

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

***Escherichia coli* MULTIRRESISTENTE EM FEZES E**
CARCAÇAS DE SUÍNOS NO BRASIL

Natália Pereira
Médica Veterinária

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

***Escherichia coli* MULTIRRESISTENTE EM FEZES E**
CARCAÇAS DE SUÍNOS NO BRASIL

Natália Pereira

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila

Coorientadora: Profa. Dra. Marita Vedovelli Cardozo

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutora em
Microbiologia Agropecuária**

2024

P436e Pereira, Natália
Escherichia coli multirresistente em fezes e carcaças de
suínos no Brasil / Natália Pereira. -- Jaboticabal, 2024
42 p. : tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Fernando Antônio de Ávila
Coorientadora: Marita Vedovelli Cardozo

1. Microbiologia. 2. Escherichia coli. 3. Bactérias resistentes
a antibióticos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: *Escherichia coli* MULTIRRESISTENTE EM FEZES E CARCAÇAS DE SUÍNOS NO BRASIL

AUTORA: NATÁLIA PEREIRA

ORIENTADOR: FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA

COORDINADORA: MARITA VEDOVELLI CARDOZO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodutiva e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. LUCAS JOSÉ LUDUVÉRIO PIZAURU (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Agrárias Ambientais / Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) - Ilhéus/BA

Prof. Dra. CAROLINE PETERS PIGATTO DE NARDI (Participação Virtual)
Departamento de Microbiologia e Saúde Animal / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São
Paulo - Matão/SP

Profa. Dra. LILIAN CRISTINA MAKINO (Participação Virtual)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / FCAVR UNESP Registro 

Prof. Dr. RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 08 de fevereiro de 2024

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

NATÁLIA PEREIRA – Nascida em 16 de dezembro de 1991, em Ribeirão Preto, estado de São Paulo. Obteve o título de médica veterinária em 2017 pela Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, SP. Ingressou no programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária em 2018 sob orientação do Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila e coorientação da Profa. Dra. Marita Vedovelli Cardozo, obtendo o título de Mestra em Microbiologia Agropecuária em 2020. Neste mesmo ano, ingressou no doutorado na mesma área.

“...Milo continuou a pensar sobre uma porção de coisas, sobre a facilidade com que uma pessoa podia pegar os muitos desvios e saídas erradas, sobre como era bom estar seguindo em frente e, acima de tudo, sobre quanta coisa era possível fazer com um pequeno esforço mental.”

Tudo depende de como você vê as coisas – Norton Juster

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar sabedoria e forças para continuar durante todos os anos de estudo.

À minha família, por todo suporte e apoio, por ouvirem minhas reclamações e passarem por todos os problemas comigo e nunca me deixarem desistir.

Aos meus orientadores professor Fernando e professora Marita, por todos os ensinamentos, paciência, incentivos e oportunidades que me proporcionaram esses anos todos.

A todos os meus companheiros de laboratório, que passaram pela minha vida, os que ainda continuam e os que virão, por tornar essa jornada mais leve, engraçada, por me ajudarem nos momentos de dificuldade e de alguma forma me acrescentarem conhecimento. Vocês tornam a vida mais leve!

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, da Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Unesp Câmpus de Jaboticabal.

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias pela utilização do Software Bionumerics 7.1®.

A todos os funcionários do Departamento de patologia, reprodução e saúde única e da Seção técnica de pós-graduação que sempre foram tão atenciosos e pacientes comigo, e olha que eu dei trabalho.

Aos professores da minha banca de defesa, pela atenção e cuidado ao corrigir meu trabalho e fazerem parte do meu crescimento profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001..

E aos animais, que muitas vezes são negligenciados e maltratados, mas que fazem parte deste mundo e merecem respeito. Por eles eu me tornei médica veterinária e eles estarão sempre em minha vida.

Obrigada!

	Sumário	Páginas
1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
	2.1 Suinocultura no Brasil	2
	2.2 <i>Escherichia coli</i> na suinocultura.....	3
	2.3 Resistência a antimicrobianos	4
	2.4 Mecanismos de resistência.....	5
	2.5 Antibióticos como promotores de crescimento na suinocultura	8
	2.6 Impacto ambiental do uso de antibióticos na suinocultura.....	10
	2.7 Situação da resistência microbiana no mundo	11
3	MATERIAIS E MÉTODOS	13
	3.1 Amostras.....	13
	3.2 PCR para identificação de genes de resistência e espécie	14
	3.3 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos	15
	3.4 Análise de similaridade genética	16
	3.5 Análise Estatística Descritiva	16
4	RESULTADOS.....	17
5	DISCUSSÃO	20
6	CONCLUSÃO	23
7	REFERÊNCIAS.....	23

***Escherichia coli* MULTIRRESISTENTE EM FEZES E CARÇAÇAS DE SUÍNOS NO BRASIL**

RESUMO - A resistência bacteriana a agentes antimicrobianos vem, ao longo dos anos, sendo uma ameaça crescente que resulta em um problema global de saúde pública. Pode ter como causa o uso excessivo de compostos antimicrobianos na medicina humana, na medicina veterinária e na agropecuária, gerando uma pressão de seleção que ocorre em microrganismos resistentes que podem disseminar genes responsáveis por proporcionar mecanismos de defesa para outros microrganismos. O estudo teve como objetivo detectar e caracterizar enterobactérias resistentes a antimicrobianos em amostras de fezes e carcaças de suínos. Foram utilizadas 214 amostras, entre elas 111 de fezes e 103 de carcaça de suínos que foram coletadas de dois frigoríficos em 2010 na região de Jaboticabal – SP e estavam estocadas em freezer à -80 °C. Para detectar a presença de genes associados à resistência e isolar as bactérias positivas foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), resultando em 22 cepas isoladas. A mesma técnica foi utilizada para determinar o gênero e espécie dos microrganismos isolados. Com um total de 22 isolados foi realizada a técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) a fim de investigar a similaridade genética entre eles. O método de disco difusão Kirby-Bauer foi utilizado para caracterizar a resistência fenotípica a diferentes antimicrobianos. Os resultados foram importantes para demonstrar a presença do gene blaCTX-M-1 nos 22 isolados de *Escherichia coli*. Além disso, todas as cepas foram consideradas multirresistentes, apresentando 100% de resistência à Colistina, antimicrobiano de última eleição em medicina humana. Ainda, os isolados demonstraram alta diversidade genética entre si. Dessa forma, genes de resistência podem ser transmitidos entre diferentes espécies bacterianas que podem ser disseminadas por meio de produtos de origem animal para seres humanos, aumentando o alerta para a sanidade na produção e para saúde pública.

Palavras-chave: enterobactérias; genes de resistência; pressão de seleção; resistência antimicrobiana; suinocultura

MULTIDRUG-RESISTANT *Escherichia coli* IN FECES AND CARCASSES OF PIGS IN BRAZIL

ABSTRACT - Bacterial resistance to antimicrobial agents has, over the years, become a growing threat that results in a global public health issue. It can be caused by the excessive use of antimicrobial compounds in human medicine, veterinary medicine, and agriculture, generating a selection pressure that occurs in resistant microorganisms capable of spreading genes responsible for providing defense mechanisms to other microorganisms. The study aimed to detect and characterize antimicrobial-resistant enterobacteria in swine feces and carcasses samples. A total of 214 samples were used, including 111 from pig feces and 103 from pig carcasses, which were stored in freezer at -80 °C. The Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was employed to detect the presence of resistance-associated genes and to isolate positive bacteria. The same technique was used to determine the genus and species of the isolated microorganisms. A total of 22 isolates underwent Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE) to investigate genetic similarity. The Kirby-Bauer disk diffusion method was used to characterize phenotypic resistance to different antimicrobials. The results were important in demonstrating the presence of the blaCTX-M-1 in all 22 isolates of *Escherichia coli*. Furthermore, all strains were considered multidrug-resistant, showing 100% resistance to Colistin, a last-resort antimicrobial in human medicine. Additionally, the isolates exhibited high genetic diversity among themselves. Thus, resistance genes can be transmitted among different bacterial species, which can be disseminated through animal-derived products to humans, raising concerns for production safety and public health.

Key-words: enterobacteria; resistance genes; selection pressure; antimicrobial resistance; swine farming

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande exportador de produtos de origem animal, incluindo a carne suína e seus derivados, para o mundo. Os principais importadores desses produtos são países da Ásia, África e Europa (ABPA, 2023). Além disso, a preocupação com a contaminação desses alimentos por meio de bactérias multirresistentes tem crescido ao longo dos anos (Albernaz-Gonçalves et al., 2021).

Essa preocupação com o aumento da multirresistência deve-se a pressão de seleção que os microrganismos vêm sofrendo devido ao uso inconsciente de agentes antimicrobianos, e como resultado, há uma melhor adaptação deles através da disseminação e expressão de genes de resistência (Holmes et al., 2016). O aumento da resistência a antimicrobianos é um problema global de saúde pública, que tem como uma das possíveis causas o uso indiscriminado de compostos antimicrobianos na medicina humana, medicina veterinária, na agropecuária e meio ambiente, com extensa transmissão de microrganismos resistentes entre essas áreas (McEwen e Collignon, 2018). Um dos microrganismos mais estudados e identificados na produção animal é a *Escherichia coli*. Ela é responsável por causar infecções gastrointestinais importantes em suínos neonatos, como a colibacilose que acarreta diarreia e morte de leitões, prejudicando a produção. Os animais podem adquirir essas bactérias, com diferentes genes de resistência que as tornam multirresistentes, da mãe e os que sobrevivem carregá-las até a idade de abate (Trongjit et al., 2022).

É importante ressaltar que diversos genes relacionados à resistência a antimicrobianos foram detectados em *Escherichia coli* isolada de produções animais. O mais comum é o *bla*CTX-M, responsável por proporcionar resistência às classes de Beta Lactâmicos, moléculas usadas em larga escala tanto em humanos como na produção animal como forma profilática (Cormier et al., 2019). A resistência à multidrogas têm sido estudada com veemência nas últimas décadas, e o que se destaca é que bactérias oportunistas estão demonstrando resistência a um maior número de moléculas diferentes. Estudos realizados na China mostram que a resistência a antimicrobianos como estreptomicina, ampicilina, tetraciclina e

sulfametoxazol é a mais predominante encontrada em cepas de *Escherichia coli* em animais de produção (Zhou et al., 2022).

Essa disseminação de resistência entre cepas pode ser facilitada pela presença de genes em elementos móveis como os plasmídeos, que facilitam a transferência de genes entre bactérias diferentes (Trongjit et al., 2022). Devido a expressiva disseminação e aumento de bactérias multirresistentes, discute-se a importância do monitoramento constante e de diferentes indicadores de resistência em animais de produção, a fim de produzir alimentos com menos contaminação e priorizar soluções para o problema de multirresistência (Hesp et al., 2021).

Baseado na importância do monitoramento da resistência a agentes antimicrobianos, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes e carcaças de suínos. Para isso foi realizada a detecção de genes relacionados à resistência por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, análise fenotípica de resistência a diferentes antimicrobianos pela técnica de disco difusão e análise de similaridade genética entre os isolados através de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Suinocultura no Brasil

O Brasil foi o quarto maior produtor e exportador de carne suína no mundo no último ano, abatendo mais de 45 milhões de cabeças em 2022 (ABPA, 2023). O consumo de carne suína no mercado interno brasileiro aumentou de 14.9 Kg/habitantes em 2012 para 18 Kg/hab em 2022. Enquanto a exportação foi de 582 mil toneladas em 2012 para mais de 1 milhão de toneladas em 2022, sendo países da Ásia como China e Japão os maiores importadores. O aumento expressivo no consumo e exportação dos produtos fez elevar a receita do mercado de 1.4 milhões para mais de 2.5 milhões de dólares anuais nos últimos dez anos (ABPA, 2023).

A produção de carne e derivados suínos apresenta uma significativa contribuição para a economia do agronegócio brasileiro. A grande maioria da produção encontra-se nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, sendo que o maior

rebanho se localiza nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná (da Silva et al., 2017).

O tipo de produção muda de acordo com cada região do país. Na região sul predomina o sistema de cooperativas e produtores integrados e especializados em diferentes fases de criação, enquanto na região sudeste concentra-se maior número de produtores independentes e de ciclo completo de produção (ABCS, 2016).

A presença de rebanhos suínos nas regiões centro-oeste, norte e nordeste tornou-se maior ao longo dos anos, mesmo o clima sendo desfavorável para a espécie. Isso se deve à expansão do agronegócio para essas regiões com maior número de terras (ABCS, 2016). A maioria dos produtores são independentes e de subsistência, sendo difícil mensurar o número de animais criados e abatidos, dessa forma apresentando baixa importância industrial. Como consequência há pouca ou nenhuma inspeção de abate nessas regiões (Rodrigues et al., 2008).

No entanto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento dispõe de regulamentos como o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade Suídea (PNSS), regulamentado pela Instrução Normativa nº 47 de 18/10/2004 que visa boas práticas de produção, e prevenção e erradicação de doenças em suínos (MAPA, 2004).

2.2 *Escherichia coli* na suinocultura

As infecções causadas por *Escherichia coli* em animais são comumente chamadas de colibacilose. A colibacilose em suínos é uma infecção comum principalmente em neonatos, causando diarreia também no período pós desmame. Além disso pode provocar doença do edema, mastite, doença do trato urinário e septicemia (Barros et al., 2023).

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa, flagelada que coloniza o trato gastrointestinal de animais e humanos, ligando-se aos enterócitos (Riley, 2020). Em suínos neonatos que ainda não possuem o sistema imunológico completamente desenvolvido essa bactéria pode causar infecção ainda nas primeiras duas semanas de vida, ocasionando diarreia grave e morte (Rhouma et al., 2017).

A colibacilose em suínos pode ser causada por diferentes sorotipos e patótipos de *E. coli*, sendo bastante comum os tipos enterotoxigenica (ETEC) e shigatoxigenica (STEC) que podem infectar os animais em diferentes idades. Dessa forma as doenças causadas por essa bactéria são prevalentes em rebanhos suínos e causam grandes perdas econômicas para a indústria devido a morbidade e mortalidade expressivas nesses casos (García-Meniño et al., 2021). Logo, além da vacinação, há o uso excessivo de moléculas antimicrobianas nos rebanhos a fim de controlar e tratar possíveis infecções por *Escherichia coli* e outros microrganismos. Essas ações provocam o aumento de bactérias multirresistentes que podem ser disseminadas entre os animais e contaminar produtos como a carne que serão consumidos por humanos (Curcio et al., 2017). Além disso, as fezes de animais infectados podem contaminar solo, água e plantações aumentando o risco de disseminação de superbactérias no meio ambiente e causar infecções de forma indireta em seres humanos através do consumo de verduras contaminadas com essas bactérias originadas de fezes dos animais (Yang et al., 2017).

2.3 Resistência a antimicrobianos

A resistência microbiana tem sido alvo de extensas pesquisas em todo o mundo devido à preocupação com as possíveis consequências para a saúde pública nos últimos tempos. Essa resistência não é recente, pois é inerente à própria natureza dos microrganismos desenvolverem mecanismos de defesa, exemplificados por alguns fungos que produzem antibióticos, como a penicilina (Morrison e Zembower, 2020). Mesmo antes do primeiro uso da penicilina em 1940, já havia sido identificada uma cepa de *Staphylococcus* resistente, sendo as primeiras penicilinas descritas em 1959 (Sengupta et al., 2013).

O principal problema está na rápida disseminação da resistência entre os microrganismos devido ao uso incorreto de antimicrobianos e ao aumento da globalização e trânsito de pessoas, animais e produtos pelo mundo (Jian et al., 2021; MacPherson et al., 2009). O consumo de antimicrobianos vêm aumentando desde o início do século 21, tanto em humanos como em animais. Em diversas regiões do mundo, a avicultura, suinocultura e bovinocultura ultrapassa milhões de animais,

resultando em um amplo uso de antibióticos tratar infecções e aumentar a produtividade. Esse uso descontrolado causa também contaminação ambiental, pois os resíduos são excretados nas fezes animais e descartados pela indústria de modo que podem chegar no meio ambiente contaminando solo e água (Sarmah et al., 2006).

Dessa forma, a única certeza no momento é que o uso equivocado desses medicamentos na medicina humana, veterinária e agricultura é a principal causa do problema de resistência globalmente (McEwen e Collignon, 2018).

A resistência a antimicrobianos pode ser disseminada entre microrganismos por meio de transferência de genes responsáveis por codificar diferentes fatores de resistência. A transferência desses genes pode ocorrer por mecanismos diversos. Uma célula hospedeira pode repassar o gene cromossomal para sua progênie, ou através de elementos móveis como plasmídeos, que carregam os genes em seu material genético para uma célula receptora (Holmes et al., 2016).

2.4 Mecanismos de resistência

As bactérias podem apresentar tipos diferentes de resistência, podendo ser intrínseca, adquirida ou adaptativa (Christaki et al., 2020).

A resistência intrínseca está associada a fatores inerentes à própria bactéria, como a impermeabilidade da membrana externa de Gram-negativas, que impede a entrada de algumas classes de antimicrobianos como os glicopeptídeos na célula.

Na resistência adquirida, uma bactéria receptora adquire mecanismos por meio de mutação ou transferência horizontal de material genético de uma bactéria doadora. A transferência horizontal pode se dar por três formas diferentes: 1) transformação, a bactéria receptora adquire DNA livre no ambiente de uma bactéria morta que liberou esse material; 2) transdução, envolve a transferência de material genético por meio de um vírus bacteriófago; 3) conjugação, mecanismo pelo qual a bactéria receptora recebe material genético pelo contato direto através de pili sexual com uma bactéria doadora, que transmite o plasmídeo, elemento móvel capaz de carrear diferentes genes relacionados à resistência em seu material genético (Munita e Arias, 2016).

Já a resistência adaptativa ocorre por meio de sinais específicos do ambiente em que a bactéria está inserida, como restrição de nutrientes, estresse, mudança de

pH, baixas dosagens de antibiótico, e permite com que a bactéria consiga ser resistente a um ou mais antibióticos (Lee et al., 2019).

Esses fatores estão sempre relacionados à genes que são transmitidos entre os microrganismos e permitem a evolução destes. Existem diferentes tipos de genes relacionados a fatores de resistência, sendo o *bla*CTX-M mais relacionado às bactérias Gram-negativas. Esse gene é responsável por codificar enzimas Beta lactamases de espectro estendido (ESBL) capazes de hidrolisar a estrutura do anel Beta lactâmico de antimicrobianos como cefalosporinas, penicilinas, carbapenemos e monobactâmicos. A primeira enzima CTX-M foi descoberta em 1989, mas foi somente no início dos anos 2000 que o gene foi mais reconhecido devido à disseminação em *Escherichia coli* e o uso intensivo de cefalosporinas em hospitais (Lahlaoui et al., 2014).

O gene *bla*CTX-M ocorre em vários lugares do mundo, como Europa, América e Ásia, em enterobactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e em *Pseudomonas* spp. isoladas de humanos em hospitais e comunidades, animais, produtos de origem animal e meio ambiente (Castanheira et al., 2021). O grupo mais comum durante bastante tempo da descoberta do gene foi o CTX-M-1, no entanto atualmente existem diferentes grupos desse gene, o mais encontrado no mundo é CTX-M-15, seguido de CTX-M-14 e CTX-M-27 (Bush and Bradford 2020). No Brasil as variantes mais encontradas nos últimos anos são CTX-M-2 e CTX-M-15, seguidas de CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-59. (Rocha et al., 2016).

Esse gene teve origem cromossomal em bactérias do gênero *Kluyvera*, no entanto foi mobilizado para elementos móveis, como plasmídeos conjugativos e dessa forma teve sua disseminação acelerada globalmente. Assim, o gene *bla*CTX-M-15 foi amplamente disseminado pelos diferentes continentes por meio de plasmídeos de diversas famílias transmitidos principalmente entre linhagens de *E. coli* (Naseer e Sundsfjord, 2011).

Além desse, os genes *bla*KPC e *bla*NDM são responsáveis por codificar enzimas carbapenemases, que são um tipo de Beta Lactamase responsáveis por hidrolisar a estrutura do anel Beta Lactâmico, normalmente mais encontrados na família *Enterobacteriaceae* (Christaki et al., 2020). Nos últimos anos têm aumentado a frequência de isolados positivos para esses genes e produtores de múltiplas

carbapenemases, tornando as cepas multirresistentes e dificultando o tratamento de infecções graves. Dessa forma, a única medida mais efetiva para tratamento de infecções causadas por esses microrganismos, sendo o mais comum nessas características a *Klebsiella pneumoniae*, é a associação de diferentes antimicrobianos como Meropenem, Imipenem, Colistina e Aztreonam. Depois da pandemia causada pela COVID-19, a resistência a esses antibióticos aumentou significativamente na América do Sul devido ao uso excessivo para tratamento de co-infecções (Vásquez-Ponce et al., 2022).

Outro gene de grande importância atualmente no mundo e que também é transmitido por meio de plasmídeos é o *mcr*, relacionado à resistência à Colistina. A Colistina faz parte do grupo das polimixinas e é um antibiótico de última escolha para o tratamento de infecções em humanos causadas por bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemase. Sua molécula é um polipeptídio catiônico hidrofílico e lipofílico, ela age interagindo com os lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa, fazendo a célula bacteriana perder íons de magnésio e cálcio, dessa forma é um antibiótico bactericida (Caniaux et al., 2017).

Existem diferentes mecanismos bacterianos para a resistência à Colistina, mas atualmente o mais importante é o mediado pelo gene *mcr* que codifica a enzima PEtN transferase que faz com que a bactéria adicione fosfoetanolamina no lipídeo A da sua camada de lipopolissacarídeos, isso modifica o sítio de ação do antibiótico fazendo com que ele perca o efeito na bactéria (Liu et al., 2016).

Uma das grandes causas de aumento da resistência à Colistina é o seu uso na produção animal como profilaxia para aumento da produtividade e tratamento de infecções, principalmente na suinocultura em várias regiões do mundo. O problema do uso descontrolado na agropecuária é a geração de resíduos do antibiótico que podem chegar ao meio ambiente e a possibilidade de contaminação cruzada da carne e produtos de origem animal por bactérias que carregam o gene *mcr* em plasmídeos, e assim entrarão em contato com humanos que irão manipular e consumir esses produtos (Trongjit et al., 2022).

Até o momento existem dez variantes diferentes descobertas do gene *mcr* (1-10) em várias espécies bacterianas isoladas de humanos, animais, alimentos e meio ambiente. Entre as diferentes variantes, a mais reportada é a *mcr-1* que foi descoberta

em *E. coli* isolada de amostras de carne entre 2011 e 2014 na China e em mais de 20 países com uma diferença de três meses, demonstrando como sua disseminação pode ser rápida, sendo a Colistina um antibiótico muito usado na ração animal para melhorar a produção na China (Liu et al., 2016). Os genes *mcr-1* ao *mcr-9* foram descobertos até 2019, e o gene *mcr-10* em 2020, sendo este mais recente. Foram encontrados em cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp, *Enterobacter* sp., *Proteus* sp., e *Aeromonas* sp. (Hussein et al., 2021). Os genes *mcr-1*, *mcr-2* e *mcr-4* já foram detectados em plasmídeos presentes em bactérias isoladas de humanos e suínos na Itália (Carattoli et al., 2017; Carretto et al., 2018; Hussein et al., 2021).

No Brasil, a primeira ocorrência do gene *mcr-1* em plasmídeo foi reportada em 2016, em cepa de *E. coli* isolada de uma infecção de pé em um paciente diabético (Fernandes et al., 2016). O gene também foi detectado em outras cepas de *E. coli* multirresistentes causando infecções em humanos no nordeste e no Paraná, demonstrando a disseminação em diferentes regiões do país (Pillonetto et al., 2019; Rocha et al., 2017).

Enquanto o gene *mcr* foi detectado no Brasil somente em 2016, *E. coli* e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* resistente à Colistina foram isoladas de amostras de suínos em 2012 (Morales et al., 2012). A Colistina é usada há décadas na suinocultura em preparações oral para prevenção e tratamento de diarreia causada principalmente por *E. coli*, e com isso a resistência a esse antibiótico se tornou cada vez mais comum (Rhouma et al., 2017).

2.5 Antibióticos como promotores de crescimento na suinocultura

Antibióticos têm sido usados na produção animal durante décadas, não apenas para tratamento de infecções, mas como promotores de crescimento, inclusive na suinocultura. São usados na ração animal porque são eficientes no auxílio ao ganho de peso. Eles atuam inibindo a microbiota intestinal normal do animal e isso faz com que aumente a absorção e aproveitamento de nutrientes pelo animal, reduzindo o consumo deles pelos microrganismos presentes no intestino, ou seja, ocorre retenção de energia e nitrogênio, melhora a absorção de vitaminas e minerais,

aumenta a absorção de gorduras, reduz o trânsito do alimento no intestino fazendo com que o animal consuma menos ração porém ganhando mais peso, modifica as paredes do intestino, além de inibir infecções subclínicas (Gaskins et al., 2002).

Há uma década, no Brasil eram utilizados Colistina e Tilosina na alimentação de suínos como promotores de crescimento, principalmente em leitões. A Tilosina é um macrolídeo que altera a microbiota intestinal e promove colonização por lactobacilos, melhorando a conversão alimentar dos leitões. Já a Colistina, uma polimixina, reduz bactérias Gram-negativas no intestino, especialmente *E. coli*, que podem causar infecções subclínicas. O fator preocupante é que baixas concentrações desses antibióticos já foram encontradas nos dejetos dos animais e no efluente de tratamento de esgoto, mesmo não influenciando no processo de biodigestão de dejetos, esses antibióticos podem entrar em contato com bactérias do ambiente e promover o desenvolvimento de resistência pelo processo de adaptação (Gavioli et al., 2013).

Não só no Brasil são utilizados promotores de crescimento, mas em todo o mundo. Em 2017, foram utilizadas 93 mil toneladas de antibióticos na alimentação animal, e a expectativa é de que esse valor aumente cerca de 11,5% até 2030 globalmente (Tiseo et al., 2020).

Para tentar evitar o aumento da resistência a antimicrobianos de última escolha utilizados na medicina humana, alguns trabalhos sugerem uso de alternativas para promotores de crescimento na produção animal, como compostos fitoquímicos que têm origem em plantas e possuem ação antimicrobiana, antioxidante, imunomodulatória e melhorias na morfologia intestinal dos animais (Álvarez-Martínez et al., 2021; Li et al., 2021; Rossi et al., 2020).

Além disso, probióticos são muito estudados como alternativa aos antibióticos. Probióticos são microrganismos, bactérias ou leveduras, que possuem a habilidade de reduzir microrganismos patogênicos quando ingeridas nas quantidades adequadas e para serem eficientes precisam resistir ao ácido gástrico e sais biliares dos animais além de se aderir na mucosa intestinal (Dubreuil, 2017). Podem ser usados em diferentes fases de crescimento do animal, na suinocultura os probióticos são muito usados em matrizes e lactantes pois melhoram a ingestão de alimento e conversão alimentar, gerando mais energia para a fêmea durante essa fase. Já na fase de

crescimento é o período de melhores resultados porque o animal ainda não tem a microbiota formada, então o probiótico auxilia na produção de enzimas digestivas, modulação imunológica e melhora a resposta contra patógenos. Na fase de engorda, quando o animal está mais velho, probióticos auxiliam na conversão alimentar, a reduzir a produção de gases intestinais, melhora a qualidade da carne e reduz a contaminação ambiental por resíduos de antibióticos (Pereira et al., 2022).

2.6 Impacto ambiental do uso de antibióticos na suinocultura

O impacto do uso indiscriminado de antimicrobianos também é evidente no meio ambiente e vêm aumentando ao longo dos anos em fazendas de produção de animais, especialmente em países com grandes rebanhos. Cerca de 30 a 90% dos antibióticos usados em animais é excretado em seus dejetos devido à baixa absorção ou problemas no metabolismo, e são eliminados no ambiente (Sarmah et al., 2006).

Na China há uma grande produção de suínos, entre grandes, médios e pequenos produtores. De acordo com o estudo de Du et al. (2022) realizado na China, fazendas de grande e pequena produção de suínos foram as que demonstraram maior concentração de antibióticos em águas residuais em relação às fazendas de média escala, o que segundo eles isso se deve às diferenças na forma de uso e dosagem de antibióticos fornecidos aos animais. Além disso, resíduos de antibióticos são maiores em fazendas de produção de leitões e engorda em relação a criação de matrizes reprodutoras.

Por outro lado, países europeus têm demonstrado baixo uso de antibióticos para prevenção de infecções e promoção de crescimento na produção animal devido às restrições e regulamentação do uso estabelecidas ao longo do tempo. Tetraciclina são as moléculas mais empregadas na Irlanda e Holanda, enquanto penicilinas são predominantes na Noruega e Suécia. Contudo, o uso excessivo de antimicrobianos na medicina humana ainda persiste na Europa, resultando na excreção de resíduos dessas moléculas nas fezes e urina de humanos além na de animais, afetando o meio ambiente. Mesmo tendo baixa quantidade de resíduos em corpos d'água na Europa, as concentrações de antibióticos são suficientes para promover o processo de resistência em microrganismos (Monahan et al., 2021).

O descarte de resíduos de antimicrobianos pode afetar solo, vegetação, rios e lençóis freáticos e assim prejudicar a diversidade de espécies da microbiota do solo, gerar bactérias resistentes e disseminar genes relacionados à resistência (Sun et al., 2021). Ainda, a contaminação de lençóis freáticos em determinadas regiões pode prejudicar populações que dependem deste como suprimento de água para consumo. Além disso a presença de genes relacionados à resistência em amostras de água subterrânea sugere a transferência horizontal destes genes em diferentes fontes de água, logo oferece risco à saúde pública por isso o uso de antibióticos na produção animal deveria ser controlado com mais rigor e maior cuidado no tratamento de dejetos e águas residuais (Li et al., 2018).

2.7 Situação da resistência microbiana no mundo

A resistência a antimicrobianos é uma ameaça crescente à saúde pública no Brasil e no mundo. Bactérias podem colonizar diferentes hospedeiros (humanos, animais e plantas) e o compartilhamento de habitats juntamente com genes relacionados à resistência em elementos móveis podem diminuir a especificidade por esses hospedeiros e promover a disseminação da resistência com mais facilidade. Além disso, condições sociais e ambientais como acesso à água potável, consumo de alimentos contaminados favorecem a transmissão de microrganismos patogênicos e resistentes a humanos (Hernando-Amado et al., 2019).

O uso indiscriminado de antibióticos de última eleição para humanos na medicina veterinária vem aumentando o problema de patógenos multirresistentes causando infecções em humanos. Na China e Europa, a Colistina é usada na ração e água de bebida na produção de aves e suínos muitas vezes em doses menores para favorecer o crescimento dos animais e tratar infecções causadas por *E. coli*, o problema é significativo ao ponto de que novas formas de resistência, associadas ao gene *mcr* descoberto há pouco tempo, foram desenvolvidas pelos microrganismos. O risco é justamente a contaminação de alimentos provenientes desses animais e que serão consumidos por humanos. Dessa forma, a propagação de bactérias resistentes só aumenta (Rhouma et al., 2016).

Além da Colistina, Cefalosporinas de terceira geração também são moléculas usadas na medicina humana como tratamento de eleição para diversas infecções graves causadas por bactérias Gram-negativas. No entanto, também são usadas em animais de produção, inclusive em suínos para tratar doenças do sistema respiratório. A resistência à cefalosporinas também é mediada por genes como *bla*CTX-M e *bla*CMY, os quais estão presentes em plasmídeos. Os países com menor frequência de resistência em *E. coli* em suínos estão na Europa, América do Norte e a Austrália, resultado da implantação de políticas que restringem o uso de antibióticos na produção animal. Por outro lado, países asiáticos como China, Índia, Tailândia e Tanzânia enfrentam altas taxas de resistência, evidenciando deficiências nas políticas de criação animal e a necessidade de melhorias na vigilância do uso indiscriminado de antimicrobianos (Hayer et al., 2022).

O consumo de antimicrobianos na ração animal em 2010 era cerca de 63 mil toneladas, mas as projeções para até 2030 é que esse número aumente em 67% (Van Boeckel et al., 2015). O problema da resistência microbiana é multisetorial, acarretando humanos, animais e ambiente. Estima-se que em 2019, cerca de 4.95 milhões de mortes foram associadas a bactérias resistentes e 1.27 milhões foram atribuídas à multirresistência (Murray et al., 2022).

Com a pandemia causada pela COVID-19 em 2020 houve um aumento de 15% na resistência a antimicrobianos de última escolha para tratamento de infecções generalizadas como cefalosporinas de terceira geração, meropenem e azitromicina em relação ao ano de 2017, número que pode estar abaixo do real devido às dificuldades no trabalho de vigilância nesse período. Entre 2017 e 2020 os antibióticos mais usados por via oral foram do grupo dos Beta Lactâmicos, sendo penicilina e amoxicilina com algum inibidor de beta lactamase, além deles a ciprofloxacina e azitromicina (WHO, 2022).

Para que haja resultados melhores no controle da multirresistência é, necessário trabalho conjunto entre as nações, a utilização de técnicas avançadas para monitoramento genético de cepas, como o sequenciamento, o monitoramento do meio ambiente e medidas prudentes para a redução do uso de antimicrobianos na medicina humana e na produção animal, além de controlar a fabricação e o descarte de resíduos dessas moléculas no meio ambiente (Xiong et al., 2018).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

As amostras utilizadas neste trabalho foram previamente coletadas pela equipe do Laboratório de Microbiologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal e estavam armazenadas em glicerol 30% em freezer a -80 °C (Borges et al., 2012). Para esse estudo, foram utilizadas 214 amostras de suínos, sendo 111 de swabe de fezes e 103 de carcaça, coletadas em 2 frigoríficos diferentes situados na região de Jaboticabal no estado de São Paulo em 2010. As coletas foram nomeadas de coleta 1 (51 amostras de fezes e 45 de carcaça) e coleta 2 (60 amostras de fezes e 58 de carcaça). Cada amostra positiva para os genes alvo foi semeada em placas de Petri com ágar MacConkey por meio de semeadura por esgotamento, colocadas em estufa a 37°C por 24 horas. Foram selecionadas cinco colônias com morfologias diferentes de cada amostra e semeadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) para o processo de extração de DNA e técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a fim de detectar genes de resistência (Figura 1). Como controle positivo foram usadas uma cepa de *E. coli* e uma de *K. pneumoniae* positivas para os genes de resistência e que pertencem à bacterioteca do laboratório. As colônias pesquisadas positivas para pelo menos um gene de resistência foram selecionadas para o estudo.

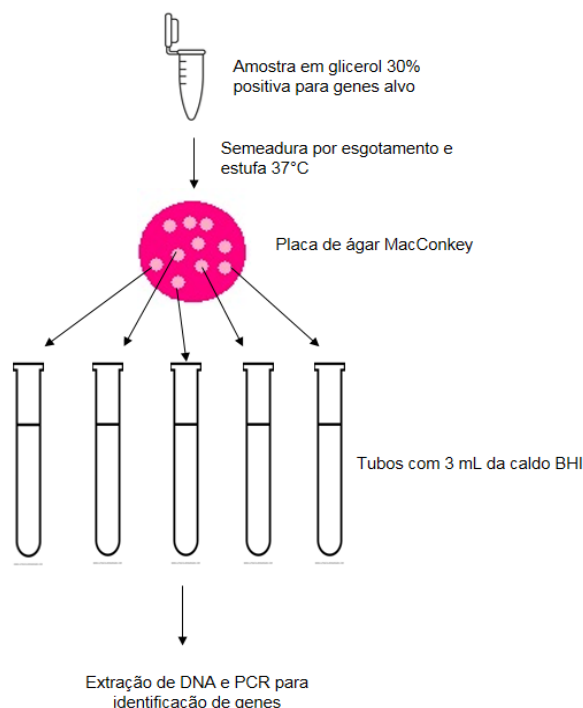


Figura 1. Esquema demonstrando a técnica utilizada para seleção de colônias positivas para os genes alvo.

3.2 PCR para identificação de genes de resistência e espécie

A preparação do DNA bacteriano para análise da presença de genes de resistência foi realizada pelo método de fervura durante 10 minutos (Ewers et al. 2004). A PCR foi realizada com soluções contendo 0,4µL de 10mM dNTP, 2µL de 10X Taq Polymerase Buffer, 0,8µL de 50mM MgCl₂, 1µL de 5pmol iniciador, 0,2µL de Taq Polymerase, 1µL de DNA molde e água ultrapura para completar 20µL. A técnica teve objetivo de identificar os genes relacionados à resistência *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-2, *bla*CMY-1, *bla*CMY-2, *bla*KPC, *bla*NDM, *mcr*-1, *mcr*-2, *mcr*-3 e *mcr*-4 (Tabela 1) (Dallenne et al., 2010; Kojima et al., 2005; Poirel et al., 2011; Rebelo et al., 2018).

Além da pesquisa de genes relacionados à resistência, a técnica foi utilizada para identificação de gênero ou espécie dos isolados, por meio dos primers de *Eschericia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella* spp. (Tabela 1) (Fratamico e Strobaugh, 1998; Li et al., 2019; Tsen et al., 1998).

Tabela 1. Sequência de primers e seus tamanhos utilizados para detecção de genes relacionados à resistência e espécie.

Gene	Sequência do primer (5' € 3')	Fragmento amplificado (pb)	Referência
CTX-M-1	F - TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	688	Dallene et al., 2010
	R - CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
CTX-M-2	F - CGTTAACGGCACGATGAC	404	Dallene et al., 2010
	R - CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
CMY-1	F - ATGCAACAACGACAATCCATCCTG	1560	Kojima et al., 2005
	R - TCAACCGGCCAACTGCGCCAGGAT		
CMY-2	F - ATGATGAAAAATCGTTATGCT	3202	Kojima et al., 2005
	R - TTATTGCAGCTTTTCAAGAATGCG		
KPC	F - CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798	Poirel et al., 2005
	R - CTTGTCATCCTTGTTAGGCG		
MCR-1	F - AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	320	Rebelo et al., 2018
	R - AGATCCTTGGTCTCGGCTTG		
MCR-2	F - CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	715	Rebelo et al., 2018
	R - TCTAGCCCGACAAGCATACC		
MCR-3	F - AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	929	Rebelo et al., 2018
	R - AATGGAGATCCCCGTTTTT		
MCR-4	F - TCACTTTCATCACTGCGTTG	1116	Rebelo et al., 2018
	R - TTGGTCCATGACTACCAATG		
NDM	F- GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621	Poirel et al., 2005
	R - CGGAATGGCTCATCACGATC		
<i>E. coli</i>	F: GGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTC	584	Tsen et al., 1998
	R: TTCCCGAAGGCACATTCT		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	F - CCGATAGAGAACTCGAACTG	203	Li et al., 2019
	R - TCTGATGCATTTTACCCTGAT		
<i>Salmonella spp.</i>	F - CGG TGG TTT TAA GCG TAC TAT T	796	Fratamico & Strobaugh, 1998
	R - CGA ATA TGC TCC ACA AGG TTA		

3.3 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Os isolados foram submetidos a teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de disco difusão Kirby-Bauer de acordo com manual CLSI (CLSI, 2018). Foram testados os seguintes antimicrobianos: Amoxicilina + Ácido Clavulânico (30µg), Ampicilina (10µg), Amicacina (30µg), Ceftazidima (30µg), Cefotaxima (30µg), Cefoxitina (30µg), Ceftriaxona (30µg), Ciprofloxacina (5µg), Fosfomicina (50µg), Tetraciclina (30µg), Estreptomicina (10µg), Sulfametoxazol+Trimetoprim (25µg),

Imipenem (10µg), Colistina (10µg). A leitura dos halos de inibição foi realizada com régua graduada e comparada com as tabelas de referência do manual.

3.4 Análise de similaridade genética

A similaridade genética das cepas isoladas de amostras fecais e de carcaças de suínos foi realizada através da técnica de PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*), de acordo com (Ribot et al., 2006). A preparação dos plugs e a digestão do DNA cromossomal foi feita com a enzima Xba I (Invitrogen® EUA). A estirpe de *Salmonella* Braenderup H9812 foi usada como referência de peso molecular. A eletroforese teve duração de 21 horas, a 14 °C, em gel de agarose Pulsefield Certified 1% de acordo com protocolo utilizado. A semelhança dos fragmentos foi comparada utilizando o coeficiente de Dice a 1% de tolerância e 0,5% de otimização, de modo que o dendograma foi calculado por agrupamento UPGMA no programa BioNumerics versão 7.1 (Applied Maths, Sint-Matens-Latem, Bélgica).

3.5 Análise Estatística Descritiva

Nesse estudo utilizamos uma abordagem de análise estatística abrangente para resumir e apresentar nossos dados de maneira eficaz. Isso envolveu a utilização de estatística descritiva para fornecer um resumo conciso, abrangendo medidas como médias, medianas, desvio padrão e quartis para variáveis contínuas, juntamente com a geração de tabelas de frequência e porcentagens correspondentes para variáveis categóricas. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando a linguagem R para computação estatística, especificamente versão 4.0.1.

4 RESULTADOS

Foi obtido um total de 22 isolados, sendo 13 isolados de fezes e 9 isolados de carcaça de suínos. Todas as cepas foram positivas para o gene relacionado à resistência *bla*CTX-M-1. Os demais genes pesquisados não foram encontrados nas amostras. Além disso, os 22 isolados foram submetidos à PCR para identificação da espécie, sendo todos positivos para *Escherichia coli*.

No teste de suscetibilidade a antimicrobianos (Tabela 2), 100% dos isolados apresentaram resistência a multidrogas, ou seja, foram resistentes a pelo menos 3 classes diferentes de antimicrobianos (Magiorakos et al. 2012). Os antimicrobianos que mais sofreram resistência foram Colistina (100%), Cefalotina (95,5%), Estreptomicina e Tetraciclina (90,9%), Sulfametoxazol+Trimetoprim (86,4%) e Ampicilina (72%). Já o Imipenem foi efetivo em 100% dos isolados, além dele 95,5% dos isolados demonstraram sensibilidade a Ceftazidima, Amicacina e Fosfomicina (Figura 2).

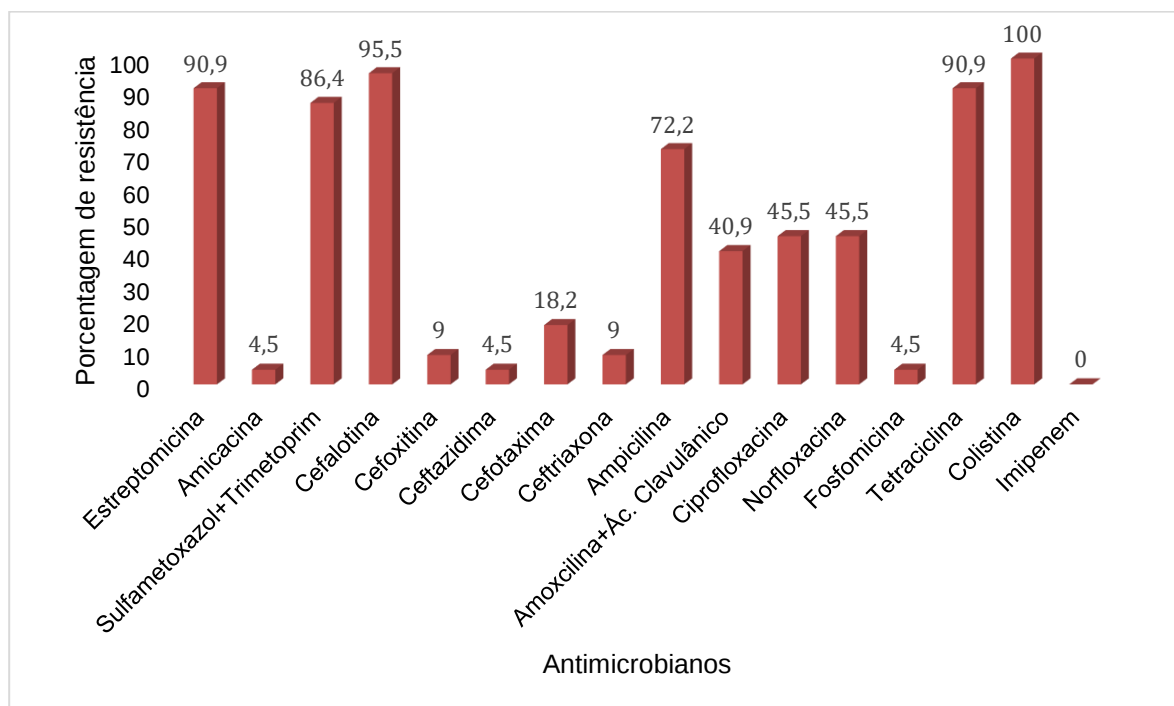


Figura 2. Gráfico em barras apresentando a porcentagem de resistência de cada antimicrobiano.

Tabela 2. Perfil de resistência fenotípica dos isolados a diferentes antimicrobianos

Isolado	Espécie	Origem	Sensível	Resistente
1	<i>E. coli</i>	Fezes	AMI, CFO, AMC, FOS, IPM, CAZ, CTX, CRO	EST, SUT, CIP, AMP, TET, COL, CFL, NOR
2	<i>E. coli</i>	Fezes	AMI, CIP, AMP, AMC, FOS, IPM, CAZ, CTX, CRO	EST, SUT, CFO, TET, COL, NOR
3	<i>E. coli</i>	Fezes	AMI, CFO, CIP, AMC, FOS, IPM, CAZ, CTX, CRO	EST, SUT, AMP, TET, COL, NOR
4	<i>E. coli</i>	Fezes	AMI, CFO, AMC, FOS, IPM, NOR, CTX, CRO	EST, SUT, CIP, AMP, TET, COL, CAZ
5	<i>E. coli</i>	Fezes	AMI, CFO, CIP, AMC, FOS, IPM, CAZ, CTX, CRO	EST, SUT, AMP, TET, COL, NOR
6	<i>E. coli</i>	Fezes	AMI, CFO, CIP, AMP, AMC, FOS, IPM, NOR, CAZ, CTX, CRO	EST, SUT, TET, COL
7	<i>E. coli</i>	Fezes	AMI, CFO, CIP, AMC, FOS, IPM, NOR, CAZ, CTX	EST, SUT, AMP, TET, COL, CRO
8	<i>E. coli</i>	Fezes	CFO, AMP, AMC, FOS, IPM, CAZ, CTX, CRO	EST, AMI, SUT, CIP, TET, COL, NOR
9	<i>E. coli</i>	Fezes	AMI, CFO, CIP, FOS, IPM, CAZ, CTX, CRO	EST, SUT, AMP, AMC, TET, COL, NOR
10	<i>E. coli</i>	Fezes	AMI, CFO, FOS, IPM, CAZ	EST, SUT, CIP, AMP, AMC, TET, COL, NOR, CTX, CRO
11	<i>E. coli</i>	Fezes	AMI, CFO, CIP, FOS, IPM, NOR, CAZ, CRO	EST, SUT, AMP, AMC, TET, COL, CTX
12	<i>E. coli</i>	Fezes	AMI, CFO, IPM, NOR, CAZ, CTX, CRO	EST, SUT, CIP, AMP, AMC, FOS, TET, COL
13	<i>E. coli</i>	Fezes	AMI, CFO, FOS, IPM, CAZ, CTX, CRO	EST, SUT, CIP, AMP, AMC, TET, COL, NOR
14	<i>E. coli</i>	Carça	EST, AMI, SUT, CFO, AMC, FOS, TET, IPM, NOR, CAZ, CTX, CRO	CIP, AMP, COL
15	<i>E. coli</i>	Carça	EST, AMI, SUT, AMC, FOS, IPM, NOR, CAZ, CRO	CFO, CIP, AMP, TET, COL, CTX
16	<i>E. coli</i>	Carça	AMI, SUT, CFO, CIP, AMP, AMC, FOS, TET, IPM, NOR, CAZ, CTX, CRO	EST, COL
17	<i>E. coli</i>	Carça	AMI, CFO, AMP, AMC, FOS, IPM, CAZ, CTX, CRO	EST, SUT, CIP, TET, COL, NOR
18	<i>E. coli</i>	Carça	AMI, CFO, CIP, FOS, IPM, NOR, CAZ, CTX, CRO	EST, SUT, AMP, AMC, TET, COL
19	<i>E. coli</i>	Carça	AMI, CFO, CIP, FOS, IPM, NOR, CAZ, CTX, CRO	EST, SUT, AMP, AMC, TET, COL
20	<i>E. coli</i>	Carça	AMI, CFO, CIP, FOS, IPM, NOR, CAZ, CTX, CRO	EST, SUT, AMP, AMC, TET, COL
21	<i>E. coli</i>	Carça	AMI, CFO, CIP, AMP, AMC, FOS, IPM, NOR, CAZ, CRO	EST, SUT, TET, COL, CTX
22	<i>E. coli</i>	Carça	AMI, CFO, FOS, IPM, CAZ, CTX, CRO	EST, SUT, CIP, AMP, AMC, TET, COL, NOR

*AMC: Amoxicilina+clavulanato; AMI: Amicacina; AMP: Ampicilina; CAZ: Ceftazidima; CFL: Cefalotina; CFO: Cefoxitina; CIP: Ciprofloxacina; COL: Colistina; CRO: Ceftriaxona; CTX: Cefotaxima; EST: Estreptomicina; FOS: Fosfomicina; IPM: Imipenem; NOR: Norfloxacin; SUT: Sulfametoxazol+Trimetoprim; TET: Tetraciclina.

Na técnica de PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*) para a análise de similaridade genética, os isolados mostraram heterogeneidade entre si (Figura 3). Houve 100% de similaridade genética entre os isolados 4 e 6 que foram obtidos da mesma amostra de fezes, entre os isolados 14 e 15 provenientes de mesma origem de amostra de carcaça, e entre as cepas 18 e 19 obtidas de outra amostra de carcaça. As cepas 18 e 19 demonstraram o mesmo padrão de resistência aos mesmos antimicrobianos, já as cepas 4 e 6 apresentaram diferenças na resistência fenotípica em relação a Ciprofloxacina, Ceftazidima e Ampicilina sendo a 4 resistente aos três antimicrobianos e a 6 sensível a eles, enquanto as cepas 14 e 15 diferiram entre si em relação a Cefoxitina, sendo a cepa 14 sensível, enquanto a cepa 15 demonstrou resistência ao antimicrobiano.

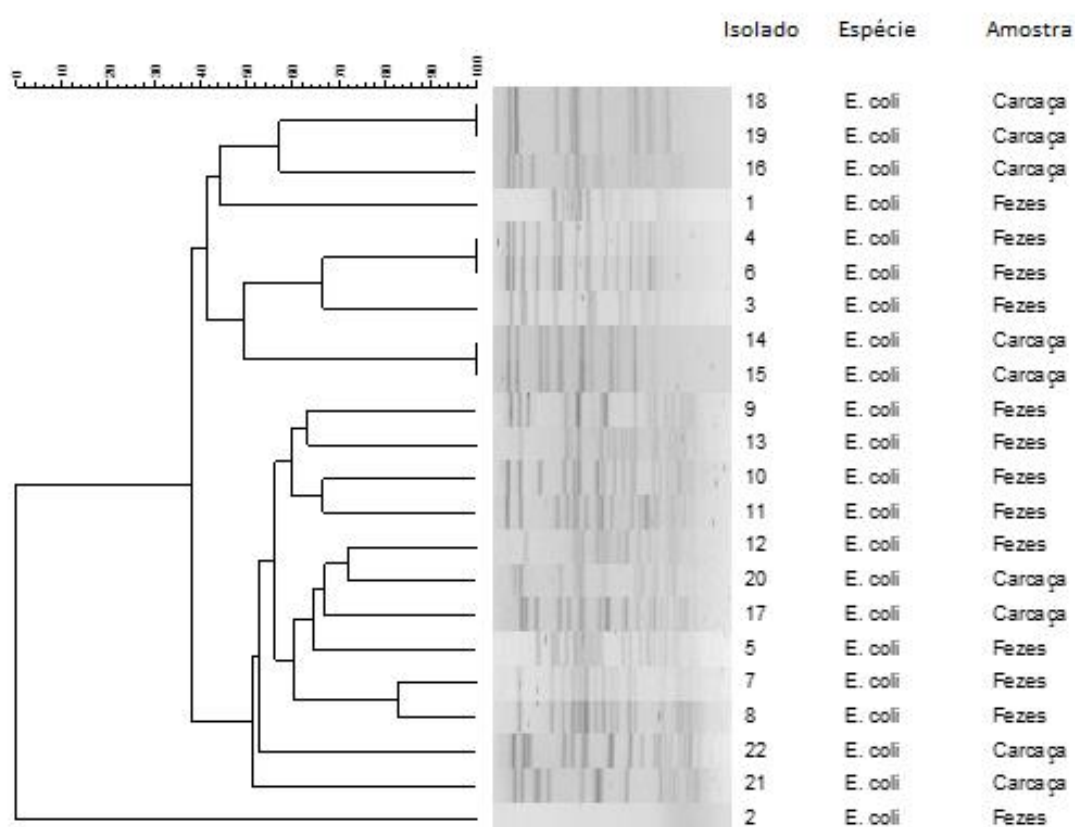


Figura 3. Dendrograma demonstrando a diversidade genética entre as 22 cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de carcaça e de fezes de suínos e sua origem.

5 DISCUSSÃO

A presença do gene *bla*CTX-M nos isolados pode ser explicada pelo fato deste, ser o mais comumente encontrado em bactérias ESBL (*Extended Spectrum Beta Lactamase* – Beta Lactamase de Espectro Estendido) isoladas de humanos e animais de produção, como suínos, aves e bovinos globalmente (Bevan et al., 2017).

Enterobactérias positivas para o gene *bla*CTX-M-1 já foram isoladas de amostras de suínos em abatedouros e criadouros em diferentes países como Reino Unido, Suíça e Argentina (Faccone et al., 2019; Geser et al., 2011; Randall et al., 2014).

Além disso, os genes da família *bla*CTX-M já foram encontrados em bactérias isoladas de diferentes espécies animais, incluindo de companhia e em humanos. Isso sugere que há grande disseminação desses genes entre nichos ambientais diferentes, o que pode ser explicado pela possível presença dos genes em elementos móveis transmitidos entre diferentes espécies bacterianas (Cormier et al., 2019).

No presente trabalho foram analisados os genes *mcr*-1 a 4, primeiros descobertos relacionados à resistência ao antimicrobiano Colistina (Nakano et al., 2021; Wang et al., 2020). Embora não tenha sido detectada a presença desses quatro genes, existem outras novas variantes que representam diferentes formas de resistência à Colistina, visto que a codificação genética está em constante evolução e descoberta (Hussein et al., 2021). Mesmo sem a detecção dessas quatro variantes do gene, os isolados apresentaram 100% de resistência fenotípica à Colistina, fator mais importante pois demonstra que o antimicrobiano não irá funcionar em tratamentos contra possíveis infecções causadas por essas bactérias.

A baixa detecção de genes de resistência e a alta sensibilidade dos isolados às cefalosporinas no presente trabalho, pode estar relacionada ao uso restrito e consciente desses agentes na produção de suínos. A resistência fenotípica às cefalosporinas de terceira e quarta geração, pode se dar pela expressão do gene, e sua disseminação pode ser agravada pela presença em elementos móveis e pelo uso incorreto desses antimicrobianos nas criações animais, selecionando isolados positivos com transferência horizontal do gene (Livermore et al., 2007).

No entanto, assim como em outros países (Agersø e Aarestrup, 2013), o Brasil vem instituindo instruções com a finalidade de reduzir o uso de determinadas moléculas antimicrobianas na produção animal (Rabello et al., 2020), o que pode justificar os resultados encontrados na presente pesquisa.

As porcentagens de resistência mais preocupantes observadas nos isolados deste estudo foram para Colistina (100%), Estreptomicina (90,9%), Tetraciclina (90,9%), Cefalotina (95,5%), Sulfametoxazol (86,4%) e Ampicilina (72,2%). Esses resultados evidenciam a presença de multirresistência em cepas de *Escherichia coli* isoladas de suínos, caracterizando-as como MDR (*Multidrug Resistant* – Resistentes a multidrogas) e estão de acordo com resultados encontrados em outras pesquisas realizadas, inclusive no Brasil. Esses resultados reforçam a presença de resistência em *E. coli* em diversas fases de criação de suínos, tanto em sistemas com uso quanto sem uso de antimicrobianos (Brisola et al., 2019; Lugsomya et al., 2018). É importante ressaltar que as amostras analisadas no estudo foram obtidas em 2010, já demonstrando expressiva resistência. Portanto, é possível que o perfil de resistência tenha evoluído ao longo dos anos em bactérias presentes na produção animal. Nesse sentido, é interessante realizar a coleta e monitoramento constante dos microrganismos ao longo da cadeia produtiva, visando promover melhorias na saúde pública, a produção de alimentos e reduzir a multirresistência.

A Colistina, antimicrobiano com maior porcentagem de resistência entre os isolados (100%), é uma molécula de última eleição, normalmente utilizada para tratamento de infecções severas em humanos. No entanto, tem sido amplamente usada na medicina veterinária, principalmente na suinocultura, com a intenção de tratar e/ou prevenir diarreia inclusive em neonatos. Como consequência ao uso descontrolado, houve o aumento exacerbado da resistência a esse antimicrobiano em todo o mundo, como constatado nos resultados do presente trabalho e na literatura (Trongjit et al., 2022). A presença de enterobactérias resistentes à Colistina em alimentos que serão consumidos por humanos oferece um risco alto à saúde e a perda desta molécula para tratamento de doenças causadas por essas bactérias.

Em contraponto à outras classes de antimicrobianos que demonstraram sofrer alta resistência, as cefalosporinas de 3º geração revelaram sofrerem menos resistência nos isolados deste trabalho. As cepas demonstraram 95,5% de

sensibilidade à Ceftazidima, 90,9% à Ceftriaxona e 81,8% à Cefotaxima. Essa alta sensibilidade pode ocorrer devido ao baixo uso desses antimicrobianos na produção suína brasileira. Em países da Europa que produzem suínos sem uso de cefalosporinas, como na Suíça, o isolamento de bactérias resistentes a essas moléculas também é baixo (Moor et al., 2021), enquanto na Dinamarca um estudo demonstrou que 79% das cepas de *E. coli* isoladas de fazendas que fazem uso indiscriminado de cefalosporinas eram resistentes, diferente de cepas isoladas de fazendas que não utilizam os antimicrobianos que demonstraram apenas 27% de resistência (Hammerum et al., 2014).

O único antimicrobiano que demonstrou 100% de sensibilidade foi o Imipenem, um beta-lactâmico do subgrupo dos carbapenemos. A alta sensibilidade condiz com o encontrado na literatura (Egbule et al., 2021), o que pode ser causada pelo não uso desse tipo de antimicrobianos na suinocultura local, proporcionando um baixo contato dessa molécula com bactérias presentes nesse ambiente.

Na técnica de PFGE (Figura 3), foi observada a formação de diferentes clusters no dendrograma, sugerindo alto grau de diversidade genética entre os isolados. No geral as cepas demonstraram uma similaridade de 60% entre si o que pode ser considerado baixo, isso sugere que diferentes cepas de enterobactérias podem estar presentes em animais e seus produtos, como a carne, podendo compartilhar entre si diferentes fatores de resistência a antimicrobianos. E dessa forma, mostrou que a carne pode não ser contaminada diretamente por bactérias presentes nas fezes do animal, mas sim por outras fontes que também disseminam microrganismos resistentes durante o processo de abate quando não há boas práticas de fabricação (Viltrop et al., 2023). No entanto, diferentemente do presente trabalho, outros autores encontraram alta similaridade genética entre cepas de *Escherichia coli* em suínos no abatedouro e suas carcaças, mostrando que os produtos de origem animal também podem ser contaminados pelas mesmas estirpes presentes na produção e até mesmo serem transmitidas para humanos (Zelendova et al., 2020). Os isolados 4 e 6, 14 e 15; e 18 e 19 apresentaram similaridade genética de 100% entre cada dupla. Os isolados 4 e 6 foram originados da mesma amostra de fezes, já os isolados 14 e 15 pertencem a uma mesma amostra de carcaça, enquanto, os isolados 18 e 19 foram selecionados de outra amostra de carcaça, demonstrando alta similaridade genética

entre si de acordo com a técnica do PFGE. No entanto, demonstrou-se diferenças em relação à resistência fenotípica a alguns antimicrobianos entre as cepas 4 e 6 que são similares e 14 e 15. Isso mostra que elas podem ter a mesma origem, mas adquirir genes ao longo do tempo e diferir na expressão de fatores de resistência. Os diferentes genes podem ser transmitidos de uma cepa para outra por meio do processo de conjugação de plasmídeos que os carregam em seu material genético, em que uma bactéria doadora transmite o plasmídeo com o gene para uma bactéria receptora (Headd e Bradford, 2020).

6 CONCLUSÃO

- A identificação de genes relacionados a resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli* é significativa em suínos, o que é um risco para a saúde humana.
- Todos os isolados do trabalho foram multirresistentes, esse fato provoca um alerta ao uso incorreto de antimicrobianos na produção animal.
- É possível a transmissão de bactérias com genes relacionados a resistência entre produtos de origem animal e humanos, evidenciando a preocupação com a saúde pública.
- A resistência microbiana é um agravo preocupante para a saúde no mundo todo.
- É necessário medidas e ações mais eficazes para reduzir a disseminação rápida de microrganismos patogênicos e multirresistentes.

7 REFERÊNCIAS

ABCS 2016: Mapeamento da Suinocultura Brasileira (2016). Brasília: Associação Brasileira dos Criadores de Suínos, 2016. p.376.

ABPA. 2023. "Relatório Anual 2023." Associação Brasileira de Proteína Animal 80. Brasil, 2023. p. 1-75.

AgersoØ Y, Aarestrup FM (2013) Voluntary Ban on Cephalosporin Use in Danish Pig Production Has Effectively Reduced Extended-Spectrum Cephalosporinase-Producing *Escherichia coli* in Slaughter Pigs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 68(3):569–72. doi: 10.1093/jac/dks427.

Albernaz-Gonçalves R, Olmos G, Hötzel MJ (2021) Exploring Farmers' Reasons for Antibiotic Use and Misuse in Pig Farms in Brazil. **Antibiotics** 10(3): 331. doi: 10.3390/antibiotics10030331.

Álvarez-Martínez FJ, Barrajón-Catalán E, Herranz-López M, Micol V (2021) Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. **Phytomedicine** 90:153626. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153626.

Barros MM, Castro J, Araújo D, Campos AM, Oliveira R, Silva S, Outor-Monteiro D, Almeida C (2023) Swine Colibacillosis: Global Epidemiologic and Antimicrobial Scenario. **Antibiotics** 12(4):1–19. doi: 10.3390/antibiotics12040682.

Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM (2017) Global Epidemiology of CTX-M β -Lactamases: Temporal and Geographical Shifts in Genotype. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 72(8):2145–55. doi: 10.1093/jac/dkx146.

Borges CA, Beraldo LG, Maluta RP, Cardozo MV, Guth BEC, Rigobelo EC, Ávila FA (2012) Shiga Toxigenic and Atypical Enteropathogenic *Escherichia Coli* in the Feces and Carcasses of Slaughtered Pigs. **Foodborne Pathogens and Disease** 9(12):1119–25. doi: 10.1089/fpd.2012.1206.

Brisola MC, Crecencio RB, Bitner DS, Frigo A, Rampazzo L, Stefani LM, Faria GA (2019) *Escherichia coli* Used as a Biomarker of Antimicrobial Resistance in Pig Farms of Southern Brazil. **Science of the Total Environment** 647(10):362–68. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.438.

Bush K, Bradford PA (2020) Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews** 33(2) :e00047-19. doi: 10.1128/CMR.00047-19.

Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF (2017) MCR: Modern Colistin Resistance. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases** 36(3):415–20.

Carretto E, Brovarone F, Nardini P, Russello G, Barbarini D, Pongolini S, Gagliotti C, Carattoli A, Sarti M (2018) Detection of Mcr-4 Positive *Salmonella Enterica* Seroovar *Typhimurium* in Clinical Isolates of Human Origin, Italy, October to November 2016. **Eurosurveillance** 23(2). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.2.17-00821.

Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA (2021) Extended-Spectrum β -Lactamases: An Update on Their Characteristics, Epidemiology and Detection. **JAC-Antimicrobial Resistance** 3(3):dlab092.doi: 10.1093/jacamr/dlab092.

Christaki E, Marcou M, Tofarides A (2020) Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution** 88(1):26–40.

CLSI. 2018. *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Vol. 8.

Cormier A, Zhang PLC, Chalmers G, Weese JS, Deckert A, Mulvey M, McAllister T, Boerlin P (2019) Diversity of CTX-M-Positive *Escherichia Coli* Recovered from Animals in Canada. **Veterinary Microbiology** 231(January):71–75. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.02.031.

Curcio L, Luppi A, Bonilauri P, Gherpelli Y, Pezzotti G, Pesciaroli M, Magistrali CF (2017) Detection of the Colistin Resistance Gene Mcr-1 in Pathogenic *Escherichia Coli* from Pigs Affected by Post-Weaning Diarrhoea in Italy. **Journal of Global Antimicrobial Resistance** 10:80–83. doi: 10.1016/j.jgar.2017.03.014.

Dallenne C, da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G (2010) Development of a Set of Multiplex PCR Assays for the Detection of Genes Encoding Important β -Lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 65(3):490–95. doi: 10.1093/jac/dkp498.

Du D, Zhou J, Zhang K, Zhi S (2022) Seasonal Pollution Characteristics of Antibiotics on Pig Farms of Different Scales. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 6;19(14):8264. doi: 10.3390/ijerph19148264.

Dubreuil JD (2017) Enterotoxigenic *Escherichia coli* and probiotics in swine: what the bleep do we know? **Bioscience of Microbiota Food and Health**. 36(3):75-90. doi: 10.12938/bmfh.16-030.

Egbule OS, Iweriebor BC, Odum EI (2021) Beta-Lactamase-Producing *Escherichia Coli* Isolates Recovered from Pig Handlers in Retail Shops and Abattoirs in Selected Localities in Southern Nigeria: Implications for Public Health. **Antibiotics** 10(1):1–10. doi: 10.3390/antibiotics10010009.

Ewers C, Janßen T, Kießling S, Philipp HC, Wieler LH (2004) Molecular Epidemiology of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Isolated from Colisepticemia in Poultry. **Veterinary Microbiology** 104(1–2):91–101. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.09.008.

Faccone D, Moredo FA, Giacoboni GI, Albornoz E, Alarcón L, Nievas VF, Corso A (2019) Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Harboring Mcr-1 and BlaCTX-M Genes Isolated from Swine in Argentina. **Journal of Global Antimicrobial Resistance** 18:160–62. doi: 10.1016/j.jgar.2019.03.011.

Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA, Moura Q, Pérez-Chaparro PJ, Esposito F, Sartori L, Dropa M, Matté MH, Lira DPA, Mamizuka EM, Lincopan N (2016) First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the Mcr-1 Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a Human Infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 60(10):6415–17. doi: 10.1128/AAC.01325-16.

Fratamico PM, Strobaugh TP (1998) Simultaneous Detection of *Salmonella* Spp and *Escherichia Coli* 0157:H7 by Multiplex PCR. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 21(3):92–98. doi: 10.1038/sj.jim.2900520.

García-Meniño I, García V, Alonso MP, Blanco JE, Blanco J, Mora A (2021) Clones of Enterotoxigenic and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Implicated in Swine Enteric Colibacillosis in Spain and Rates of Antibiotic Resistance. **Veterinary Microbiology** 252:108924. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108924.

Gaskins HR, Collier CT, Anderson DB (2002) Antibiotics as growth promotants: mode of action. **Animal Biotechnology** 13(1):29-42. doi: 10.1081/ABIO-120005768.

Gavioli DF, Oliveira ER, da Silva AA, Romero NC, Lozano AP, Silva RAM, Bridi AM, Oba A, da Silva CA (2013) Efeito de promotores de crescimento para suínos sobre o desempenho zootécnico, a qualidade intestinal e a eficiência da

biodigestão dos dejetos. **Semina: Ciências Agrárias** 34(6), p. 3983-3998. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3983

Geser N, Stephan R, Kuhnert P, Zbinden R, Kaeppli U, Cernela N, Haechler H (2011) Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Swine and Cattle at Slaughter in Switzerland. **Journal of Food Protection** 74(3):446–49. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-372.

Hammerum AM, Larsen J, Andersen VD, Lester CH, Skovgaard Skytte TS, Hansen F, Olsen SS, Mordhorst H, Skov RL, Aarestrup FM, Agersø Y (2014) Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 69(10):2650-7. doi: 10.1093/jac/dku180.

Hayer SS, Casanova-Higes A, Paladino E, Elnekave E, Nault A, Johnson T, Bender J, Perez A, Alvarez J. (2022) Global Distribution of Extended Spectrum Cephalosporin and Carbapenem Resistance and Associated Resistance Markers in *Escherichia coli* of Swine Origin - A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Microbiology** 10; 13:853810. doi: 10.3389/fmicb.2022.853810.

Headd B, Bradford AS (2020) The Conjugation Window in a *Escherichia Coli* K12 Strain with an IncFII Plasmid. **Applied and Environmental Microbiology** 86(17):1–18.

Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, Martínez JL (2019) Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. **Nature Microbiology**. 4(9):1432-1442. doi: 10.1038/s41564-019-0503-9.

Hesp, A, ter Braak C, van der Goot J, Veldman K, van Schaik G, Mevius D (2021) Antimicrobial Resistance Clusters in Commensal *Escherichia Coli* from Livestock. **Zoonoses and Public Health** 68(3):194–202. doi: 10.1111/zph.12805.

Holmes, AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin PJ, Piddock LJV (2016) Understanding the Mechanisms and Drivers of Antimicrobial Resistance. **The Lancet** 387(10014):176–87. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0.

Hussein NH, AL-Kadmy IMS, Taha BM, Hussein JD (2021) Mobilized Colistin Resistance (Mcr) Genes from 1 to 10: A Comprehensive Review. **Molecular Biology Reports** 48(3):2897–2907. doi: 10.1007/s11033-021-06307-y.

Jian Z, Zeng L, Xu T, Sun S, Yan S, Yang L, Huang Y, Jia J, Dou T (2021) Antibiotic Resistance Genes in Bacteria: Occurrence, Spread, and Control. **Journal of Basic Microbiology** 61(12):1049–70.

Kojima A, Ishii Y, Ishihara K, Esaki H, Asai T, Oda C, Tamura Y, Yamaguchi K (2005) Extended-Spectrum--Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Farm Animals from 1999 to 2002: Report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 49(8):3533–37. doi: 10.1128/AAC.49.8.3533.

Lahlaoui H, Khalifa ABH, Moussa MB (2014) Epidemiology of Enterobacteriaceae Producing CTX-M Type Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL). **Medecine et Maladies Infectieuses** 44(9):400–404.

Lee JH (2019) Perspectives towards Antibiotic Resistance: From Molecules to Population. **Journal of Microbiology** 57(3):181–84.

Li C, Fu G, Shi Y, Zhang AM, Xia X, Fang Y, Mao X, Jiang J, Song Y, Yang G (2019) Rapid, Specific, and Sensitive Detection of the Uer₁ Gene in *Klebsiella pneumoniae* by Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 52(3):1–9. doi: 10.1590/1414-431x20198186.

Li L, Sun X, Zhao D, Dai H (2021) Pharmacological Applications and Action Mechanisms of Phytochemicals as Alternatives to Antibiotics in Pig Production. **Frontiers in Immunology** 9; 12:798553. doi: 10.3389/fimmu.2021.798553.

Li X, Liu C, Chen Y, Huang H, Ren T (2018) Antibiotic residues in liquid manure from swine feedlot and their effects on nearby groundwater in regions of North China. **Environmental Science and Pollution Research International** 25(12):11565–11575. doi: 10.1007/s11356-018-1339-1.

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological

study. **Lancet Infectious Diseases** 16(2):161-8. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N (2007) CTX-M: Changing the Face of ESBLs in Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 59(2):165–74. doi: 10.1093/jac/dkl483.

Lugsomya K, Yindee J, Niyomtham W, Tribuddharat C, Tummaruk P, Hampson DJ, Prapasarakul N (2018) Antimicrobial Resistance in Commensal *Escherichia Coli* Isolated from Pigs and Pork Derived from Farms Either Routinely Using or Not Using In-Feed Antimicrobials. **Microbial Drug Resistance** 24(7):1054–66. doi: 10.1089/mdr.2018.0154.

MacPherson, DW, Gushulak BD, Baine WB, Bala S, Gubbins PO, Holtom P, Segarra-Newnham M (2009) Population Mobility, Globalization, and Antimicrobial Drug Resistance. **Emerging Infectious Diseases** 15(11):1727–32.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL (2012) Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. **Clinical Microbiology and Infection** 18(3):268–81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570. x.

McEwen SA, Collignon PJ (2018) Antimicrobial Resistance: A One Health Colloquium. **Microbiology Spectrum** 6(2):1–26. doi: 10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2004) Instrução Normativa N° 47, de 18 de julho de 2004. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/arquivos/programassanitarios/2004IN47PNSS.pdf/view>

Monahan C, Nag R, Morris D, Cummins E. Antibiotic residues in the aquatic environment - current perspective and risk considerations (2021) **Journal of**

Environment Science and Health 56(7):733-751. doi: 10.1080/10934529.2021.1923311.

Moor J, Aebi S, Rickli S, Mostacci N, Overesch G, Oppliger A, Hilty M (2021) Dynamics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in pig farms: A longitudinal study. **International Journal of Antimicrobial Agents** 58(3):106382. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106382.

Morales AS, Fragoso de Araújo J, de Moura Gomes VT, Costa ATR, Rodrigues DP, Ferreira TSP, Filsner PHL, Felizardo MR, Moreno AM (2012) Colistin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains isolated from swine in Brazil. **Scientific World Journal**. 2012:109795. doi: 10.1100/2012/109795.

Morrison L, Zembower TR (2020) Antimicrobial Resistance. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America** 30(4):619–35.

Munita JM, Arias CA (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance edited by I. T. Kudva and Q. Zhang. **Microbiology Spectrum** 4(2). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet** 399:629-55. doi: 10.1016/ s0140-6736(21)02724-0.

Nakano A, Nakano R, Nishisouzu R, Suzuki Y, Horiuchi S, Kikuchi-Ueda T, Ubagai T, Ono Y, Yano H (2021) Prevalence and Relatedness of Mcr-1-Mediated Colistin-Resistant *Escherichia Coli* Isolated From Livestock and Farmers in Japan. **Frontiers in Microbiology** 26:12:664931. doi: 10.3389/fmicb.2021.664931.

Naseer U, Sundsfjord A (2011) The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. **Microbial Drug Resistance** 17(1):83-97. doi: 10.1089/mdr.2010.0132

Pereira WA, Franco SM, Reis IL, Mendonça CMN, Piazzentin ACM, Azevedo POS, Tse MLP, De Martinis ECP, Gierus M, Oliveira RPS (2022) Beneficial effects of probiotics on the pig production cycle: An overview of clinical impacts and performance. **Veterinary Microbiology** 269:109431. doi: 10.1016/j.vetmic.2022.109431.

Pillonetto M, Mazzetti A, Becker GN, Siebra CA, Arend LNVS, Barth AL (2019) Low Level of Polymyxin Resistance among Nonclonal Mcr-1–Positive *Escherichia Coli* from Human Sources in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 93(2):140–42. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.009.

Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P (2011) Multiplex PCR for Detection of Acquired Carbapenemase Genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 70(1):119–23. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002.

Rabello RF, Bonelli RR, Penna BA, Albuquerque JP, Souza RM, Cerqueira AMF (2020) Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update Overview. **Animals** 10(4):1–43. doi: 10.3390/ani10040552.

Randall LP, Lemma F, Rogers JP, Cheney TEA, Powell LF, Teale CJ (2014) Prevalence of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* from Pigs at Slaughter in the UK in 2013. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 69(11):2947–50. doi: 10.1093/jac/dku258.

Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, Guerra B, Malorny B, Borowiak M, Hammerl JA, Battisti A, Franco A, Alba P, Perrin-Guyomard A, Granier SA, Escobar CF, Malhotra-Kumar S, Villa L, Carattoli A, Hendriksen RS (2018) Multiplex PCR for Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Determinants, Mcr-1, Mcr-2, Mcr-3, Mcr-4 and Mcr-5 for Surveillance Purposes. **Eurosurveillance** 23(6):1–11. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672.

Rhouma M, Beaudry F, Letellier A (2016) Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? **International Journal of Antimicrobial Agents** 48(2):119-26. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.04.008.

Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A (2017) Post Weaning Diarrhea in Pigs: Risk Factors and Non-Colistin-Based Control Strategies. **Acta Veterinaria Scandinavica** 59(1):1–19. doi: 10.1186/s13028-017-0299-7.

Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ (2006) Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease** 3(1):59–67. doi: 10.1089/fpd.2006.3.59.

Riley LW (2020) Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. **Microbial Spectrum** 8(4):10.1128. doi: 10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020

Rocha IV, Andrade CAN, Campos TL, Rezende AM, Leal NC, Vidal CFL, Xavier DE (2017) Ciprofloxacin-Resistant and Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* ST410 Strain Carrying the Mcr-1 Gene Associated with Bloodstream Infection. **International Journal of Antimicrobial Agents** 49(5):655–56.

Rodrigues GZ, Gomes MFM, Cunha DA, Santos VF (2008) Evolução Da Produção de Carne Suína No Brasil: Uma Análise Estrutural-Diferencial. **Revista de Economia e Agronegócio** 6(3):343–66.

Rossi B, Toschi A, Piva A, Grilli E. (2020) Single components of botanicals and nature-identical compounds as a non-antibiotic strategy to ameliorate health status and improve performance in poultry and pigs. **Nutrition Research Reviews** 33(2):218-234. doi: 10.1017/S0954422420000013

Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA (2006) A Global Perspective on the Use, Sales, Exposure Pathways, Occurrence, Fate and Effects of Veterinary Antibiotics (VAs) in the Environment. **Chemosphere** 65(5):725–59.

Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP (2013) The Multifaceted Roles of Antibiotics and Antibiotic Resistance in Nature. **Frontiers in Microbiology** 12:4:47. doi: 10.3389/fmicb.2013.00047.

da Silva ICM, Bremm B, Teixeira JL, Costa NS, Barcellos JOJ, Braccini J, Cesconeto RJ, McManus C (2017) Spatialization of Brazilian Pig Production: Relationship between Productive, Physical, Environmental, and Socio-Economic Variables. **Tropical Animal Health and Production** 49(5):951–58. doi: 10.1007/s11250-017-1281-0.

Sun Y, Guo Y, Shi M, Qiu T, Gao M, Tian S, Wang X (2021) Effect of antibiotic type and vegetable species on antibiotic accumulation in soil-vegetable system, soil microbiota, and resistance genes. **Chemosphere** 263:128099. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128099.

Tiseo K, Huber L, Gilbert M, Robinson TP, Van Boeckel TP (2020) Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. **Antibiotics (Basel)** 17;9(12):918. doi: 10.3390/antibiotics9120918.

Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 5:112(18):5649-54. doi: 10.1073/pnas.1503141112.

Viltrop A, Niine T, Tobias T, Sassu EL, Bartolo ID, Pavoni E, Alborali GL, Burow E, Smith RP (2023) A Review of Slaughter Practices and Their Effectiveness to Control Microbial - esp. *Salmonella* spp. - Contamination of Pig Carcasses. **Journal of Food Protection** 86(11):100171. doi: 10.1016/j.jfp.2023.100171.

World Health Organization (WHO) (2022) Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report: 2022 9(Dec) 82 p. ISBN: 9789240062702 disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702>.

Xiong W, Sun Y, Zeng Z (2018) Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. **Environmental Science and Pollution Research International** (19):18377-18384. doi: 10.1007/s11356-018-1852-2.

Yang CS, Chih Y, Lin H, Aljuffali IA, You J (2017) Current Pathogenic *Escherichia Coli* Foodborne Outbreak Cases and Therapy Development. **Archives of Microbiology** 199(6):811–25. doi: 10.1007/s00203-017-1393-y.

Zelendova M, Dolejska M, Masarikova M, Jamborova I, Vasek J, Smola J, Manga I, Cizek A (2020) CTX-M-Producing *Escherichia coli* in Pigs from a Czech Farm during Production Cycle. **Letters in Applied Microbiology** 71(4):369–76. doi: 10.1111/lam.13331.

Zhou W, Lin R, Zhou Z, Ma J, Lin H, Zheng H, Wang J, Wu J, Dong Y, Jiang H, Yang H, Yang Z, Tang B, Yue M (2022) Antimicrobial Resistance and Genomic Characterization of *Escherichia coli* from Pigs and Chickens in Zhejiang, China. **Frontiers in Microbiology** 13(October):1–13. doi: 10.3389/fmicb.2022.1018682.