUCAST, 2013).

Isolados de *E. coli* foram considerados suscetíveis ou não suscetíveis, e cepas com perfil intermediário foram consideradas resistentes. Isolados de *E. coli* resistentes a mais de três classes de antimicrobianos foram definidos como multirresistentes (MDR) (ECDC; EFSA; EMA, 2017).

#### 4.2.5 Caracterização molecular dos genes de resistência dos isolados

Foram selecionados 30% (n=176 isolados) de *E. coli* por ponto de coleta, buscando isolados que apresentaram perfis distintos de resistência fenotípica através

do teste de Disco-difusão, para a correlação genotípica através da pesquisa de genes de resistência aos antimicrobianos pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Para a obtenção do DNA, os isolados foram submetidos a extração, segundo a metodologia descrita por Dias et al. (2016). O DNA obtido foi submetido à PCR para avaliação dos genes relacionados a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos – *blaTEM*; Gentamicina - *aac(3)-II*; Tetraciclina *tetA*; Ciprofloxacina - *qnrS*, Trimetoprim – *dhfrI*; Sulfonamidas - *sul1*; Cloranfenicol - *cmIA5* e *floR* (Tabela 1).

Em todos os protocolos, as reações compreenderam um volume final de 25  $\mu$ l, contendo metade do volume da *Taq Pol Master Mix 2X Green* (Cellco®), 5,0  $\mu$ l do DNA extraído, 10 pmol dos primers *forward* e *reverse* e água ultrapura livre de nucleases (Promega®) para completar o volume final. Para controle positivo foram utilizados isolados obtidos em estudo anterior (VIANA et al., 2020), sendo para os genes *blaTEM*, *tet(A)*, *qnrS* e *floR*, utilizado *Salmonella* Bredeney (cv-19); para os genes *aac(3)-II*, *dhfrI* e *sul1* foi utilizado uma cultura de *S. Bredeney* (cv-18) e para o gene *cmIA5* foi utilizado uma cultura de *S. Typhimurium* (cv-38). Para o controle negativo, foi utilizado e água ultrapura livre de nucleases (Promega®).

As sequências dos primers, os tamanhos de fragmentos esperados e a temperatura de anelamento de cada primers estão representados na tabela 1. Os produtos das reações da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, e tampão de 0,5X Tris/ÁcidoBórico/EDTA e revelados com o intercalante GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA), e visualizados em transiluminador UV.

TABELA 1: GENES ALVO, SEQUÊNCIAS DOS NUCLEOTÍDEOS PRIMERS UTILIZADOS, TAMANHO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS, TEMPERATURA DE ANELAMENTO E REFERÊNCIAS PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA

Classe	Genes	Sequência (5'->3')	Tamanho do produto	Temperatura de anelamento	Referência
β-lactâmicos	<i>blaTEM</i>	F: ATGAGTATTCAACATTTCCG	859	50°C	Aarestrup et al., 2003
		R: ACCAATGCTTAATCAGTGAG			
Aminoglicosídeo	<i>aac(3)-II</i>	F: TGAACCGCTGACGGAGCCCTC	369	57°C	Sandvang & Aarestrup, 2000
		R: GTCGAACAGGTAGCACTGAG			
Tetraciclina	<i>tet(A)</i>	F: GTGAAACCCCAACATACCCC	888	44°C	Maynard et al., 2003
		R: GAAGGCAAGCAGGATGTAG			
Quinolona	<i>qnrS</i>	F: ACGACATTCGTCAACTGCAA	417	53°C	Robicsek et al., 2006
		R: TAAATTGGCACCCCTGTAGGC			
Inibidores do Folato	<i>dhfrI</i>	F: AAGAATGGAGTTATCGGGAAATG	391	44°C	Maynard et al., 2003
		R: GGGTAAAAAAGCTGGCCTAAAAATTG			
	sul 1	F: CTTCGATGAGAGCCGGCGGC	450	50°C	Aarestrup et al., 2003
		R: GCAAGGCGGAAACCCGCGCC			
Fenicol	<i>cmIA5</i>	F: GTGACATTTACGCAGGTCCG	532	55°C	Abo-Amer et al., 2018
		R: TCGAAGCCCCATATTTCCGGT			
	<i>floR</i>	F: GACGCCCGCTATGATCCAAC	371	50°C	Maynard et al., 2003
		R: CCTGCCATCCCAAGAACTCG			

#### 4.2.6 Análise estatística

A estatística descritiva foi usada para uma caracterização dos dados de resistência. Para cada ponto de amostragem, foram calculadas as prevalências de isolados que eram resistentes. Os dados de susceptibilidade antimicrobiana são expressos como porcentagens.

A "coerência" geral entre fenótipos e genótipos resistentes foi então calculada usando o software OpenEpi (DEAN et al., 2013) Os resultados fenotípicos foram considerados o "padrão ouro" para este teste. A sensibilidade diagnóstica representa a proporção de verdadeiros positivos, enquanto a especificidade diagnóstica representa a proporção de verdadeiros negativos. A concordância dos resultados fenotípicos e genotípicos foi calculada e comparada pelo índice Kappa de Cohen (K) utilizando também o software OpenEpi (DEAN et al., 2013) e interpretada da seguinte forma:  $K < 0,00$  - concordância pobre;  $0,00 < K < 0,20$  - concordância leve;  $0,21 < K < 0,40$  - concordância justa;  $0,41 < K < 0,60$  - concordância moderada;  $0,61 < K < 0,80$  - concordância substancial;  $0,81 < K < 1,00$  - concordância quase perfeita.

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Isolados de *E. coli*

Das 485 amostras coletadas, um total de 1.128 isolados de *E. coli* foram obtidos, sendo estes de carcaças de frango após a sangria (352 isolados), depenagem (255), evisceração (224) e após a saída do *chiller* (139), água residual da escaldagem (35) e *chiller* (17), caixa de transporte das aves (39) e fezes humanas (67). Nenhum isolado de *E. coli* foi obtido de água industrial (Tabela 2).

Tabela 2. Local de amostragem e número de amostras coletadas (n= 495), número e percentual de amostras positivas e número total de isolados obtidos das amostras na Cadeia de Frango de Corte

Local de coleta (número de amostras)	Número de amostras positivas (%)	Número de isolados
Carcaças de frango após a sangria (100)	99 (99%)	352
Carcaças de frango após a depenagem (100)	85 (85%)	255
Carcaças de frango após a evisceração (100)	93 (93%)	224
Carcaças de frango após a <i>chiller</i> (100)	74 (74%)	139
Água residual da escaldagem (10)	10 (100%)	35
Água residual do <i>chiller</i> (10)	10 (100%)	17
Água industrial (10)	0 (0%)	0
Caixa de transporte das aves (50)	25 (50%)	39
Fezes humanas (15)	15 (100%)	67
Total (495)	411	1128

#### 4.3.2. Susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *E. coli* pela técnica de diluição em ágar

A susceptibilidade antimicrobiana dos 1.128 isolados de *E. coli* foi testada pela técnica de diluição em ágar para a triagem inicial. O número e o percentual de isolados resistentes a cada agente antimicrobiano é relatada na Tabela 3. Os agentes antimicrobianos ao qual a resistência foi mais comumente detectada pelo *Breakpoint* foram o sulfametoxazol + trimetoprim (43,3%), tetraciclina (35,5%) e amoxicilina (29,2%).

As amostras de carcaça após sangria, depenagem e evisceração tiveram resultados semelhantes, sendo uma resistência alta principalmente aos antimicrobianos sulfametoxazol + trimetoprim (47,3%), tetraciclina (38,9%) e amoxicilina (30,3%), com baixa resistência antimicrobiana principalmente ao ceftiofur (8,3%) e ciprofloxacina (10,8%). As amostras que representam o produto final (carcaça após saída do *chiller*), tiveram uma resistência antimicrobiana elevada para sulfametoxazol + trimetoprim (33,1%), amoxicilina (33,8%) e tetraciclina (24,4%). Já as amostras do ambiente, tanto de água residual da escaldagem quanto do *chiller* e também as amostras de caixa de transporte das aves, que representam o *status* de resistência dos isolados a campo, tiveram uma resistência alta à associação sulfametoxazol + trimetoprim (>37,1%), tetraciclina (>41%) e amoxicilina (>23,5%). Para as amostras de fezes dos funcionários, a maior resistência foi encontrada para o antimicrobiano amoxicilina (7,5%).

Tabela 3. Número e percentual de resistência antimicrobiana encontrado para os 1128 isolados de *Escherichia coli* pela técnica do *Breakpoint*, frente a seis antimicrobianos testados pertencentes a seis distintas classes, obtidos em Cadeia de Frango de Corte

Antimicrobiano	Tipo de amostra (número de isolados)						Total (n=1128)		
	Carcaça após sangria (n=352)	Carcaça após depenagem (n=255)	Carcaça após evisceração (n=224)	Carcaça após <i>chiller</i> (n=139)	Água escaldagem (n=35)	Água <i>chiller</i> (n=17)		Caixa transporte (n=39)	Fezes humana s (n=67)
Amoxicilina (32 µg)	115 (32,7%)	73 (28,6%)	64 (28,6%)	47 (33,8%)	10 (28,6%)	4 (23,5%)	11 (28,2%)	5 (7,5%)	329 (29,2%)
Ceftiofur (8 µg)	44 (12,5%)	12 (4,7%)	13 (5,8%)	6 (4,31%)	2 (5,71%)	1 (5,88%)	0 (0%)	0 (0%)	78 (6,9%)
Cloranfenicol (32 µg)	68 (19,3%)	53 (20,8%)	31 (13,8%)	15 (10,8%)	8 (22,8%)	5 (29,4%)	9 (23,1%)	0 (0%)	189 (16,8%)
Tetraciclina (16 µg)	147 (41,8%)	101 (39,6%)	75 (33,5%)	34 (24,4%)	17 (48,6%)	8 (47%)	16 (41%)	2 (3%)	400 (35,5%)
Ciprofloxacina (1 µg)	33 (9,4%)	36 (14,1%)	21 (9,4%)	12 (8,63%)	3 (14,3%)	8 (17,6%)	5 (20,5%)	2 (3%)	120 (10,6%)
Sulfametoxazol + Trimetoprim (76/4 µg)	182 (48,9%)	118 (46,3%)	93 (41,5%)	46 (33,1%)	13 (37,1%)	8 (47%)	24 (61,5%)	4 (6%)	488 (43,3%)

#### 4.3.3. Resistência antimicrobiana de isolados de *E. coli* por Disco-difusão e ESBL

Após a triagem com o *Breakpoint*, 701 isolados foram avaliados pela técnica de Disco-difusão (Tabela 4). Através dessa técnica, a resistência a ciprofloxacina foi a mais prevalente com 94,1% (660 isolados), seguido de tetraciclina (56,3%), sulfametoxazol + trimetoprim (54,4%) e amoxicilina (48,1%). Os antimicrobianos ceftiofur, imipenem e aztreonam, apresentaram menor porcentagem de resistência entre os isolados e pontos de coleta. Deste total de 701 isolados, 15 (2,2%) foram considerados ESBL positivas, sendo oito isolados provenientes de carcaça após sangria, quatro de carcaça após depenagem, uma de carcaça após evisceração e duas de água de escaldagem.

Pode-se observar pela tabela 4 que os resultados de resistência dos isolados obtidos de amostras de carcaça após sangria, depenagem e evisceração, assim como os de caixa de transporte das aves, apresentaram uma grande porcentagem de resistência aos seguintes antimicrobianos: ciprofloxacina, sulfametoxazol + trimetoprim, tetraciclina, amoxicilina e azitromicina. As amostras de carcaça após *chiller*, as maiores porcentagens de resistência foram demonstradas para ciprofloxacina (91,5%) e a menor para o ceftiofur (13,2%). Os isolados de amostras de fezes humanas apresentaram baixa resistência aos antimicrobianos testados, com a menor porcentagem de resistência para os antimicrobianos ceftiofur e sulfametoxazol + Trimetoprim (5,6%) e as maiores porcentagens de resistência para ciprofloxacina (100%), amoxicilina (38,9%) e azitromicina (38,9%). Não foi detectado nenhum isolado resistente ao antimicrobiano cloranfenicol nestas amostras.

Tabela 4. Número e percentual de resistência antimicrobiana encontrado para os 701 isolados de *Escherichia coli* pelo método de Disco-Difusão, frente a dez antimicrobianos, obtidos de diferentes amostras da Cadeia de Frango de Corte.

Antimicrobiano	Tipo de amostra (número de isolados)										Total (n=701)
	Carcaça após sangria (n=224)	Carcaça após depenagem (n=162)	Carcaça após evisceração (n=132)	Carcaça após chiller (n=91)	Água esqualdagem (n=29)	Água chiller (n=17)	Caixa transporte (n=28)	Fezes humanas (n=18)			
Amoxicilina (10 µg)	99 (44,2%)	80 (49,4%)	65 (49,2%)	55 (60,4%)	13 (44,8%)	5 (29,4%)	13 (46,4%)	7 (38,9%)			337 (48,1%)
Ceftiofur (30 µg)	56 (25%)	27 (16,7%)	13 (9,8%)	12 (13,2%)	2 (6,9%)	1 (5,9%)	4 (14,3%)	1 (5,6%)			116 (16,5%)
Aztreonam (30 µg)	76 (34%)	31 (19,1%)	33 (25%)	16 (17,6%)	4 (13,8%)	2 (11,8%)	7 (25%)	2 (11,1%)			171 (24,4%)
Imipenem (10 µg)	48 (21,4%)	33 (20,4%)	26 (19,7%)	18 (19,8%)	5 (17,2%)	4 (23,5%)	7 (25%)	2 (11,1%)			143 (20,4%)
Gentamicina (10 µg)	95 (42,4%)	58 (35,8%)	36 (27,3%)	27 (29,7%)	8 (27,6%)	4 (23,5%)	10 (35,7%)	2 (11,1%)			240 (34,2%)
Tetraciclina (10 µg)	147 (65,6%)	92 (56,8%)	66 (50%)	39 (42,9%)	16 (55,2%)	9 (52,9%)	21 (75%)	5 (27,8%)			395 (56,3%)
Ciprofloxacina (5 µg)	213 (95,1%)	149 (92%)	124 (94%)	83 (91,2%)	29 (100%)	17 (100%)	27 (96,4%)	18 (100%)			660 (94,1%)
Sulfametoxazol + Trimetoprim (23,75/1,25 µg)	136 (60,7%)	91 (56,2%)	70 (53%)	44 (48,3%)	14 (48,3%)	7 (41,2%)	18 (64,3%)	1 (5,6%)			381 (54,4%)
Cloranfenicol (30 µg)	97 (43,3%)	56 (35,6%)	43 (32,6%)	24 (26,4%)	11 (38%)	6 (35,3%)	16 (57,1%)	0 (0%)			253 (36,1%)
Azítromicina (15 µg)	89 (39,7%)	67 (41,3%)	65 (49,3%)	38 (41,8%)	9 (31%)	10 (58,8%)	18 (64,3%)	7 (38,9%)			303 (43,2%)

Foram considerados MDR 568 isolados (50,3%), divididos em 229 padrões de multirresistência. Os padrões de multirresistência mais prevalentes (acima de cinco isolados por perfil MDR) foram apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Padrão de resistência Múltipla a Drogas (MDR) mais prevalentes entre os isolados de *Escherichia coli* (acima de cinco isolados por perfil MDR) obtidos da Cadeia de Frango de Corte.

AMO	CTF	ATM	IPM	GEN	TET	CIP	SUT	CLO	AZI	Nº isolados MDR
X						X			X	5
X				X		X		X		6
X				X		X				6
X			X			X				5
X					X	X				7
						X	X	X		9
				X		X			X	7
				X		X	X			12
					X	X			X	7
					X	X	X			9
X				X		X	X			5
X			X			X	X			5
X					X	X			X	7
X					X	X	X			9
						X	X	X	X	9
				X	X	X	X			10
					X	X	X		X	5
					X	X	X	X		15
X						X	X	X	X	7
X				X	X	X			X	5
X					X	X	X	X		8
				X	X	X	X		X	5
					X	X	X	X	X	20
X	X	X		X		X	X			9
X				X	X	X	X		X	12
X					X	X	X	X	X	8
X	X	X		X	X	X	X			5
X	X	X		X	X	X	X		X	5
X	X	X		X	X	X	X	X	X	6

Legenda: Amoxicilina - AMO (10 µg); ceftiofur - CTF (30 µg); aztreonam - ATM (30 µg); imipenem - IPM (10 µg); ciprofloxacina - CIP (5 µg); tetraciclina - TET (30 µg); gentamicina - GEN (10 µg), sulfametoxazol + trimetoprima - SUT (23,75/1,25 µg), cloranfenicol - CLO (30 µg) e azitromicina - AZI (15 µg). X= Resultado resistente.

A multirresistência variou entre os diferentes locais de amostragem: carcaça após sangria, depenagem, evisceração e saída do *chiller* tiveram as porcentagens de MDR de

34,3%, 23,2%, 18,7% e 11,4% respectivamente. Já para as amostras de água de escaldagem e *chiller*, caixa de transporte e fezes humanas, 2,11%, 4,22%, 4,75 e 1,23 respectivamente. Apenas dois isolados, um de carcaça após sangria e outro de carcaça após depenagem, foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados (Tabela 6). Dos 701 isolados testados, 6,1% dos isolados foram resistentes a sete antimicrobianos, 3,3% resistentes a oito antimicrobianos, 1,3% a nove antimicrobianos e apenas um (0,2%) foi resistente aos dez antimicrobianos testados, sendo este obtido de amostra de carcaça após depenagem. Todos os 15 isolados caracterizados como ESBL positivos também foram MDR.

Tabela 6. Número de antimicrobianos aos quais os 701 isolados de *Escherichia coli* obtidos apresentaram resistência antimicrobiana, variando de um a até dez classes de antimicrobianos

Nº de antimicrobiano resistente	Nº isolados	Porcentagem (%)
Sensível a todos os antimicrobianos testados	2	0,3
Resistente a 1 classe	35	5,0
Resistente a 2 classes	96	27,4
Resistente a 3 classes	118	16,8
Resistente a 4 classes	136	19,4
Resistente a 5 classes	126	18,0
Resistente a 6 classes	112	16,0
Resistente a 7 classes	43	6,1
Resistente a 8 classes	23	3,3
Resistente a 9 classes	9	1,3
Resistente a 10 classes	1	0,2

#### 4.3.4 Caracterização genotípica de resistência

Para a detecção dos genes de resistência *blaTEM*, *aac(3)-II*, *tetA*, *qnrS*, *dhfrI*, *sul1*, *cmlA5* e *floR* foram selecionados 30% em cada ponto de coleta, correspondendo a 176 isolados após o teste de Disco-Difusão. Um total de 74 isolados (42%) apresentaram a presença de um ou mais genes de resistência antimicrobiana, e 57,9% dos isolados de *E. coli* não apresentavam os genes de resistência investigados. Os genes mais detectados foram *cmlA5* (21,6%), *sul1* (21%) e *dhfrI* (12,5%) (Tabela 7). Uma baixa porcentagem foi detectada para os genes *aac(3)-II* (2,8%), *tetA* (6,2%) e *blaTEM* (7,9%). Nenhum dos isolados testados apresentaram os genes de resistência *qnrS* e *floR*.

Em 14 isolados foi possível observar a detecção simultânea dos genes *sul1* e *dhfrI* (Tabela 8). O número máximo de genes identificados em um único isolado foram cinco (*blaTEM*, *tetA*, *dhfrI*, *sul1*, *cmlA5*) em uma amostra obtida em carcaça após a sangria (Tabela 8). Em quatro isolados ESBL positivos fenotipicamente apresentaram genes de resistência, sendo que um deles apresentou quatro genes simultaneamente: *blaTEM*, *dhfrI*, *sul1* e *cmlA5* em uma amostra de carcaça após sangria. Os outros três isolados ESBL apresentaram os genes de resistência *blaTEM* e *cmlA5* (carcaça após evisceração), *dhfrI* (carcaça após sangria) e *sul1* (água de escaldagem).

Em relação a correlação dos resultados fenotípicos e genotípicos observados, a maior discordância foi evidenciada para a resistência à amoxicilina, para as quais vários isolados foram fenotipicamente positivos, mas genotipicamente negativos (n=62). Com base no teste Kappa, amoxicilina demonstrou uma concordância pobre (K=-0,052), já os demais antimicrobianos uma concordância leve (Tabela 9).



Tabela 8. Perfil genotípico dos 14 isolados de *Escherichia coli* que apresentaram três ou mais genes de resistência e seus respectivos pontos de coleta na cadeia produtiva de frango de corte.

<b>Perfil genotípico</b>	<b>Nº de isolados</b>	<b>Ponto de coleta</b>
<i>blaTEM; aac(3)II; cmlA5</i>	1	Carcaça após sangria
<i>blaTEM; dhfrI; sul1</i>	1	Carcaça após sangria
<i>blaTEM; dhfrI; sul1; cmlA5*</i>	1	Carcaça após sangria
<i>blaTEM; tetA; cmlA5</i>	1	Água escaldagem
<i>blaTEM; tetA; dhfrI; sul1; cmlA5</i>	1	Carcaça após sangria
<i>dhfrI; sul1; cmlA5</i>	5	Carcaça após sangria; após evisceração e após <i>chiller</i>
<i>tetA; dhfrI; cmlA5</i>	1	Carcaça após evisceração
<i>tetA; dhfrI; sul1; cmlA5</i>	2	Carcaça após sangria e carcaça após <i>chiller</i>
<i>tetA; sul1; cmlA5</i>	1	Carcaça após evisceração

\*isolado de *Escherichia coli* ESBL positivo.

Tabela 9. Correlação entre os resultados fenotípicos (FEN) e genotípicos (GEN) para resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* (n = 176) obtidos em uma cadeia produtiva de frango de corte.

Classe	Antimicrobiano	Resultados coerentes				Resultados incoerentes				Cohen's Kappa <sup>2</sup>	
		Ambos resistente	Ambos sensível	FEN resistência & GEN sensível	GEN resistência & FEN sensível	Sensibilidade %	Especificidade %	K	CI 95%		
β-lactâmicos	Amoxicilina	3	101	62	10	4.62	90.9	-0,052	(-0.15 - 0.04)		
Aminoglicosídeo	Gentamicina	4	91	80	1	4.76	98.9	0.038	(-0.013 - 0.089)		
Tetraciclina	Tetraciclina	9	51	114	2	7.32	96,2	0.022	(-0.026 - 0.071)		
Quinolona	Ciprofloxacina	0	4	172	0	NC	100	NC	NC		
Antifúngicos	Cloranfenicol	24	71	67	14	26.4	83.5	0.097	(-0.022 - 0.216)		

FEN = resultado fenotípico; GEN = resultado genotípico. NC: não calculado. Resultados coerentes: se o gene específico estava presente e o isolado era resistente ao antimicrobiano correlacionado ou se o gene específico estava ausente e o isolado era suscetível ao antimicrobiano correlacionado. Resultados incoerentes: se o gene específico estava presente, mas o isolado era suscetível ao antimicrobiano correlacionado ou se o gene específico estava ausente, mas o isolado era resistente ao antimicrobiano correlacionado. K: valor de referência Kappa, IC 95%; intervalo de confiança a 95%. Interpretação Kappa de Cohen: K <0,00 - concordância pobre; 0,00 <K <0,20 - concordância leve; 0,21 <K <0,40 - concordância justa; 0,41 <K <0,60 - concordância moderada; 0,61 <K <0,80 - concordância substancial; 0,81 <K <1,00 - concordância quase perfeita.

#### 4.4 DISCUSSÃO

A importância econômica da cadeia de frango de corte, suas diversas etapas de produção e o uso de antimicrobianos faz com que seja um excelente reservatório de micro-organismos e genes de resistência. Desta forma, a pesquisa da *Escherichia coli* como indicador de resistência antimicrobiana é importante, principalmente pela facilidade de aquisição e transferência horizontal de genes, contribuindo para verificação da situação real da RAM, envolvendo o animal, o humano e o ambiente (JIANG et al., 2011; KAESBOHRER et al., 2012).

No estudo atual e conforme esperado, o isolamento de *E. coli* ocorreu em todos os pontos coletados, sendo que o maior número de amostras positivas ocorreu em amostras de carcaça após a etapa de sangria, que pode ser devido a origem fecal com consequente contaminação das penas das aves (BUSS et al., 2019). O menor percentual de ocorrência de *E. coli* envolvendo amostras de carcaça foi na saída do *chiller*, evidenciando que durante o processo de abate houve redução da presença do micro-organismo, provavelmente por efeito do processo tecnológico aplicado. A presença desse indicador na água pode contribuir para a sobrevivência e disseminação do micro-organismo pelo abatedouro, já que pode ocorrer uma contaminação cruzada da carcaça durante os processos de escaldagem e resfriamento (ABU-RUWAIDA et al., 1994).

Em relação ao perfil de resistência dos isolados, uma alta resistência antimicrobiana foi detectada frente a ciprofloxacina, tetraciclina, sulfametoxazol + trimetoprim, amoxicilina e azitromicina, sendo um resultado preocupante, já que alguns desses antimicrobianos são utilizados em humanos para casos graves e também em aves, seja de forma profilática, terapêutica ou promotor de crescimento (Tabela 4). A permanência dessa alta porcentagem de micro-organismos resistentes na cadeia produtiva de frango de corte pode ser resultado de mutações espontâneas ou da aquisição e disseminação de genes de resistência, devido principalmente ao uso de antimicrobianos nos animais (DA COSTA et al., 2013). Outros trabalhos envolvendo a pesquisa de *E. coli* na cadeia de frango de corte também evidenciaram perfis de resistência semelhantes ao observados no presente estudo (JIANGUO et al., 2012; KORB et al., 2015; BEZERRA et al., 2016).

A resistência às fluorquinolonas, como a ciprofloxacina (94,1%), deve ser considerada como um sinal de alerta em saúde pública, já que é um antimicrobiano criticamente importante e seu uso é recomendado apenas para a saúde humana (WHO, 2019; SIN et al., 2020). Resultados semelhantes ao presente estudo, com uma alta porcentagem de resistência à ciprofloxacina, mesmo quando não utilizados durante a criação das aves, foram detectados em isolados de *E. coli* de amostras de frango de corte em vários países (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ et al., 2013; DOREGIRAE et al., 2018; MUCH et al., 2019; POURHOSSEIN et al., 2020). Tem crescido muito em todo o mundo a resistência a fluorquinolonas, não apenas em isolados *E. coli* comensais, mais também de patógenos de importância para a saúde humana (DOBIASOVA et al., 2013; SAMANTA et al., 2014; VIANA et al., 2019).

No presente estudo, todos os isolados de *E. coli* ESBL positivos fenotipicamente apresentaram resistência simultânea a ciprofloxacina, o que já foi detectado em outros estudos, devido principalmente por estarem abrigados nos mesmos elementos genéticos móveis (LOWE et al., 2012; MATSUMURA et al., 2013; DOBIASOVA et al., 2013). Quando os isolados de *E. coli* produtores de ESBL estão associadas em plasmídeos podem abrigar genes de resistência de outros antimicrobianos, como fluorquinolonas, aminoglicosídeos e tetraciclina (CARATTOLI, 2009; DOLEJSKA et al., 2013). Um dos problemas da localização de genes de resistência em plasmídeos, é pela perpetuação desses genes, já que podem carregar genes que conferem resistência a outras classes antimicrobianas no mesmo plasmídeo, podem continuar a selecionar micro-organismos resistentes e se espalhar mesmo que não estejam sujeitos a uma pressão seletiva pelo uso do antimicrobiano (ENNE, 2010).

Foi detectada uma baixa prevalência ESBL nos isolados, apenas 2,1%. Resultados semelhantes foram obtidos em um trabalho no Irã, envolvendo isolados de *E. coli* de amostras de aves e fezes humanas onde 6,3% de ESBL foi detectada nas aves e nenhum isolado dos trabalhadores (DOREGIRAE et al., 2018). No presente estudo, todos os isolados ESBL foram MDR tendo sido detectados os genes *blaTEM*; *dhfrI*; *sul1*; *cmIA5* (Tabela 8), indicando que a resistência pode ser mantida através da co-seleção de genes de resistência de várias classes de antimicrobianos, e não somente pela exposição aos antimicrobianos previamente (BENNETT, 2008; BROLUND et al., 2014; YASIR et al., 2020).

A enrofloxacin, outra fluoroquinolona, é muito utilizada na avicultura de corte, quando esse antimicrobiano é administração pode ocorrer sua biotransformação no

fígado, formando como metabolito ativo a ciprofloxacina, o que foi comprovado em outro estudo em humanos onde os micro-organismos intestinais apresentaram aumento da resistência a ciprofloxacina quando era utilizada a enrofloxacin (CHEN et al., 2011). Além disso, como todas as fluorquinolonas possuem o mecanismo de inibição dos genes da topoisomerase levando à inibição da replicação do DNA, a resistência antimicrobiana a qualquer um deles, conferirá resistência a todos os outros (ODOCH et al., 2018).

O gene *qnrS* que confere resistência a ciprofloxacina através da ligação à DNA-girase à Topoisomerase IV, impedindo a ação do antimicrobiano, não foi detectado neste estudo (Tabela 7). Porém, existem outros genes correlacionados a resistência às quinolonas mediada por plasmídeo, como a *qnrA*, *qnrB*, assim como outros mecanismos e genes, como as mutações pontuais nas regiões determinantes da resistência às quinolonas do DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) e dos genes da topoisomerase IV (*parC* e *parE*) (HOPKINS et al., 2005). Mutações dupla no gene *gyrA*, ocorrem através de substituições de aminoácidos em algumas posições, geralmente a serina localizada no códon 83 e 87 que é substituído por outro aminoácido, a leucina, que alteram o sítio de ligação do antimicrobiano, reduzindo a afinidade e impedindo a ação do mesmo (SAYAH et al., 2005; ALESSIANI, 2009; ODOCH et al., 2018).

Foi detectado no presente estudo uma resistência em 54,4% dos isolados relacionada à associação sulfametoxazol + trimetoprim, evidenciando que o uso de antimicrobianos contribui diretamente para desenvolvimento da resistência, já que houve o relato de que foi utilizada esta associação de antimicrobianos em lotes estudados. Uma porcentagem alta de resistência a esse antimicrobiano (61,1%) também foi detectado nas amostras de caixa de transporte, e este alto percentual também pode explicar a baixa taxa metabólica o que proporciona a excreção nas fezes (SIVAGAMI et al., 2020). Os resíduos de antimicrobianos excretados, juntamente com os antimicrobianos que são administrados via ração animal que não são consumidos, atingirão os sedimentos do solo diretamente, levando a uma seleção de micro-organismos resistentes (SIVAGAMI et al., 2020).

Atualmente no Brasil o uso da tetraciclina como aditivo alimentar na produção de aves é proibido (BRASIL, 2009), porém o uso na forma terapêutica para aves ainda é permitido. No estudo atual foi obtido uma alta resistência a tetraciclina (Tabela 4), condizente com outros trabalhos (ZHANG et al., 2012; STELLA et al., 2013). Em relação a presença do gene *tetA*, que codificam bombas de efluxo, apenas 6,2% dos isolados apresentaram o gene, e também apresentaram uma concordância leve entre o resultado

fenotípico e genotípico (Tabela 9), sendo explicado pela diversidade de genes que codificam resistência a essa classe, cerca de 36 (CHOPRA & ROBERTS, 2001). No estudo do Ghanbarpour et al. (2020), uma baixa presença de genes de resistência de *tetA* foi detectada, mesmo com uma alta resistência fenotípica observada. As tetraciclinas, sulfonamidas e penicilinas são muito utilizadas na produção animal, e taxas de resistência mais alta a estes antimicrobianos são esperadas (VAN BOECKEL et al., 2017).

A resistência a amoxicilina foi comum entre os isolados (Tabela 4) e, por ser um antimicrobiano muito utilizado na cadeia de frangos de corte, pode favorecer a resistência antimicrobiana. Porém o gene *blaTEM*, que é capaz de hidrolisar penicilina e cefalosporinas de 1ª geração (ALI et al., 2018), obteve a maior discordância em relação a frequência aos resultados fenotípicos e genotípicos observados (Tabela 9), onde vários isolados foram fenotipicamente positivos, mas genotipicamente negativos, apresentando uma concordância pobre, sendo explicada principalmente pela diversidade de gene da classe (BUSH & JACOBY, 2010; D'ANDREA et al., 2013; DAY et al., 2016).

Cloranfenicol teve o uso proibido em animais a partir de 1998, e é recomendado apenas para tratamento em humanos (BRASIL, 2003), sendo considerado um antimicrobiano de importância crítica. Mesmo não apresentando uma alta porcentagem de resistência fenotípica ao Cloranfenicol, o gene mais detectado foi o *cmIA5*, em 21,6% dos isolados de *E. coli*, apresentando uma concordância leve entre o fenotípico e genotípico (Tabela 9). O uso de florfenicol é permitido apenas em animais, sendo um análogo estrutural fluorado de tianfenicol e cloranfenicol, pode selecionar para resistência cruzada entre patógenos bacterianos, o que pode ser dos motivos de manter a resistência ao cloranfenicol mesmo sem o seu uso na produção animal (WHITE et al., 2000). Alguns micro-organismos podem abrigar genes silenciados de resistência antimicrobiana e se tornam inativados devido a um defeito genético, chamados "*silencing of antibiotic resistance by mutation*" (SARM), dos quais podem não expressar a resistência fenotípica e serão classificados como sensíveis nos testes fenotípicos (KIME et al., 2019).

Assim como observado no presente estudo, o gene *floR* não foi detectado em nenhum isolado em pesquisa realizada em cadeia de suínos nos Estados Unidos da América (EUA), onde o gene *cmIA5* foi mais detectado entre os isolados de *E. coli* e o gene *floR* foi menos frequente (TRAVIS et al., 2006). Assim, a presença de *E. coli* resistentes a esse antimicrobiano em animais e a excreção desses agentes e genes de

resistência diretamente no ambiente representa um risco, já que pode haver uma contaminação direta ou através do alimento, chegando até a microbiota humana e perpetuando a resistência entre outros micro-organismos comensais e patogênicos ali presentes (WHO, 2011).

Isolados de *E. coli* obtidos de amostras de carcaça após o *chiller*, que já podem representar o produto final, apresentaram uma resistência alta a alguns antimicrobianos testados (Tabela 4), o que também foi evidenciado por ZHAO et al. (2012) em amostras de produtos cárneos bovinos, suínos, aves e perus onde a maior resistência aos antimicrobianos foi detectada em isolados de carne de frango. No estudo atual, dos 20 isolados testados para genes de resistência nas amostras de carcaça após *chiller*, os genes *dhfrI* (35%), *sul1* (35%) e *cmIA5* (25%) foram os mais detectados. A presença destes genes de resistência podem contribuir com a disseminação de genes de resistência para a microbiota endógena humana (VAN DEN BOGAARD et al., 2001).

De maneira geral a resistência dos isolados de *E. coli* das amostras de fezes humanas foi alta (Tabela 4), semelhantes aos encontrados na literatura (ALALI et al., 2010; KORB et al., 2015). Os isolados de *E. coli* das amostras de fezes humanas apresentaram resistência a praticamente os mesmos antimicrobianos que as demais amostras da cadeia de frango de corte (Tabela 4). Entre esses antimicrobianos com resistência similar, estão amoxicilina, ciprofloxacina e azitromicina, que são utilizados para o tratamento em humanos e animais. Esse resultado pode sugerir que além do uso direto desses antimicrobianos pelos humanos, a produção animal é um cenário importante, pois permite a exposição humana indireta aos antimicrobianos ou aos micro-organismos resistentes através de animais, resíduos e produtos (WOON & FISHER, 2016).

Em um estudo nos EUA, identificaram-se isolados de *E. coli* resistentes a antimicrobianos de humanos e produtos avícolas muito semelhantes entre si sugerindo que esses isolados humanos possam ter sido derivados das aves (JOHNSON et al., 2007). Um outro estudo realizado com isolados de *E. coli* de trabalhadores da pecuária e trabalhadores de restaurantes da mesma região, evidenciou que os isolados obtidos dos trabalhadores da pecuária eram mais resistentes aos antimicrobianos, demonstrando que o contato com os animais pode ser uma fonte de resistência (CHO et al., 2012). Assim, o uso de antimicrobianos na cadeia produtiva animal gera um impacto para a saúde pública, principalmente por que o intestino humano é um ótimo reservatório de genes de resistência, onde pode ocorrer muita troca de material genético e mutações,

contribuindo para elevar as possíveis falhas terapêuticas, aumento da mortalidade e perdas econômicas (HUDDLESTON, 2014; SIVAGAMI et al., 2020).

A azitromicina, aztreonam, imipenem e gentamicina também entram no grupo de antimicrobianos criticamente importantes de mais alta prioridade para a medicina humana (WHO, 2019) e a resistência a eles variou entre 20,4% e 43,2% (Tabela 4). Essa resistência é considerada um problema para a saúde pública, já que uma prevalência de resistência de 10-20% em antimicrobianos criticamente importantes é considerada mais grave do que uma resistência acima de 50% para antimicrobianos menos importantes no tratamento em humanos (HANON et al., 2015). O antimicrobiano imipenem, da classe dos carbapenemas, é importante para o tratamento de infecções, principalmente pelo seu amplo espectro e sua ação contra micro-organismos produtores de beta-lactamases (MIRBAGHERI et al., 2015). No entanto, uma resistência elevada foi detectada no estudo atual, representando um risco para saúde pública.

O isolamento de *E. coli* resistentes na água de escaudagem e do *chiller* também foi elevado (Tabela 4), onde ocorreu a detecção de resistência a antimicrobianos de importância para a saúde humana, como ciprofloxacina, cloranfenicol e azitromicina. Na água de escaudagem e *chiller* foram detectados genes de resistência (Tabela 7), indicando que essa fonte ambiental, pode servir como um reservatório de bactérias e genes de resistência, contribuindo para dispersão para o alimento e humanos. Além disso, essa água residual vai ser destinada para tratamento e os micro-organismos resistentes e genes de resistência presentes podem ser disseminados através do solo e água (CHEN et al., 2017; HONG et al., 2018; ANDRADE et al., 2020).

A concordância pobre (gene *blaTEM*) ou leve entre os fenótipos e genótipos de resistência observados neste estudo não é um fenômeno incomum, e pode ocorrer devido a outros genes de resistência estarem envolvidos com a resistência antimicrobiana ou porque a presença do gene não é suficiente para expressar uma resistência significativa ao antimicrobiano. Além disso, a deleção da região promotora do gene também pode contribuir para a não expressão da resistência (VK et al., 2019).

#### 4.5 CONCLUSÃO

Uma porcentagem alta de resistência fenotípica foi observada neste estudo, todos os isolados de *E. coli*, exceto dois, foram resistentes a pelo menos um dos

antimicrobianos pesquisados, e grande parte desses isolados (50,3%) foram multirresistente. A similaridade da resistência antimicrobiana entre os isolados de amostras de funcionários, com as demais amostras da cadeia avícola foi detectada, principalmente para os antimicrobianos amoxicilina, tetraciclina, ciprofloxacina e azitromicina. Esses antimicrobianos são de importância para tratamento de infecções bacterianas, sendo um sinal de alerta para a saúde pública, já que a exposição a esses antimicrobianos e a troca de material genético entre os micro-organismos pode facilitar o aumento da resistência.

Grande parte dos isolados testados carregavam os genes de resistência *dhfrI*, *sul1* e *cmIA5*, que conferem resistência às sulfonamidas, trimetoprim e ao cloranfenicol, respectivamente. Para a correlação dos resultados fenotípicos e genotípicos, a maior discordância foi evidenciada para a resistência à amoxicilina, para as quais vários isolados foram fenotipicamente positivos, mas genotipicamente negativos. Com base no teste Kappa, amoxicilina demonstrou uma concordância pobre, já os demais antimicrobianos uma concordância leve. Isso se deve principalmente pela diversidade de genes que podem codificar a resistência ao determinado antimicrobiano e também por que outros mecanismos de resistência podem estar envolvidos. Sendo assim, mais estudos são necessários, principalmente o sequenciamento do genoma completo, que permite uma análise mais completa dos genes e mecanismos de resistentes dos isolados.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

ABO-AMER, A. E., SHOBRAK, M. Y., & ALTALHI, A. D. Isolation and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from farm chickens in Taif, Saudi Arabia. **Journal of global antimicrobial resistance**, 15, 65-68, 2018.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2020. 2020. Disponível em: <<https://abpa-br.org/relatorios/>>. Acesso em: 21/01/2021.

ABU-RUWAIDA, A. S., SAWAYA, W. N., DASHTI, B. H., MURAD, M., & AL-OTHMAN, H. A. Microbiological quality of broilers during processing in a modern commercial slaughterhouse in Kuwait. **Journal of food protection**, 57(10), 887-892, 1994.

ALALI, W. Q., SCOTT, H. M., & NORBY, B. Assessing the similarity of antimicrobial resistance phenotypes among fecal *Escherichia coli* isolates from two aggregated occupational cohorts of humans versus swine using cluster analysis and multivariate statistics. **Preventive veterinary medicine**, 94(1-2), 77-83, 2010.

ALESSIANI, A., DI GIANNATALE, E., PERILLI, M., FORCELLA, C., AMICOSANTE, G., & ZILLI, K. Preliminary investigations into fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* strains resistant to nalidixic acid isolated from animal faeces. **Veterinaria Italiana**, 45(4), 521-527, 2009.

ALI, T., ALI, I., KHAN, N. A., HAN, B., & GAO, J. The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. **BioMed research international**, 2018.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, E., CANCELO, A., DÍAZ-VEGA, C., CAPITA, R., & ALONSO-CALLEJA, C. Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: A comparison of agar disc diffusion and Sensi Test Gram-negative methods. **Food Control**, 30(1), 227-234, 2013.

ANDRADE, L., KELLY, M., HYNDS, P., WEATHERILL, J., MAJURY, A., & O'DWYER, J. Groundwater resources as a global reservoir for antimicrobial-resistant bacteria. **Water research**, 170, 115360, 2020.

BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British journal of pharmacology**, 153(S1), S347-S357, 2008.

BERSOT, L.D.S., CAVICCHIOLI, V.Q., VIANA, C., BURIN, R.K. C., CAMARGO, A. C., DE ALMEIDA NOGUEIRA PINTO, J. P., ... DESTRO, M. T. (2019). Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Diversity of *Salmonella* along the Pig Production Chain in Southern Brazil. **Pathogens**, 8(4), 204. doi:10.3390/pathogens8040204

BEZERRA, W. G. A., DA SILVA, I. N. G., VASCONCELOS, R. H., MACHADO, D. N., DE SOUZA LOPES, E., LIMA, S. V. G., ... & MACIEL, W. C. Isolation and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O: 6, 8) in broiler chickens. **Acta Scientiae Veterinariae**, 44, 1-7, 2016.

BHUSHAN, C., KHURANA, A., SINHA, R., & NAGARAJU, M. Antibiotic resistance in poultry environment: Spread of resistance from poultry farm to agricultural field. **Centre for Science and Environment**: New Delhi, India, 2017.

BLAIR, JM, RICHMOND, GE E PIDDOCK, LJ. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 9, p. 1165-117, 2014.

BUESS, S., ZURFLUH, K., STEPHAN, R., & GULDIMANN, C. Quantitative microbiological slaughter process analysis in a large-scale Swiss poultry abattoir. **Food Control**, 105, 86-93, 2019.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 53(6), 2227-2238, 2009.

CHANG, Q., WANG, W., REGEV-YOCHAY, G., LIPSITCH, M., & HANAGE, W. P. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? **Evolutionary applications**, 8(3), 240-247, 2014.

CHEN, T., YUAN, J., FENG, X., WEI, H., & HUA, W. Effects of enrofloxacin on the human intestinal microbiota in vitro. **International journal of antimicrobial agents**, 37(6), 567-571, 2011.

CHEN, Q. L., LI, H., ZHOU, X. Y., ZHAO, Y., SU, J. Q., ZHANG, X., & HUANG, F. Y. An underappreciated hotspot of antibiotic resistance: the groundwater near the municipal solid waste landfill. **Science of the Total Environment**, 609, 966-973, 2017.

CHO, S. H., LIM, Y. S., & KANG, Y. H. Comparison of antimicrobial resistance in Escherichia coli strains isolated from healthy poultry and swine farm workers using antibiotics in Korea. **Osong public health and research perspectives**, 3(3), 151-155, 2012.

CHOPRA, I., & ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and molecular biology reviews**, 65(2), 232-260, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition*. CLSI document M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M100-S27*, Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals*. 4th ed. CLSI supplement VET08. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2020.

DA COSTA, P. M., LOUREIRO, L., & MATOS, A. J. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. **International journal of environmental research and public health**, 10(1), 278-294, 2013.

DA COSTA, P.M.; LOUREIRO, L.; MATOS, A.J.F. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the Interface between humans, animals and the environment. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 10, p. 278-294, 2013.

Dean, A. G., Sullivan, K. M., & Soe, M. M. (2013). OpenEpi: open source epidemiologic statistics for public health, version.

DIAS, REGIANE C.B. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Apmis**, v. 124, n. 4, p. 299-308, 2016.

DOBIASOVA, H., DOLEJSKA, M., JAMBOROVA, I., BRHELOVA, E., BLAZKOVA, L., PAPOUSEK, I., ... & LITERAK, I. Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. **FEMS microbiology ecology**, 85(3), 604-611, 2013.

DOLEJSKA, M., VILLA, L., HASMAN, H., HANSEN, L., & CARATTOLI, A. Characterization of IncN plasmids carrying bla CTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 68(2), 333-339, 2013.

DOREGIRAEI, F., ALEBOUYEH, M., NAYERI FASAEI, B., CHARKHKAR, S., TAJEDDIN, E., & ZALI, M. R. Changes in antimicrobial resistance patterns and dominance of extended spectrum  $\beta$ -lactamase genes among faecal *Escherichia coli* isolates from broilers and workers during two rearing periods. **Italian Journal of Animal Science**, 17(3), 815-824, 2018.

ECDC; EFSA; EMA. ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. European Centre for Disease Prevention and Control. European Food Safety Authority. European Medicines Agency. **EFSA Journal**, p. 4872. 2017.

ENNE, V. I. Reducing antimicrobial resistance in the community by restricting prescribing: can it be done?. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, 65(2), 179-182, 2010.

EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, version 1.0 Sweden, 2013.

FANG, J., SHEN, Y., QU, D. E HAN, J. Perfis de resistência antimicrobiana e características de integrons em linhagens de *Escherichia coli* isolados de um grande

matadouro centralizado de suínos e seus mercados a jusante na província de Zhejiang, na China. **Food Control**, v. 95, p. 215-222, 2019.

FERRI, M., RANUCCI, E., ROMAGNOLI, P., & GIACCONE, V. Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2857-2876, 2017.

GAUTRET, P., LAGIER, J. C., PAROLA, P., MEDDEB, L., MAILHE, M., DOUDIER, B., ... & RAOULT, D. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. **International journal of antimicrobial agents**, 105949, 2020.

GHANBARPOUR, R., AFLATOONIAN, M. R., ASKARI, A., ABIRI, Z., NADERI, Z., BAGHERI, M., ... & ASKARI, N. Domestic and game pigeons as reservoirs for *Escherichia coli* harbouring antimicrobial resistance genes. **Journal of global antimicrobial resistance**, 22, 571-577, 2020.

HANON, J. B., JASPERS, S., BUTAYE, P., WATTIAU, P., MÉROC, E., AERTS, M., ... & VAN DER STEDE, Y. A trend analysis of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from several livestock species in Belgium (2011–2014). **Preventive veterinary medicine**, 122(4), 443-452, 2015.

HONG, P. Y., JULIAN, T. R., PYPE, M. L., JIANG, S. C., NELSON, K. L., GRAHAM, D., ... & MANAIA, C. M. Reusing treated wastewater: consideration of the safety aspects associated with antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes. **Water**, 10(3), 244, 2018.

HOPKINS, K. L., DAVIES, R. H., & THRELFALL, E. J. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. **International journal of antimicrobial agents**, 25(5), 358-373, 2005.

JIANGUO, Y., WEIHUA, C., HUAFU, W., & WEI, Z. Antimicrobial susceptibility and virulence factors of *Escherichia coli* isolates obtained from faeces samples of chickens in east China. **African Journal of Microbiology Research**, 6(7), 1591-1596, 2012.

JOHNSON, J. R., SANNES, M. R., CROY, C., JOHNSTON, B., CLABOTS, C., KUSKOWSKI, M. A., ... & BELONGIA, E. A. (2007). Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002–2004. **Emerging infectious diseases**, 13(6), 838, 2007.

KIME, L., RANDALL, CP, BANDA, FI, COLL, F., WRIGHT, J., RICHARDSON, J., ... & O'NEILL, AJ. Transient silencing of antibiotic resistance by mutation represents a significant potential source of unanticipated therapeutic failure. **MBio**, 10(5). 2019.

KORB, A., NAZARENO, E. R. D., COSTA, L. D., NOGUEIRA, K. D. S., DALSENTER, P. R., TUON, F. F., & POMBA, M. C. Molecular typing and antimicrobial resistance in isolates of *Escherichia coli* from poultry and farmers in the Metropolitan Region of Curitiba, Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 35(3), 258-264, 2015.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, 46(1), 165-170, 1983.

LOWE, C. F., MCGEER, A., MULLER, M. P., & KATZ, K. Decreased susceptibility to noncarbapenem antimicrobials in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Toronto, Canada. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 56(7), 3977-3980, 2012.

MADEC, J.-Y.; HAENNI, M. Antimicrobial resistance plasmid reservoir in food and foodproducing animals. **Plasmid**, v. 99, p. 72-81, 2018.

MATSUMURA, Y., YAMAMOTO, M., NAGAO, M., ITO, Y., TAKAKURA, S., & ICHIYAMA, S. Association of fluoroquinolone resistance, virulence genes, and IncF plasmids with extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) and ST405 clonal groups. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 57(10), 4736-4742, 2013.

MINARINI, L. A. da R. **Estudo dos mecanismos de resistências as quinolonas em enterobactérias isoladas de alguns Estados Brasileiros**. 2008. Tese de doutorado apresentado no Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmacologia. Universidade de São Paulo. Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-01042009-103754/pt-br.php>. Acesso em: 13/01/2021.

MIRANDA, J. M., VÁZQUEZ, B. I., FENTE, C. A., BARROS-VELÁZQUEZ, J., CEPEDA, A., & FRANCO, C. M. Evolution of resistance in poultry intestinal *Escherichia coli* during three commonly used antimicrobial therapeutic treatments in poultry. **Poultry science**, 87(8), 1643-1648, 2008.

MIRBAGHERI, S. Z., MESHKAT, Z., NADERINASAB, M., ROSTAMI, S., NABAVINIA, M. S., & RAHMATI, M. (2015). Study on imipenem resistance and prevalence of blaVIM1 and blaVIM2 metallo-beta lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Mashhad, Northeast of Iran. **Iranian journal of microbiology**, 7(2), 72, 2015.

MUCH, P., SUN, H., LASSNIG, H., KOEBERL-JELOVCAN, S., SCHLIESSNIG, H., & STUEGER, H. P. Differences in antimicrobial resistance of commensal *Escherichia coli* isolated from caecal contents of organically and conventionally raised broilers in Austria, 2010–2014 and 2016. **Preventive veterinary medicine**, 171, 104755, 2019.

NIKAIDO H. Multirresistência em bactérias. **Annu Rev Biochem**, v. 78, p.119–146, 2009.

ODOCH, T., SEKSE, C., L'ABEE-LUND, T. M., HØGBERG HANSEN, H. C., KANKYA, C., & WASTESON, Y. Diversity and antimicrobial resistance genotypes in non-Typhoidal *Salmonella* isolates from poultry farms in Uganda. **International journal of environmental research and public health**, 15(2), 324, 2018.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE 2020. (OPAS). **Manejo Clínico da COVID-19**. 2020. Disponível em: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52285/OPASWBACOV1920075\\_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52285/OPASWBACOV1920075_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso: 18/01/2021.

POURHOSSEIN, Z., ASADPOUR, L., HABIBOLLAHI, H., & SHAFIGHI, S. T. Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from poultry chicks in northern Iran. **Gene Reports**, 21, 100926, 2020.

RAGUPATI, N.K.D.; SETHUVEL, D.P.M.; GAJENDRAN, R.; ANANDAN, S.; WALIA, K.; VEERARAGHAVAN, B. Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Determinants Among Enteric Pathogens Through Bacterial Conjugation. **Current Microbiology**, v. 76, p. 666–672, 2019.

SAMANTA, I., JOARDAR, S. N., DAS, P. K., SAR, T. K., BANDYOPADHYAY, S., DUTTA, T. K., & SARKAR, U. Prevalence and antibiotic resistance profiles of Salmonella serotypes isolated from backyard poultry flocks in West Bengal, India. **Journal of Applied Poultry Research**, 23(3), 536-545, 2014.

SAYAH, R. S., KANEENE, J. B., JOHNSON, Y., & MILLER, R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic-and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. **Applied and environmental microbiology**, 71(3), 1394-1404, 2005.

SHOUSHA, A.; AWAIWANONT, N.; SOFKA, D.; SMULDERS, ; F.J.; PAULSEN, P.; SZOSTAK, M.P.; HUMPHREY, T.; HILBERT, F. Bacteriophages isolated from chicken meat and the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes Appl. **Environ. Microbiol.**, v. 81, p. 4600-4606, 2015.

SIVAGAMI, K., VIGNESH, V. J., SRINIVASAN, R., DIVYAPRIYA, G., & NAMBI, I. M. Antibiotic usage, residues and resistance genes from food animals to human and environment: An Indian scenario. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 8(1), 102221, 2020.

SOUFI, L., SÁENZ, Y., VINUÉ, L., ABBASSI, M. S., RUIZ, E., ZARAZAGA, M., HASSEN, A. B., HAMMAMI, S., TORRES, C. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. **International journal of food microbiology**, 144(3), 497-502, 2011.

STELLA, A. E., VITOR, T. L., GADELHA, D. F. B. G., MOREIRA, C. N., MEIRELLES-BARTOLI, R. B., & OLIVEIRA, A. F. *Escherichia coli* resistente a antimicrobianos isolada de bovinos e aves/Antimicrobial drug resistant *Escherichia coli* from cattle and poultry. **Ars Veterinaria**, 29(4), 14, 2013.

TRAVIS, R. M., GYLES, C. L., REID-SMITH, R., POPPE, C., MCEWEN, S. A., FRIENDSHIP, R., ... & BOERLIN, P. Chloramphenicol and kanamycin resistance among porcine *Escherichia coli* in Ontario. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 58(1), 173-177, 2006.

VAN BOECKEL, T. P., GLENNON, E. E., CHEN, D., GILBERT, M., ROBINSON, T. P., GRENFELL, B. T., ... & LAXMINARAYAN, R. Reducing antimicrobial use in food animals. **Science**, 357(6358), 1350-1352, 2017.

VAN BOECKEL, T. P., PIRES, J., SILVESTER, R., ZHAO, C., SONG, J., CRISCUOLO, N. G., ... & LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low-and middle-income countries. **Science**, 365(6459), eaaw1944, 2019.

VAN DEN BOGAARD, A. E., LONDON, N., DRIESSEN, C. A. G. G., & STOBBERINGH, E. E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 47(6), 763-771, 2001.

VK, D., SRIKUMAR, S., SHETTY, S., VAN NGUYEN, S., KARUNASAGAR, I., & FANNING, S. Silent antibiotic resistance genes: A threat to antimicrobial therapy. **International Journal of Infectious Diseases**, 79, 20, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Critically important antimicrobials for human medicine**. 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf>. Acesso: 18/01/2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe**. Copenhagen: WHO, 2011.

WOON, S. A., & FISHER, D. (2016). Antimicrobial agents—optimising the ecological balance. **BMC medicine**, 14(1), 1-9, 2016.

ZHANG, T., WANG, C. G., LV, J. C., WANG, R. S., & ZHONG, X. H. Survey on tetracycline resistance and antibiotic-resistant genotype of avian *Escherichia coli* in North China. **Poultry science**, 91(11), 2774-2777, 2012.

ZHAO, S., BLICKENSTAFF, K., BODEIS-JONES, S., GAINES, S. T., TONG, E., & MCDERMOTT, P. T. Comparison of the prevalences and antimicrobial resistances of *Escherichia coli* isolates from different retail meats in the United States, 2002 to 2008. **Applied and Environmental Microbiology**, 78(6), 1701-1707, 2012.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência a antimicrobianos é um problema de saúde pública, onde a presença de alta resistência nos isolados evidencia a importância do controle e redução do uso de antimicrobianos, assim como o estabelecimento de planos de controle eficazes no mundo todo. Os resultados apresentados são dignos de preocupação, já que a cadeia de frango de corte tem uma importância econômica, além dessa proteína chegar em muitos países, facilitando ainda mais a disseminação da resistência antimicrobiana.

Assim, a identificação de genes de resistência em isolados que apresentam a característica fenotípica de resistência é importante, pois podem ser transferidos para outros isolados horizontalmente e expressos em condições apropriadas, ocorrendo a dispersão da resistência para os humanos, animais e ambiente.

## REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F.M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology** v. 96, p. 271-281, 2005.

ABO-AMER, A. E., SHOBRAK, M. Y., & ALTALHI, A. D. Isolation and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from farm chickens in Taif, Saudi Arabia. **Journal of global antimicrobial resistance**, 15, 65-68, 2018.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2020. 2020. Disponível em: <<https://abpa-br.org/relatorios/>>. Acesso em: 17/12/2020.

ABRAHAM, S., JORDAN, D., WONG, H.S., JOHNSON, J.R., TOLEMAN, M.A., WAKEHAM, D.L., GORDON, D.M., TURNIDGE, J.D., MOLLINGER, J.L., GIBSON, J.S., TROTT, D.J. First detection of extended-spectrum cephalosporin- and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in Australian food-producing animals. **Journal of Global Antimicrobial Resistance** v. 3, p. 273-277, 2015.

ABUSHAHEEN, M. A., FATANI, A. J., ALOSAIMI, M., MANSY, W., GEORGE, M., ACHARYA, S., ... & KHAN, A. A. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, 100971, 2020.

ALDRED, K. J., KERNS, R. J., & OSHEROFF, N. Mechanism of quinolone action and resistance. **Biochemistry**, 53(10), 1565-1574, 2014.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, E., CANCELO, A., DÍAZ-VEGA, C., CAPITA, R., & ALONSO-CALLEJA, C. Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: A comparison of agar disc diffusion and Sensi Test Gram-negative methods. **Food Control**, 30(1), 227-234, 2013.

AMÁBILE-CUEVAS, C.F (2013). Antibiotic resistance: from Darwin to Lederberg to Keynes. Microbial Drug Resistance. **Microbial Drug Resistance**, 19 (2), 73–87, 2013.

AMBLER, R. P. The structure of  $\beta$ -lactamases. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, **Biological Sciences**, 289(1036), 321-331, 1980.

ANDERSON, V., & OSHEROFF, N. Type II Topoisomerases as Targets for Quinolone Antibacterials Turning Dr. Jekyll into Mr. Hyde. **Current Pharmaceutical Design**, 7(5), 337–353, 2001.

ANTONELLI, P., BELLUCO, S., MANCIN, M., LOSASSO, C., & RICCI, A. Genes conferring resistance to critically important antimicrobials in *Salmonella enterica* isolated from animals and food: a systematic review of the literature, 2013–2017. **Research in veterinary science**, 126, 59-67, 2019.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Diretriz Nacional para Elaboração de Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos em Serviços de Saúde. 28 de dezembro de 2017.

APLEY, M.D.; BROWN, S.A.; FEDORKA-CRAY, P.J.; FERENC, S.; HOUSE, J.K.; RIVIERE, J.E.; RICE, L.B.; THORNSBERRY, C.; WADDELL, J. Role of veterinary therapeutics in bacterial resistance development: animal and public perspectives. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, p. 1209-1213, 2001.

ARGUDÍN, M. A., DEPLANO, A., MEGHRAOUI, A., DODÉMONT, M., HEINRICHS, A., DENIS, O., NONHOFF, C., ROISIN, S. Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. **Antibiotics**, 6(2), 12, 2017.

AZEVEDO, Silvia Marisa Moreira. Farmacologia dos antibióticos beta-lactâmicos, 2014. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014. Disponível em: [https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4412/1/PPG\\_21378.pdf](https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4412/1/PPG_21378.pdf). Acesso em 06 julho de 2020.

BAPTISTA, M. G. F. M. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. Dissertação (Mestrado) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.

BARNES, H. J.; VAILLANCOUT, J. P.; GROSS, W. B. COLIBACILLOSIS. IN: BARNES, H. J. ET AL. Disease of Poultry. **Iowa: Iowa State Press-A Blackwell Publishing Company**. 1231p. cap.18, p.631-656, 2003.

BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British journal of pharmacology**, 153(S1), S347-S357, 2008.

BHULLAR, K., WAGLECHNER, N., PAWLOWSKI, A., KOTEVA, K., BANKS, E. D., JOHNSTON, M. D., BARTON, H. A., WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. **PloS one**, 7(4), e34953, 2012.

BLAIR, JM, RICHMOND, GE E PIDDOCK, LJ. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 9, p. 1165-117, 2014.

BONELLI, R.R., MOREIRA, B.M., PICÃO, R.C. Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. **Drug Resistance Updates** v. 17, p. 24-36, 2014.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 48(1), 1-14, 2004.

BOOTH, A., AGA, D. S., & WESTER, A. L. Retrospective analysis of the global antibiotic residues that exceed the predicted no effect concentration for antimicrobial resistance in various environmental matrices. **Environment International**, 141, 105796, 2020.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa SDA N° 09, de 27 de Junho de 2003. Disponível online: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/instrucao-normativa-sda-n-o-09-de-27-de-junho-de-2003.pdf>. Acesso em: 23/12/2020.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa n° 26, de 9 de Julho de 2009. Disponível online: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-26-de-9-de-julho-de-2009.pdf/view>. Acesso em: 23/12/2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. Programa nacional de monitoramento da prevalência e da resistência bacteriana em frango (Prebaf), 2012.

BROLUND, A., EDQUIST, P.J., MÄKITALO, B., OLSSON-LILJEQUIST, B., SÖDERBLUM, T., WISELL, K.T. AND GISKE, C.G., Epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007–2011. **Clinical Microbiology and Infection**, 20(6), pp.O344-O352, 2014.

BUSH, K., & JACOBY, G. A. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 54(3), 969-976, 2010.

CANNON, M.; HARFORD, S.; DAVIES, J. A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, thiamphenicol and some fluorinated derivatives. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 26, n. 3, p. 307-317, 1990.

CANTAS, L.; SHAH, S.; CAVACO, L.; MANAIA, C.; WALSH, F.; POPOWSKA, M.; et al. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. **Front Microbiol.** v. 4, p. 96–110, 2013.

CANTÓN, R., NOVAIS, A., VALVERDE, A., MACHADO, E., PEIXE, L., BAQUERO, F., COQUE, T.M. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**. V. 14, p. 144-153, 2008.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, 303(6-7), 298-304, 2013.

CASELLA, T., RODRÍGUEZ, M.M., TAKAHASHI, J.T., GHIGLIONE, B., DROPA, M., ASSUNÇÃO, E., NOGUEIRA, M.L., LINCOPAN, N., GUTKIND, G., NOGUEIRA, M.C.L. Detection of blaCTX-M-type genes in complex class 1 integrons carried by Enterobacteriaceae isolated from retail chicken meat in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 197, p. 88-91, 2015.

CHANG, Q., WANG, W., REGEV-YOCHAY, G., LIPSITCH, M., & HANAGE, W. P. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? **Evolutionary applications**, 8(3), 240-247, 2014.

CHOPRA, I., & ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and molecular biology reviews**, 65(2), 232-260, 2001.

COLLIGNON, P. The importance of a One Health Approach to preventing the development and spread of antibiotic resistance. **Curr. Top. Microbiol. Immunol**, v. 366, p.19–36, 2013.

CORREIA, S., POETA, P., HÉBRAUD, M., CAPELO, J. L., & IGREJAS, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand?. **Journal of medical microbiology**, 66(5), 551-559, 2017.

COX JR, L. A., & POPKEN, D. A. Assessing potential human health hazards and benefits from subtherapeutic antibiotics in the United States: tetracyclines as a case study. **Risk Analysis: An International Journal**, 30(3), 432-457, 2010.

CRECENCIO, R. B., BRISOLA, M. C., BITNER, D., FRIGO, A., RAMPAZZO, L., BORGES, K. A., ... & DA SILVA, A. S. Antimicrobial susceptibility, biofilm formation and

genetic profiles of *Escherichia coli* isolated from retail chicken meat. **Infection, Genetics and Evolution**, 104355, 2020.

CRONAN, John E. *Escherichia coli* as an Experimental Organism. **eLS**, 2014.

CROXEN, M. A., & FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, 8(1), 26-38, 2010.

D'ANDREA, M. M., ARENA, F., PALLECCHI, L., & ROSSOLINI, G. M. CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, 303(6-7), 305–317, 2013.

DA COSTA, P.M.; LOUREIRO, L.; MATOS, A.J.F. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the Interface between humans, animals and the environment. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 10, p. 278-294, 2013.

DAY, M. J., RODRÍGUEZ, I., VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A., DIERIKX, C., KADLEC, K., SCHINK, A.-K., ... WOODFORD, N. Diversity of STs, plasmids and ESBL genes among *Escherichia coli* from humans, animals and food in Germany, the Netherlands and the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 71(5), 1178, 2016.

DIARRA, M.S.; MALOUIN, F. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. **Front. Microbiol**, v. 5, p. 1-15, 2014.

DIERIKX, C., VAN DER GOOT, J., FABRI, T., VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A., SMITH, H., & MEVIUS, D. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and AmpC- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 68(1), 60-67, 2013.

DINOS, G. P. The macrolide antibiotic renaissance. **Jornal britânico de farmacologia**, v. 174, n. 18, pág. 2967-2983, 2017.

DOUMITH, M., GODBOLE, G., ASHTON, P., LARKIN, L., DALLMAN, T., DAY, M., MULLER-PEBODY, B., ELLINGTON, M.J., DE PINNA, E., JOHNSON, A.P., HOPKINS, K.L. & WOODFORD, N. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. **J Antimicrob Chemother**. 71(7), 2016.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Control) Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from food-producing animals and food EFSA J., 17, p. 5709, 2019.

EGERVÄRN, M., BÖRJESSON, S., BYFORS, S., FINN, M., KAIPE, C., ENGLUND, S., & LINDBLAD, M. *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden. **International journal of food microbiology**, 171, 8-14, 2014.

EWERS, C., BETHE, A., SEMMLER, T., GUENTHER, S., WIELER, L.H. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 646-655, 2012.

FANG, J., SHEN, Y., QU, D. E HAN, J. Perfis de resistência antimicrobiana e características de integrons em linhagens de *Escherichia coli* isolados de um grande matadouro centralizado de suínos e seus mercados a jusante na província de Zhejiang, na China. **Food Control**, v. 95, p. 215-222, 2019.

FERNANDES, M.R.; MOURA, Q.; SARTORI, L.; SILVA, K.C.; CUNHA, M.P.; ESPOSITO, F.; LOPES, R.; OTUTUMI, L.K.; GONÇALVES, D.D.; DROPA, M. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 17, p. 1-6, 2016.

FERREIRA, J.C., PENHA FILHO, R.A.C., KUAYE, A.P.Y., ANDRADE, L.N., BERCHIERI JUNIOR, A., DARINI, A.L.D.C. Identification and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae isolated from healthy poultry in Brazil. *Infection*, **Genetics and Evolution**, v. 60, p. 66-70, 2018.

FERRI, M., RANUCCI, E., ROMAGNOLI, P., & GIACCONE, V. Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2857-2876, 2017.

FORSBERG, K. J., REYES, A., WANG, B., SELLECK, E. M., SOMMER, M. O., & DANTAS, G. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. **science**, 337(6098), 1107-1111, 2012.

FOUNOU, L.L., FOUNOU, R.C., ESSACK, S.Y. Antibiotic resistance in the food chain: A developing country perspective. **Frontiers in Microbiology**, v.7, 2016.

FRYE, J. G; JACKSON, C. R. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from US food animals. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 135, 2013.

FYFE C, GROSSMAN TH, KERSTEIN K, SUTCLIFFE J. Resistance to macrolide antibiotics in public health pathogens. **Cold Spring Harb Perspect Med** 6 pii: a025395, 2016.

HAENNI, M., BEYROUTHY, R., LUPO, A., CHÂTRE, P., MADEC, J.-Y., BONNET, R. Epidemic spread of *Escherichia coli* ST744 isolates carrying *mcr-3* and *blaCTX-M-55* in cattle in France. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, p. 533-536, 2018.

HAMMERUM, A. M., & HEUER, O. E. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. **Clinical Infectious Diseases**, 48(7), 916-921, 2009.

HAO, H., SANDER, P., IQBAL, Z., WANG, Y., CHENG, G., & YUAN, Z. The risk of some veterinary antimicrobial agents on public health associated with antimicrobial resistance and their molecular basis. **Frontiers in microbiology**, 7, 1626, 2016.

HERNANDO-AMADO, S., BLANCO, P., ALCALDE-RICO, M., CORONA, F., REALES-CALDERÓN, J. A., SÁNCHEZ, M. B., & MARTÍNEZ, J. L. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. **Drug Resistance Updates**, 28, 13-27, 2011.

HEUER, H., SCHMITT, H., & SMALLA, K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. **Current opinion in microbiology**, 14(3), 236-243, 2011.

HIKI, M., KAWANISHI, M., ABO, H., KOJIMA, A., KOIKE, R., HAMAMOTO, S., & ASAI, T. Decreased Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporin in *Escherichia coli* from Healthy Broilers at Farms in Japan After Voluntary Withdrawal of Ceftiofur. **Foodborne Pathogens and Disease**, 12(7), 2015.

HOFACRE, C. L., FRICKE, J. A., & INGLIS, T. Antimicrobial drug use in poultry. **Antimicrobial therapy in veterinary medicine**, 4, 2013.

HUDDLESTON, J. R. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. **Infection and drug resistance**, 7, 167, 2014.

HUIJBERS, P. M., GRAAT, E. A., HAENEN, A. P., VAN SANTEN, M. G., VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A., MEVIUS, D. J., ... & VAN HOEK, A. H. Extended-spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and people living and/or working on broiler farms: prevalence, risk factors and molecular characteristics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 69(10), 2669-2675, 2014.

HUNTER, P. A., DAWSON, S., FRENCH, G. L., GOOSSENS, H., HAWKEY, P. M., KUIJPER, E. J., ... & WILCOX, M. H. Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies, 2010.

JAHANBAKHS, S., SMITH, M. G., KOHAN-GHADR, H. R., LETELLIER, A., ABRAHAM, S., TROTT, D. J., & FAIRBROTHER, J. M. Dynamics of extended-spectrum cephalosporin resistance in pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in Quebec, Canada. **International journal of antimicrobial agents**, 48(2), 194-202, 2016.

JIANG HX, LU DH, CHEN ZL, WANG XM, CHEN JR, LIU YH, LIAO XP, LIU JH, ZENG ZL. High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China. **Vet J**. 187:99–103, 2011

JOHNSEN, P. J., TOWNSEND, J. P., BØHN, T., SIMONSEN, G. S., SUNDSFJORD, A., & NIELSEN, K. M. Factors affecting the reversal of antimicrobial-drug resistance. **The Lancet infectious diseases**, 9(6), 357-364, 2009.

KAESBOHRER, A., SCHROETER, A., TENHAGEN, B. A., ALT, K., GUERRA, B., & APPEL, B. Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance. **Zoonoses and public health**, 59, 158-165, 2012.

KAPER, J.B. et al., Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature**, vol.2, p. 123-140, 2004.

KAWAMURA, K., GOTO, K., NAKANE, K., & ARAKAWA, Y. Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and *Escherichia coli* isolated from retail foods including chicken meat in Japan. **Foodborne pathogens and disease**, 11(2), 104-110, 2014.

KIIRU, J., KARIUKI, S., GODDEERIS, B. M., & BUTAYE, P. Analysis of  $\beta$ -lactamase phenotypes and carriage of selected  $\beta$ -lactamase genes among *Escherichia coli* strains

obtained from Kenyan patients during an 18-year period. **BMC microbiology**, 12(1), 155, 2012.

KLUYTMANS, J. A., OVERDEVEST, I. T., WILLEMSSEN, I., KLUYTMANS-VAN DEN BERGH, M. F., VAN DER ZWALUW, K., HECK, M., ... & GORDON, D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. **Clinical Infectious Diseases**, 56(4), 478-487, 2013.

KOGA, V.L., RODRIGUES, G.R., SCANDORIEIRO, S., VESPERO, E.C., OBA, A., DE BRITO, B.G., DE BRITO, K.C.T., NAKAZATO, G., KOBAYASHI, R.K.T. Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, p. 479-485, 2015.

KOO, H. J., & WOO, G. J. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. **International journal of food microbiology**, 145(2-3), 407-413, 2011.

KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., SCHRECKENBERBER, P. C., & WINN JR, W. C. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 97-9, 2001.

KORB, A., NAZARENO, E. R. D., COSTA, L. D., NOGUEIRA, K. D. S., DALSENTER, P. R., TUON, F. F., & POMBA, M. C. Tipagem molecular e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli* de frangos de corte e de tratadores na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 35(3), 258-264, 2015.

KRAUSE, K. M., SERIO, A. W., KANE, T. R., & CONNOLLY, L. E. Aminoglycosides: an overview. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, 6(6), a027029, 2016.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **Fems Microbiology Reviews**, v. 24, n.1, p.107-117, 2000.

LAMBRECHT, E., VAN COILLIE, E., VAN MEERVENNE, E., BOON, N., HEYNDRIKX, M., & VAN DE WIELE, T. Commensal *E. coli* rapidly transfer antibiotic resistance genes to human intestinal microbiota in the Mucosal Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (M-SHIME). **International journal of food microbiology**, 311, 108357, 2019.

LANDONI, M. F., & ALBARELLOS, G. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. **The Veterinary Journal**, 205(1), 21-27, 2015.

LAZARUS, B., PATERSON, D. L., MOLLINGER, J. L., & ROGERS, B. A. Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. **Clinical Infectious Diseases**, 60(3), 439-452, 2015.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A., DIERIKX, C. M., COHEN STUART, J., VOETS, G. M., VAN DEN MUNCKHOF, M. P., VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A., ... & BONTEN, M. J. M.

Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. **Clinical Microbiology and Infection**, 17(6), 873-880, 2011.

LEVY, S. B. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. **Journal of applied microbiology**, 92, 65S-71S, 2002.

LINDGREN, P. K; KARLSSON, Å.; HUGHES, D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3222-3232, 2003.

LIU, Y.-Y., WANG, Y., WALSH, T.R., YI, L.-X., ZHANG, R., SPENCER, J., DOI, Y., TIAN, G., DONG, B., HUANG, X., YU, L.-F., GU, D., REN, H., CHEN, X., LV, L., HE, D., ZHOU, H., LIANG, Z., LIU, J.-H., SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v.16, p. 161-168, 2016.

LOSASSO, C., DI CESARE, A., MASTRORILLI, E., PATUZZI, I., CIBIN, V., ECKERT, E. M., FONTANETO, D., VANZO, A., RICCI, A., CORNO, G. Assessing antimicrobial resistance gene load in vegan, vegetarian and omnivore human gut microbiota. **International journal of antimicrobial agents**, 52(5), 702-705, 2018.

LUPO, A., COYNE, S., & BERENDONK, T. U. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. **Frontiers in microbiology**, 3, 18, 2012.

MA, F., XU, S., TANG, Z., LI, Z., & ZHANG, L. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. **Biosafety and Health**, 2020.

MADEC, J.-Y.; HAENNI, M. Antimicrobial resistance plasmid reservoir in food and foodproducing animals. **Plasmid**, v. 99, p. 72-81, 2018.

MAGOURAS, I., CARMO, L. P., STÄRK, K. D., & SCHÜPBACH-REGULA, G. Antimicrobial usage and-resistance in livestock: where should we focus ?. **Frontiers in veterinary science**, 4, 148, 2017.

MARON, D.F., SMITH, T.J., NACHMAN, K.E. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. **Globalization and Health**, v. 9, p. 48, 2013.

MARSHALL, B. M., & LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clinical microbiology reviews**, 24(4), 718-733, 2011.

MAYNARD, C., BEKAL, S., SANSCHAGRIN, F., LEVESQUE, R. C., BROUSSEAU, R., MASSON, L., ... & HAREL, J. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. **Journal of clinical microbiology**, 42(12), 5444-5452, 2004.

MEYER, G.; PICOLI, S. U. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 1, p. 25-31, fev. 2011.

MINARINI, L. A., POIREL, L., CATTOIR, V., DARINI, A. L. C., & NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 62(3), 474-478, 2008.

MOGHADAM, N. R., AREFHOSSEINI, S. R., JAVADI, A., LOTFIPUR, F., ANSARIN, M., TAMIZI, E., & NEMATI, M. Determination of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in five different kinds of chicken tissues by dispersive liquid–liquid microextraction coupled with hplc. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR**, 17(4), 1182, 2018.

MURRAY, I. A.; SHAW, W. V. O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 1, 1997.

NIKAIDO H. Multirresistência em bactérias. **Annu Rev Biochem**, v. 78, p.119–146, 2009.

NORDMANN, P., NAAS, T., POIREL, L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1791-1798, 2011.

NORIZUKI, C., WACHINO, J.-I., SUZUKI, M., KAWAMURA, K., NAGANO, N., KIMURA, K., ARAKAWA, Y. Specific blaCTX-M-8/Incl1 plasmid transfer among genetically diverse Escherichia coli isolates between humans and chickens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, 2017.

O'BRIEN, T. F. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clinical Infectious Diseases**, 34(Supplement\_3), S78-S84, 2002.

O'NEILL, J. The Review on Antimicrobial Resistance. “**Tackling a crisis for the health and wealth of nations**”. Londres, Reino Unido, 2014.

OVERDEVEST, I., WILLEMSSEN, I., RIJNSBURGER, M., EUSTACE, A., XU, L., HAWKEY, P., ... & HUIJSDENS, X. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes of Escherichia coli in chicken meat and humans, The Netherlands. **Emerging infectious diseases**, 17(7), 1216, 2011.

PAL, C., BENGTSSON-PALME, J., KRISTIANSSON, E., & LARSSON, D. J. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. **BMC genomics**, 16(1), 964, 2015.

PALHARES, J.C.; KICH, J.D.; BESSA, M. C.; BIESUS, L.L.; BERNO, L.G.; TRIQUES, N.J. Salmonella and antimicrobial resistance in an animal-based agriculture river system. **Science of the Total Environment**, v. 472, p. 654-661, 2014.

PALZKILL, T. Metallo- $\beta$ -lactamase structure and function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1277(1), 91–104, 2012.

PITOUT, J. D., & LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **The Lancet Infectious Diseases**, 8(3), 159–166, 2008.

POOLE, T., & SHEFFIELD, C. Use and misuse of antimicrobial drugs in poultry and livestock: mechanisms of antimicrobial resistance, 2013.

QUEENAN, K., HÄSLER, B., RUSHTON, J. A One Health approach to antimicrobial resistance surveillance: is there a business case for it? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, p. 422-427, 2016.

RABELLO, R. F., BONELLI, R. R., PENNA, B. A., ALBUQUERQUE, J. P., SOUZA, R. M., & CERQUEIRA, A. M. Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update Overview. **Animals**, 10(4), 552, 2020.

RAGUPATI, N.K.D.; SETHUVEL, D.P.M.; GAJENDRAN, R.; ANANDAN, S.; WALIA, K.; VEERARAGHAVAN, B. Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Determinants Among Enteric Pathogens Through Bacterial Conjugation. **Current Microbiology**, v. 76, p. 666–672, 2019.

REZAZADEH, M; BAGHCHESARAEI, H; PEYMANI, A. Plasmid-Mediated Quinolone-Resistance (qnr) Genes in clinical isolates of Escherichia coli collected from several hospitals of Qazvin and Zanjan Provinces, Iran. **Osong public health and research perspectives**, v. 7, n. 5, p. 307-312, 2016.

ROBERTS, M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS microbiology letters**, 245(2), 195-203, 2005.

ROBERTS, M. C., & SCHWARZ, S. Tetracycline and phenicol resistance genes and mechanisms: importance for agriculture, the environment, and humans. *Journal of environmental quality*, 45(2), 576-592, 2016.

ROBINSON, T. P., BU, D. P., CARRIQUE-MAS, J., FÈVRE, E. M., GILBERT, M., GRACE, D., ... & LAXMINARAYAN, R. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 110(7), 377-380, 2016.

ROTH, N.; KÄSBOHRER, A.; MAYRHOFER, S.; ZITZ, U.; HOFACRE, C.; DOMIG, K.J. THE application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in Escherichia coli: A global overview, **Poultry Science**, v. 98, 2018.

RUPPÉ, É., WOERTHER, P. L., & BARBIER, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of intensive care**, 5(1), 21, 2015.

SCHROEDER, C. M., ZHAO, C., DEBROY, C., TORCOLINI, J., ZHAO, S., WHITE, D. G., ... & MENG, J. Antimicrobial resistance of Escherichia coli O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. **Applied and Environmental Microbiology**, 68(2), 576-581, 2002.

SCHWARZ, S., KEHRENBURG, C., DOUBLET, B., & CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS microbiology reviews**, 28(5), 519-542, 2004.

SHAW, W. V. Chloramphenicol Acetyltransferase: Enzymology and Molecular Biology. *Critical Reviews in Biochemistry*, 14(1), 1–46, 1983.

SHOUSHA, A.; AWAIWANONT, N.; SOFKA, D.; SMULDERS, .; F.J.; PAULSEN, P.; SZOSTAK, M.P.; HUMPHREY, T.; HILBERT, F. Bacteriophages isolated from chicken meat and the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 81, p. 4600-4606, 2015.

SILVA, G.J.; MENDONÇA, N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichiacoli*, *Virulence*, v.3:1, p. 18-28, 2012.

SIVAGAMI, K., VIGNESH, V. J., SRINIVASAN, R., DIVYAPRIYA, G., & NAMBI, I. M. Antibiotic usage, residues and resistance genes from food animals to human and environment: An Indian scenario. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(1), 102221, 2020.

SKOLD, O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research*, 32(3/4), 261-273, 2001.

SKOV, R. L., & MONNET, D. L. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Eurosurveillance*, 21(9), 30155, 2016.

SKOV, R.L. & MONNET, D.L. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Eurosurveillance*, 21(9), 2016.

SOUFI, L., SÁENZ, Y., VINUÉ, L., ABBASSI, M. S., RUIZ, E., ZARAZAGA, M., HASSEN, A. B., HAMMAMI, S., TORRES, C. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *International journal of food microbiology*, 144(3), 497-502, 2011.

STRAHILEVITZ, J., JACOBY, G. A., HOOPER, D. C., & ROBICSEK, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 664-689, 2009.

SZMOLKA, A., ANJUM, M. F., LA RAGIONE, R. M., KASZANYITZKY, É. J., & NAGY, B. Microarray based comparative genotyping of gentamicin resistant *Escherichia coli* strains from food animals and humans. *Veterinary microbiology*, 156(1-2), 110-118, 2012.

TANG, S. S., APISARNTHANARAK, A., & HSU, L. Y. Mechanisms of  $\beta$ -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community-and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Advanced drug delivery reviews*, 78, 3-13, 2014.

TANSAWAI, U., WALSH, T. R., & NIUMSUP, P. R. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* among backyard poultry farms, farmers, and environments in Thailand. *Poultry science*, 98(6), 2622-2631, 2019.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Salmonella and Campylobacter verification program for raw meat and poultry products*. USDA, 2013

VAN BOECKEL, T. P., GLENNON, E. E., CHEN, D., GILBERT, M., ROBINSON, T. P., GRENFELL, B. T., LEVIN, S.A., BONHOEFFER, S., LAXMINARAYAN, R. Reducing antimicrobial use in food animals. *Science*, 357(6358), 1350-1352, 2017.

VAN BOECKEL, T.P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B.T.; LEVIN, S.A.; ROBINSON, T.P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. **PNAS Early Edition**, v. 112, p. 5649-5654, 2015.

VAN DEN BOGAARD, A. E., LONDON, N., DRIESSEN, C. A. G. G., & STOBBERINGH, E. E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 47(6), 763-771, 2001.

VAN DUIN, D.; PATERSON, D.L. Bactérias Multirresistentes na Comunidade. **Clínicas de Doenças Infecciosas da América do Norte**, v. 30, p. 377-390, 2016.

VAN HOEK, A. H., MEVIUS, D., GUERRA, B., MULLANY, P., ROBERTS, A. P., & AARTS, H. J. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in microbiology**, 2, 203, 2011.

VAN, T. T. H., YIDANA, Z., SMOOKER, P. M., & COLOE, P. J. Antibiotic use in food animals worldwide, with a focus on Africa: Pluses and minuses. **Journal of global antimicrobial resistance**, 20, 170-177, 2020.

VERRETTE, L., FAIRBROTHER, J. M., & BOULIANNE, M. Effect of cessation of ceftiofur and substitution with lincomycin-spectinomycin on extended-spectrum- $\beta$ -lactamase/AmpC genes and multidrug resistance in *Escherichia coli* from a canadian broiler production pyramid. **Applied and Environmental Microbiology**, 85(13), 2019.

VIEIRA, A. R., COLLIGNON, P., AARESTRUP, F. M., MCEWEN, S. A., HENDRIKSEN, R. S., HALD, T., & WEGENER, H. C. Association Between Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Food Animals and Blood Stream Isolates from Humans in Europe: An Ecological Study. **Foodborne Pathogens and Disease**, 8(12), 1295–1301, 2011.

VIEIRA, M.A.M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**, v.33, n.4, p.406-414, 2009.

WACHINO, J. I., DOI, Y., & ARAKAWA, Y. Aminoglycoside Resistance: Updates with a Focus on Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. **Infectious Disease Clinics**, 34(4), 887-902, 2020.

WALL, B. A., MATEUS, A. L. P., MARSHALL, L., PFEIFFER, D. U., LUBROTH, J., ORMEL, H. J., ... & PATRIARCHI, A. Drivers, dynamics and epidemiology of antimicrobial resistance in animal production. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2016.

WANG, R., VAN DORP, L., SHAW, L.P., BRADLEY, P., WANG, Q., WANG, X., JIN, L., ZHANG, Q., LIU, Y., RIEUX, A., DORAI-SCHNEIDERS, T., WEINERT, L.A., IQBAL, Z., DIDELOT, X., WANG, H., BALLOUX, F. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. **Nature Communications**, v. 9, p. 1179, 2018.

WATKINS, R. R., & BONOMO, R. A. The Ongoing Threat of Antimicrobial Resistance. **Infectious Disease Clinics**, 34(4), xiii-xiv, 2020.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 4-8, 2007.

WHO. Antimicrobial resistance (WHO Fact sheet). Geneva: World Health Organization. February 2018.

Witte, W. Selective pressure by antibiotic use in livestock. **International journal of antimicrobial agents**, 16, 19-24, 2000.

WHITE, D. G., HUDSON, C., MAURER, J. J., AYERS, S., ZHAO, S., LEE, M. D., ... & SHERWOOD, J. (2000). Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, 38(12), 4593-4598, 2000.

WOOLDRIDGE, M. Evidence for the circulation of antimicrobial-resistant strains and genes in nature and especially between humans and animals. **Rev Sci Tech**, 31(1), 231-247, 2012.

WOOLHOUSE, M., WARD, M., VAN BUNNIK, B., & FARRAR, J. (2015). Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1670), 20140083, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Critically important antimicrobials for human medicine**. 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf>. Acesso: 18/01/2021.

XIONG, W., SUN, Y., & ZENG, Z. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. **Environmental Science and Pollution Research**, 25(19), 18377-18384, 2018.

YANG, Z., GUO, Z., QIU, C., LI, Y., FENG, X., LIU, Y., ... & HAN, L. Preliminary analysis showed country-specific gut resistome based on 1267 feces samples. **Gene**, 581(2), 178-182, 2016.

YASIR, M., FARMAN, M., SHAH, M. W., JIMAN-FATANI, A. A., OTHMAN, N. A., ALMASAUDI, S. B., ... & AZHAR, E. I. Genomic and antimicrobial resistance genes diversity in multidrug-resistant CTX-M-positive isolates of *Escherichia coli* at a health care facility in Jeddah. **Journal of Infection and Public Health**, 13(1), 94-100, 2020.

ZHENG, H., ZENG, Z., CHEN, S., LIU, Y., YAO, Q., DENG, Y., CHEN, X., LV, L., ZHUO, C., CHEN, Z., LIU, J.-H. Prevalence and characterisation of CTX-M  $\beta$ -lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, p. 305-310, 2012.

## APÊNDICE

Tabela 1. Perfil de resistência antimicrobiana de 701 isolados de *Escherichia coli* pelo método de Disco-difusão, frente a dez antimicrobianos, obtidos de diferentes amostras da Cadeia de Frango de Corte.

Antimicrobiano	Tipo de amostra (número de isolados)									
	Carcaça após sangria (n=224)	Carcaça após depenagem (n=162)	Carcaça após evisceração (n=132)	Carcaça após chiller (n=91)	Água escaldagem (n=29)	Água chiller (n=17)	Caixa transporte (n=28)	Fezes humanas (n=18)		
Amoxicilina (10 µg)	S - 125 (55,8%)	S - 82 (50,6%)	S - 67 (50,7%)	S - 36 (39,6%)	S - 16 (55,2%)	S - 12 (70,6%)	S - 15 (53,6%)	S - 11 (61,1%)		
	I - 8 (3,57%)	I - 10 (6,2%)	I - 11 (8,3%)	I - 3 (3,3%)	I - 1 (3,4%)	I - 0 (0%)	I - 1 (3,6%)	I - 2 (11,1%)		
	R - 91 (40,6%)	R - 70 (43,2%)	R - 54 (40,9%)	R - 52 (57,1%)	R - 12 (41,4%)	R - 5 (29,4%)	R - 12 (42,9%)	R - 5 (27,8%)		
Ceftiofur (30 µg)	S - 168 (75%)	S - 135 (83,3%)	S - 119 (90,1%)	S - 79 (86,8%)	S - 27 (93,1%)	S - 16 (94,1%)	S - 24 (85,7%)	S - 17 (94,4%)		
	I - 15 (6,7%)	I - 10 (6,2%)	I - 6 (4,5%)	I - 2 (2,2%)	I - 0 (0%)	I - 1 (5,9%)	I - 3 (10,7%)	I - 0 (0%)		
	R - 41 (18,3%)	R - 17 (10,5%)	R - 7 (5,3%)	R - 10 (11%)	R - 2 (6,9%)	R - 0 (0%)	R - 1 (3,6%)	R - 1 (5,6%)		
Aztreonam (30 µg)	S - 148 (66,1%)	S - 131 (80,9%)	S - 99 (75%)	S - 75 (82,4%)	S - 25 (86,2%)	S - 15 (88,2%)	S - 21 (75%)	S - 16 (88,9%)		
	I - 27 (12%)	I - 13 (8,0%)	I - 11 (8,3%)	I - 4 (4,4%)	I - 1 (3,4%)	I - 0 (0%)	I - 4 (14,3%)	I - 0 (0%)		
	R - 49 (21,9%)	R - 18 (11,1%)	R - 22 (16,7%)	R - 12 (13,2%)	R - 3 (10,3%)	R - 2 (11,8%)	R - 3 (10,7%)	R - 2 (11,1%)		
Imipenem (10 µg)	S - 176 (78,6%)	S - 129 (79,6%)	S - 106 (80,3%)	S - 73 (80,2%)	S - 24 (82,8%)	S - 13 (76,5%)	S - 21 (75%)	S - 16 (88,9%)		
	I - 31 (13,8%)	I - 27 (16,7%)	I - 21 (15,9%)	I - 12 (13,2%)	I - 5 (17,2%)	I - 4 (23,5%)	I - 5 (17,9%)	I - 2 (11,1%)		
	R - 17 (7,6%)	R - 6 (3,7%)	R - 5 (3,8%)	R - 6 (6,6%)	R - 0 (0%)	R - 0 (0%)	R - 2 (7,1%)	R - 0 (0%)		
Gentamicina (10 µg)	S - 129 (57,6%)	S - 104 (64,2%)	S - 96 (72,7%)	S - 64 (70,3%)	S - 21 (72,4%)	S - 13 (76,4%)	S - 18 (64,3%)	S - 16 (88,9%)		
	I - 13 (5,8%)	I - 6 (3,7%)	I - 4 (3,0%)	I - 2 (2,2%)	I - 0 (0%)	I - 0 (0%)	I - 0 (0%)	I - 0 (0%)		
	R - 82 (36,6%)	R - 52 (32,1%)	R - 32 (24,2%)	R - 25 (27,4%)	R - 8 (17,6%)	R - 4 (23,5%)	R - 10 (35,7%)	R - 2 (11,1%)		
Tetraciclina (10 µg)	S - 77 (34,4%)	S - 70 (43,2%)	S - 66 (50%)	S - 52 (57,1%)	S - 13 (44,9%)	S - 8 (47,1%)	S - 7 (25%)	S - 13 (72,2%)		
	I - 20 (8,9%)	I - 9 (5,5%)	I - 5 (3,8%)	I - 31 (34%)	I - 1 (3,4%)	I - 0 (0%)	I - 1 (3,6%)	I - 3 (17,6%)		
	R - 127 (56,7%)	R - 83 (51,2%)	R - 61 (46,2%)	R - 8 (8,8%)	R - 15 (51,7%)	R - 9 (53%)	R - 20 (71,4%)	R - 2 (11,1%)		

Ciprofloxacina (5 µg)	S - 11 (4,9%)	S - 13 (8,0%)	S - 8 (6,0%)	S - 8 (8,8%)	S - 0 (0%)	S - 0 (0%)	S - 1 (3,6%)	S - 0 (0%)
	I - 147 (65,6%)	I - 100 (61,7%)	I - 83 (62,9%)	I - 63 (69,2%)	I - 15 (51,7%)	I - 12 (70,6%)	I - 10 (35,7%)	I - 16 (88,9%)
	R - 66 (29,5%)	R - 49 (30,2%)	R - 41 (31,0%)	R - 20 (22%)	R - 14 (48,3%)	R - 5 (29,4%)	R - 17 (60,7%)	R - 2 (11,1%)
Sulfametoxazol + Trimetoprim (23,75/1,25 µg)	S - 88 (39,3%)	S - 71 (43,8%)	S - 62 (47%)	S - 47 (51,6%)	S - 15 (51,7%)	S - 10 (58,8%)	S - 10 (35,7%)	S - 17 (94,4%)
	I - 3 (1,3%)	I - 2 (1,2%)	I - 0 (0%)	I - 1 (1,1%)	I - 2 (6,9%)	I - 0 (0%)	I - 0 (0%)	I - 0 (0%)
Cloranfenicol (30 µg)	R - 133 (59,4%)	R - 89 (54,9%)	R - 70 (53%)	R - 43 (47,2%)	R - 12 (41,4%)	R - 7 (41,2%)	R - 18 (64,3%)	R - 1 (5,6%)
	S - 126 (56,2%)	S - 106 (65,4%)	S - 89 (67,4%)	S - 67 (73,6%)	S - 18 (62,1%)	S - 11 (64,7%)	S - 12 (42,9%)	S - 18 (100%)
	I - 26 (11,6%)	I - 16 (9,9%)	I - 9 (6,8%)	I - 7 (7,7%)	I - 1 (3,4%)	I - 0 (0%)	I - 4 (14,3%)	I - 0 (0%)
Azitromicina (15 µg)	R - 72 (32,1%)	R - 40 (24,7%)	R - 34 (25,8%)	R - 17 (18,7%)	R - 10 (34,5%)	R - 6 (35,3%)	R - 12 (42,9%)	R - 0 (0%)
	S - 135 (60,3%)	S - 95 (58,6%)	S - 67 (50,8%)	S - 53 (58,2%)	S - 20 (69%)	S - 7 (41,2%)	S - 10 (35,7%)	S - 11 (61,1%)
	I - 0 (0%)	I - 0 (0%)	I - 0 (0%)	I - 0 (0%)	I - 0 (0%)	I - 0 (0%)	I - 0 (0%)	I - 0 (0%)
R - 89 (39,7%)	R - 67 (41,3%)	R - 65 (49,2%)	R - 38 (41,8%)	R - 9 (31%)	R - 10 (58,8%)	R - 18 (64,3%)	R - 7 (38,9%)	

S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente