

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**UMA ABORDAGEM EM *ONE HEALTH* PARA ESTABELECEER AS POTENCIAIS  
ROTAS DE DISTRIBUIÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM UMA  
CADEIA DE PRODUÇÃO DE CARNE SUÍNA**

ARYELE NUNES DA CRUZ ENCIDE SAMPAIO

Botucatu – SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**UMA ABORDAGEM EM *ONE HEALTH* PARA ESTABELEECER AS POTENCIAIS  
ROTAS DE DISTRIBUIÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM UMA  
CADEIA DE PRODUÇÃO DE CARNE SUÍNA**

ARYELE NUNES DA CRUZ ENCIDE SAMPAIO

Dissertação apresentada junto ao Programa  
de Pós-graduação em Medicina Veterinária  
para obtenção de título do Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Gonçalves  
Pereira

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Sampaio, Aryele Nunes da Cruz Encide.

Uma abordagem em *One Health* para estabelecer as potenciais rotas de distribuição de resistência a antibióticos em uma cadeia de produção de carne suína / Aryele Nunes da Cruz Encide Sampaio. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Juliano Gonçalves Pereira

Capes: 50505009

1. Suínos. 2. Carne - Produção. 3. Enterobactérias. 4. Resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: ESBL; Enterobactérias; Resistência múltipla aos antimicrobianos; Suídeos.

Nome do Autor: Aryele Nunes da Cruz Encide Sampaio

Título: UMA ABORDAGEM EM ONE HEALTH PARA ESTABELEECER AS POTENCIAIS ROTAS DE DISTRIBUIÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM UMA CADEIA DE PRODUÇÃO DE CARNE SUÍNA

### COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira

Presidente e Orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Marcio Garcia Ribeiro

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Ricardo Seiti Yamatogi

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

UFV – Viçosa

Data da defesa: 28 de janeiro de 2022.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente por ter me dado a oportunidade de chegar até aqui, que me confortou nos momentos difíceis da caminhada me dando força e sabedoria.

Ao meus pais e familiares que de todas as formas me apoiaram e estiveram comigo até o fim, compreendendo as minhas angústias e tristezas.

Ao meu pai Ildemir que não só agora, mas em todos os momentos esteve presente me ensinando seus valores, incentivou a viver a vida de uma forma boa, vendo o “lado bom” das coisas ruins como só ele consegue, ensinou a amar e respeitar as pessoas e animais, me apoiou de todas as formas, me ajudando e incentivando nos estudos fazendo com que chegasse até aqui sendo meu herói.

A minha mãe Angela (*in memoriam*) e Nilva (*in memoriam*) minha avó e mãe do coração que enquanto presentes me ensinaram a ser uma mulher de caráter e dignidade me ajudando de onde estão cuidando e olhando por mim.

A minha querida e amada irmã Aryane que me apoia e orienta minhas dúvidas, me oferece o colo quando preciso, que inúmeras vezes estudou e passou as madrugadas aguentando minha insônia de ansiedade, você é o meu presente de Deus.

Ao meu esposo Denis, que sempre esteve presente me apoiando e pacientemente compreendeu minha ausência.

Aos meus colegas de laboratório em especial a Camila, Janaína, Leonardo, Patrícia, Lara e à minha amiga, parceira de todas as horas Evelyn que abdicava do seu descanso para me ajudar e estar presente em todos os momentos, vocês foram essenciais como parceiros e amigos.

À Mallu, minha amiga querida que transmitiu seu conhecimento em meio a loucura de um doutorado com muito carinho.

Ao meu orientador e amigo Juliano. Sou muito grata por todo conhecimento transmitido, pela orientação, por confiar no meu trabalho, pelo apoio e amizade.

Aos professores Otávio e José Carlos Pantoja que me acompanham desde a residência, sempre me orientando em diversas questões, por quem tenho muita admiração.

Ao Fábio, meu querido amigo Cid, por me dar todo o suporte na construção da dissertação.

À CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo auxílio financeiro indispensável para o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para conclusão de mais uma etapa.

Obrigada!

“Nem todos que tentaram, conseguiram,  
mas aqueles que conseguiram, tentaram.”

Autor desconhecido

## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1</b> - Sample types, sampling stages and methods for <i>Escherichia coli</i> screening in a pig slaughterhouse. ....	36
<b>Table 2</b> - Number of samples, positive samples, <i>Escherichia coli</i> isolates and multidrug resistant isolates per collection point, obtained from a swine slaughterhouse in São Paulo state, Brazil. ....	39
<b>Table 3</b> - The most frequent MDR profiles among samples, origin of <i>Escherichia coli</i> isolates, multidrug resistance, frequency and frequency of the profiles. ....	65
<b>Table 4</b> - Calculation of odds ratio of isolates obtained from samples from different collection points to be MDR with reference to isolates from different points and their respective 95 % confidence intervals. ....	66
<b>Table 5</b> - Resistance profile of extended-spectrum beta-lactamase-producing <i>Escherichia coli</i> isolated from a swine slaughterhouse in São Paulo state, Brazil.....	67

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figure 1</b> - Frequency of positive samples for Escherichia coli by collection points in a pig slaughterhouse in São Paulo state, Brazil. ....	40
<b>Figure 2</b> - Percentage of resistance to different antibiotics of Escherichia coli isolates obtained from different collection points in a swine slaughterhouse in São Paulo state, Brazil. ....	41

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ESBLs – *Extended Spectrum Beta-Lactamases*

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

IN – Instrução Normativa

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDR – Multidroga resistente

OIE – Organização Mundial da Saúde Animal

OMS – Organização Mundial da Saúde

PABA – Ácido paraminobenzóico

RAM – Resistência antimicrobiana

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	14
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E A SAÚDE ÚNICA.....	15
2.2 USO DE ANTIMICROBIANOS E A RESISTÊNCIA BACTERIANA NA CADEIA DE PRODUÇÃO SUÍNA.....	17
2.3 <i>Escherichia coli</i> .....	19
2.4 TIPOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS.....	20
2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS.....	21
<b>2.5.1 Alteração de permeabilidade da membrana</b> .....	21
<b>2.5.2 Alteração do local de ação do antibiótico</b> .....	21
<b>2.5.3 Bomba de efluxo</b> .....	22
<b>2.5.4 Mecanismo enzimático</b> .....	22
2.6 MECANISMO DE AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA .....	22
<b>2.6.1 Aminoglicosídeos</b> .....	22
<b>2.6.2 Anfencóis</b> .....	23
<b>2.6.3 Inibidores de Folato</b> .....	24
<b>2.6.4 Macrolídeos</b> .....	25
<b>2.6.5 Quinolonas</b> .....	25
<b>2.6.6 Tetraciclina</b> .....	26
<b>2.6.7 Beta-lactâmicos</b> .....	27
2.7 PRODUÇÃO DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) .	30
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	32
3.1 OBJETIVO GERAL .....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	33
1. Introduction.....	35
2. Materials and methods .....	35
2.1. <i>Sampling</i> .....	35
2.2 <i>Escherichia coli</i> isolation .....	37
2.3. <i>Antimicrobial resistance phenotypic profile</i> .....	37

2.3.1. Antimicrobial sensitivity profile by disk-diffusion.....	37
2.3.2. Detection and confirmation of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing <i>E. coli</i> .....	38
2.4. Statistical analysis.....	38
<b>3 Results</b> .....	<b>39</b>
3.1 Isolation of <i>Escherichia coli</i> .....	39
3.2 Antimicrobial resistance profile.....	40
3.3 Multidrug resistance profiles.....	64
3.4 Comparison of bacterial resistance profile to antimicrobials at different collection points.....	66
<b>4 Discussion</b> .....	<b>68</b>
<b>5 Conclusions</b> .....	<b>71</b>
REFERENCES.....	72
APÊDICE.....	77
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>84</b>
1 CONCLUSÕES GERAIS.....	85
REFERÊNCIAS.....	86

SAMPAIO, ARYELE NUNES DA CRUZ. Uma abordagem em *One Health* para estabelecer as potenciais rotas de distribuição de resistência a antibióticos em uma cadeia de produção de carne suína. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, *Campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), 95 p.

## Resumo

O objetivo do estudo foi determinar a frequência, perfil fenotípico e multirresistência aos antimicrobianos, produção de Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) e comparar o perfil fenotípico de resistência de isolados de *Escherichia coli* da cadeia produtiva de suínos, bem como a comparação do perfil fenotípico dos isolados entre os diferentes tipos de amostras. Para tanto, foram coletadas um total de 622 amostras de carcaças e fezes suínas, cortes comerciais, ambiente e fezes de funcionários de um abatedouro de suínos certificado pelo Serviço de Inspeção Federal, localizado na microrregião de Avaré, estado de São Paulo, Brasil. 73,6 % das amostras foram positivas e 1260 isolados de *E. coli* foram obtidos das amostras. Nenhum isolado foi obtido de amostras de água. Para o teste de disco-difusão em ágar, foram utilizados 12 antimicrobianos: amoxicilina, ceftiofur, ceftazidima, cefotaxima, imipenem, aztreonam, gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacino, sulfametoxazol com trimetoprima, cloranfenicol e azitromicina. Para confirmação da produção de ESBL, os isolados de *E. coli* foram submetidos ao teste de sinergismo de disco duplo utilizando cefotaxima, ceftazidima e amoxicilina com ácido clavulânico. Observou-se alta frequência de resistência à cinco classes de antimicrobianos representadas pelos fármacos amoxicilina, gentamicina, tetraciclina sulfametoxazol com trimetoprima e cloranfenicol. Do total de isolados de *E. coli*, 80,71 % apresentaram perfil de multidroga resistência (MDR). Todos isolados produtores de ESBL tiveram perfil MDR e foram 100 % resistentes à amoxicilina, tetraciclina e cloranfenicol. Os isolados de amostras de fezes humanas se destacaram com menores chances de serem MDR em referência às demais origens amostrais. Para a análise do dendrograma, os isolados de *E. coli* apresentaram uma diversidade dos perfis de resistência nas variáveis amostrais não ocorrendo um agrupamento em clusters segundo as origens das amostras, com exceção dos isolados de fezes humanas que tenderam a se agruparem, evidenciando a menor resistência antimicrobiana (RAM) dessa variável amostral em relação as demais. A resistência antimicrobiana é uma questão importante para a saúde pública e uma abordagem ampla e multidisciplinar é essencial para reduzir os riscos em um contexto de Saúde Única.

**Palavras-chave:** Enterobactérias; ESBL; resistência múltipla aos antimicrobianos; suínos.

SAMPAIO, ARYELE NUNES DA CRUZ. An One Health approach to establish potential routes of antimicrobial resistance in a pork production chain. Msc. Degree Qualification – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, *Campus* Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), 95 p.

## **Abstract**

The aim of the study was to determine the frequency, phenotypic profile, resistance and multiresistance to antimicrobials and production of Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBLs) of *Escherichia coli* isolates from the swine production chain, as well as comparing the resistance profile of isolates among different types of samples. For this purpose, a total of 622 samples of swine carcasses from different stages of slaughter process (n=400), swine feces (n=100), commercial cuts (n=45), environment (n=67) and feces from employees (n=10) of a pig slaughterhouse certified by the Federal Inspection Service, located in São Paulo state, Brazil, were collected. From these, 73,6 % were positive and 1260 *E. coli* isolates were obtained from samples. No isolates were obtained from water samples. The agar disk diffusion test, with 12 antimicrobials was used named: amoxicillin, ceftiofur, ceftazidime, cefotaxime, imipenem, aztreonam, gentamicin, tetracycline, ciprofloxacin, sulfamethoxazole with trimethoprim, chloramphenicol and azithromycin. To confirm the production of ESBLs, *E. coli* isolates were submitted to a double-disk synergism test with cefotaxime, ceftazidime and amoxicillin with clavulanic acid. There was a high resistance frequency for five classes of antimicrobials (amoxicillin, gentamicin, tetracycline sulfamethoxazole with trimethoprim and chloramphenicol). Of all isolates, 80.71 % were multidrug-resistant (MDR). Every ESBL producing isolate was MDR and resistant to amoxicillin, tetracycline and chloramphenicol. Isolates from human feces samples had less chances of being MDR than samples from other sources. A diversity of resistance profiles was verified within the samples, not clustering according to samples sources, with the exception of human feces isolates that tended to cluster, evidencing lower antimicrobial resistance (AMR) of these samples. In this study, high rates of multidrug resistance and ESBL-producing strains were observed in *Escherichia coli*. Antimicrobial resistance is of paramount importance for Public Health and a broad and multidisciplinary approach is essential for reducing risks in the one health context.

**Keywords:** enterobacterias; ESBL; multidrug-resistant; pigs.

# **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

Agências globais para a proteção da saúde, como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), reconhecem que a resistência antimicrobiana (RAM) é um problema global que remete a estratégias interdisciplinares e integrativas de promoção à saúde, em que a saúde humana e animal (animais domésticos e de vida selvagem) são interdependentes e vinculadas à saúde dos ecossistemas (Lerner & Berg, 2015; Tiedje et al., 2019). Esta forma de abordagem é conhecida atualmente como “*One Health*” (Saúde Única).

A RAM pode ocorrer de forma natural, com o passar do tempo e geralmente está relacionada às alterações genéticas dos microrganismos (OMS, 2020).

*Escherichia coli* foi classificada como um patógeno que representa ameaça à saúde pública pela RAM generalizada (OMS, 2003). A cadeia suína de produção, tem sido relacionada como potencial reservatório de *E. coli* multirresistentes. Essa disseminação tem sido associada às cepas portadoras de material genético móvel, como plasmídeos, que possuem a capacidade de transferir esses genes de resistência para cepas de *E. coli* e outras bactérias, além da aquisição de genes de outros microrganismos por conjugação. Isso faz com que essa bactéria seja considerada um biomarcador para o monitoramento de RAM, o que a torna um microrganismo de importância no contexto da Saúde Única (Ewers et al., 2012; Zheng et al., 2012; Haenni et al., 2016; Brisola, 2018; Barillia et al., 2019).

Devido à preocupação com a seleção e emergência de microrganismos resistentes aos antibióticos e seu impacto na saúde humana e animal, a utilização desses fármacos na produção animal passou a ser questionada a partir do final da década de 60 (Aarestrup, 2005; Maron et al., 2013).

Na produção de suínos, uma situação comum no Brasil, é a inclusão de antimicrobianos como ação terapêutica e promotores de crescimento utilizando como vias de administração a injeção muscular, alimentos e água. Essa pressão seletiva sobre os microrganismos pode ter impulsionado o desenvolvimento de microrganismos resistentes aos fármacos utilizados na produção animal (Lancini, 1994; Moreno et al., 2000; Threlfall et al., 2000; Aarestrup, 2005; Shobrak et al., 2014; Founou et al., 2016; Scott et al., 2018; Kich et al., 2021). Entretanto, dados que revelam a quantidade de antimicrobianos utilizados na suinocultura intensiva brasileira são escassos.

Os procedimentos de abate desempenham um papel de grande relevância na contaminação por microrganismos uma vez que podem levar a disseminação de cepas resistentes ao longo da cadeia. Considerado um ponto crítico no abate de suínos, a evisceração aumenta as chances de contaminação na linha de abate podendo ocorrer contaminação cruzada, quando ocorre o extravasamento de conteúdo fecal de forma acidental entrando em contato com a carcaça e suas partes, órgãos e equipamentos. Utensílios como facas e chairas ou mãos de colaboradores podem disseminar a contaminação (Franco, 2002; Rostagno et al., 2003).

Em virtude da relevância da temática em questão, como um dos grandes desafios para saúde pública atualmente e nos próximos anos, e o aumento da RAM como um problema global emergente, que além de afetar a saúde humana e animal, impõe encargos sociais, econômicos e prejuízos ambientais, portanto, sendo necessária uma abordagem ampla e multidisciplinar de modo a reduzir os riscos à saúde humana, animal e ambiental (Queenan et al., 2016; Nguyen-Viet et al., 2017).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E A SAÚDE ÚNICA

A resistência antimicrobiana (RAM) é a capacidade de resistência de microrganismos a agentes antimicrobianos o que se tornou um grande risco para a saúde pública mundial e levou, em 2019, a OMS declarar a RAM como umas das 10 principais ameaças globais para a humanidade. Com constante e crescente ameaça, estudos apontam que a RAM poderá levar a até 10 milhões de mortes anualmente em 2050 se não for controlada (GLASS, 2021; OMS, 2020; O'Neill, 2016).

Os aspectos econômicos ligados à RAM vão além do aumento do tempo de hospitalizações e tratamentos mais dispendiosos. Hoje, o desenvolvimento de resistência, por certas bactérias patogênicas é mais rápido que a capacidade da indústria para produzir novos antimicrobianos. O investimento na busca de novos antimicrobianos fica mais complicado pois a descoberta de um novo antibiótico pode levar cerca de 7 a 10 anos e o desenvolvimento da resistência de 7 a 8 anos (Fernandes, 2006).

A RAM ocorre de forma natural, com o passar do tempo, e geralmente está relacionada às alterações genéticas dos microrganismos isolados de humanos, animais, plantas, alimentos e ambiente (OMS, 2020). Isso leva o conceito de “One Health”, ser utilizado com grandes perspectivas frente ao controle RAM.

São citadas como formas mais importantes de aceleração das alterações genéticas que permitem o surgimento e disseminação de cepas resistentes nos humanos e em animais: uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos, exposição constante aos antibióticos e o modo com que os novos agentes são usados, uso disseminado em animais, especialmente como promotor de crescimento (Silva, 2012). Portanto, o uso de antimicrobianos com princípios ativos semelhantes em humanos e animais podem levar a seleção dos mesmos genes de resistência além de determinar menor eficácia do fármaco, redução da vida útil do antibiótico e hospitalizações mais longas (Van Breda et al., 2017; Moreno et al., 2000; OMS, 2020).

Estudos realizados em uma variedade de cepas bacterianas resistentes, patogênicas ou comensais, relatam que esses microrganismos podem se instalar e colonizar seres humanos e haver diferentes níveis de resistência entre os isolados (clínicos ou ambientais). A justificativa para tais apontamentos podem estar no fato de

que a ingestão de produtos de origem animal contendo resíduos de fármacos antimicrobianos, também utilizados de forma rotineira na medicina humana, pode levar a diferentes perfis de resistência entre as cepas, dificultando o tratamento de enfermidades infecciosas em humanos (Founou et al., 2016; Franco et al., 2003).

A facilidade de difusão de genes de resistência também se dá pelo fato de populações bacterianas poderem disseminar-se a nível global uma vez que o deslocamento humano, tráfego de animais e alimentos é constante no mundo (Vaz, 2009). O que torna o problema mais alarmante, é a rápida disseminação global de bactérias multirresistentes e panresistentes (conhecidas como superbactérias), responsáveis por infecções resistentes ao tratamento com medicamentos antimicrobianos, como os antibióticos existentes, se tornando um grave empasse pela reduzida disponibilidade de novos antibióticos (Jacoby, 2009; OMS, 2020). A múltipla resistência, que é quando os microrganismos se tornam resistentes a determinadas antimicrobianos de classes distintas, geralmente, é mediada por plasmídeos e transposons. Desse modo, esse tipo de resistência pode ser transferido rapidamente entre diferentes gêneros e espécies bacterianas e frequentemente, resulta em resistência cruzada com outros agentes da mesma classe (Quin et al., 2005).

Os microrganismos resistentes aos antimicrobianos, podem estar presentes no ambiente e em humanos além de em toda cadeia dos produtos de origem animal, o que aponta os animais como reservatórios de genes de resistência. Dessa forma os genes de resistência, podem ser transferidos aos patógenos humanos de forma direta (conjugação) ou indireta (alimentos, água, ambiente, etc.) (Jiang & Shi, 2013; Jouini et al., 2009; Davies & Davies, 2010; Marshall & Levy, 2011). Entretanto, os humanos também assumem papel de importância na RAM uma vez que o trato intestinal é um reservatório para bactérias e genes de resistência mais do que qualquer outro ambiente estudado. Através do mecanismo de conjugação, esses genes móveis via plasmídeo são transferidos para outras bactérias presentes no mesmo ambiente e aos patógenos e comensais que podem se tornar oportunistas (Arutyunov, 2013; Costa, 2016; Zechner et al., 2012).

O uso de antimicrobianos com finalidades veterinárias e de produção pecuária, assim como na medicina humana, está diretamente ligado a liberação de substâncias no meio ambiente por meio de esgoto doméstico, efluentes hospitalares e industriais e descarte incorreto desses resíduos (Acurcio et al., 2013).

Alguns dos produtos de degradação excretados podem permanecer bioativos

mesmo quando sua molécula é em grande parte metabolizada. A maioria dos antibióticos não são completamente metabolizados no organismo animal, sendo excretados na urina e nas fezes, na forma do composto original ou parcialmente metabolizados, levando a contaminação de corpos hídricos. Os resíduos de antimicrobianos, podem acumular-se também no solo pelo uso de adubos provenientes de fezes animais que resultam na contaminação de água e alimentos posteriormente consumidos por humanos e animais (Regitano & Leal, 2010; Thiele-Bruhn, 2003). Esses fatores leva o ambiente apresentar como uma importante rota de transmissão e ser considerada como reservatório para de genes de resistência (Singer et al., 2016).

Estudos apontam que restrições impostas ao uso de antimicrobianos em países da União Europeia, levaram a uma queda na prevalência RAM (Jensen & Hayes, 2014).

Considerando a importância do tema discutido, no Brasil foram criadas estratégias de prevenção e combate à RAM através da elaboração o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (PAN-BR) pelo Ministério da Saúde em convergência aos objetivos definidos pela OMS, FAO e OIE. Ele traz um plano estratégico nacional sobre o tema que é tratado em contexto mundial através de uma abordagem de saúde única (Brasil, 2018). Essas ações, se bem desenvolvidas, visam controlar o avanço da resistência antimicrobiana por meio de uma abordagem de Saúde Única.

## 2.2 USO DE ANTIMICROBIANOS E A RESISTÊNCIA BACTERIANA NA CADEIA DE PRODUÇÃO SUÍNA

Agentes antimicrobianos têm sido utilizados para fins agropecuários, o que inclui animais de produção como suínos. Na suinocultura, antibióticos têm sido empregados como promotores de crescimento, de formas profiláticas ou terapêuticas. Entretanto, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento é questionável, principalmente quando são utilizados agentes antimicrobianos de importância na medicina humana visto que o uso desses princípios ativos em baixas e constantes concentrações na ração animal, propicia uma situação ideal para seleção de cepas resistentes à antimicrobianos e consequente disseminação no ambiente intestinal animal (Barton, 2014; Moreno et al, 2000; Shobrak et al., 2014).

Inicialmente, os suínos recebiam a alimentação com doses subterapêuticas de antibióticos com o objetivo de modular microrganismos no trato gastrointestinal e por se observar melhores parâmetros produtivos, sendo considerados promotores de crescimento. Logo, seu uso se tornou contínuo e intensificado. Essa pressão seletiva sobre os microrganismos pode ter determinado o desenvolvimento de microrganismos resistentes a fármacos utilizados na alimentação animal (Aarestrup, 2005; Founou et al., 2016; Lancini, 1994; Moreno et al., 2000; Scott et al., 2018; Shobrak et al., 2014; Threlfall et al., 2000).

Com a preocupação do potencial risco à saúde pública pela seleção de cepas resistentes, houve a proibição de uma série de agentes como promotores de crescimento em todo o mundo (Aarestrup, 2005; Maron et al., 2013). Atenta à RAM, a União Europeia proibiu o uso de antibióticos como promotores de crescimento em 2006 (Barton, 2014). Entretanto, as frequências de resistência em enterobactérias continuaram relativamente altas em alguns países, o que pode estar relacionado ao aumento da importação de alimentos de origem animal e aos altos índices de animais doentes levando ao aumento do uso terapêutico de antibióticos que exigem maiores concentrações do fármaco utilizado quando comparadas às doses subterapêuticas (Jensen & Hayes, 2014).

Desde 1998, o Brasil tem proibido agentes antimicrobianos como melhoradores de desempenho da classe dos glicopeptídeos, como a avoparcina, devido ao risco de seleção cruzada com a vancomicina pertencente a mesma classe farmacológica e importante agente na terapêutica médica. Desde então, foram criadas Instruções Normativas (IN) pelo MAPA que proíbem substâncias antimicrobianas de serem utilizadas como aditivos melhoradores de desempenho, tais como avoparcina, assenicais, antimoniais, cloranfenicol, nitrofurados, olaquinox, carbadox, violeta genciana, anfenicóis, tetraciclina, beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), quinolonas, sulfonamidas sistêmicas, espiramicina, eritromicina, colistina, tilosina, lincomicina e tiamulina. Essa proibição foi considerada um grande progresso para contenção do avanço à RAM, porém princípios ativos como a virginiamicina (estreptograminas) e a bacitracina, que segundo a OMS são agentes considerados altamente importantes para a saúde pública, ainda são autorizados como aditivos melhoradores de desempenho para aves, bovinos e suínos no Brasil (Kich, 2021; OMS, 2019).

### 2.3 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, bacilo Gram-negativo, não esporogênica, anaeróbio facultativa, catalase positiva, oxidase negativa, em sua maioria fermentam a lactose, são móveis (flagelos peritríquios), com temperatura de crescimento ótima em 37°C e tem como habitat natural o trato intestinal de humanos, animais de sangue quente e ambiente (Franco & Landgraf, 2033; Jay, 2005).

Por estar presente de forma abundante em fezes humanas e de animais é considerada a mais fiel indicadora de contaminação fecal. Cerca de 90 % das cepas não são reconhecidamente como patogênicas, sendo considerados, portanto, como patógenos oportunistas em indivíduos do grupo de risco (Feng et al., 2002; Brenner et al., 2005; Tenaillon et al., 2010).

A presença de enterobactérias em alimentos está relacionada a falhas nas práticas de higiene na produção e comercialização, podendo ocorrer a contaminação em todas as etapas de produção, especialmente na evisceração durante o abate dos animais (Borch & Arinder, 2002).

As cepas de *E. coli* relacionados à alimentos e com capacidade de causar doenças no homem, são divididas em seis patótipos de acordo com manifestações clínicas, fatores de virulência e mecanismos causadores de doença sendo: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* de adesão difusa (DAEC) e *E. coli* shigatoxigênica (STEC) (Nataro & Kaper, 1998; Jay, 2005; Hidaka, 2009).

Recentemente, *E. coli* foi classificada como um patógeno que representa ameaça saúde pública pela RAM generalizada (OMS, 2017). A cadeia de produção suína tem sido relacionada como potencial reservatório de *E. coli* multirresistentes pela existência de cepas portadoras de elementos móveis, como plasmídeos, com capacidade de transferência para outras cepas de *E. coli* ou outros microrganismos. (Ewers et al., 2012; Haenni et al., 2016; Zheng et al., 2012).

Na espécie suína, *E. coli* é um dos agentes que apresenta alta capacidade de desenvolver RAM (Baccaro et al., 2003). Pesquisas desde os anos 80 relataram a ocorrência de cepas de *E. coli* patogênicas isoladas de carnes e dejetos suínos que se mostraram resistentes a diversos antimicrobianos de uso comum na terapia

humana e animal (Boerlin et al., 2005; Costa et al., 2006; Hill et al., 1988; Macêdo et al., 2007; Meng et al., 1998; Schroeder et al., 2002)

*Escherichia coli* exerce grande importância na disseminação da RAM por estar presente em diversas espécies animais e distribuída de maneira ubiqüitária, em especial, porque algumas cepas possuem elementos móveis, como plasmídeos, com capacidade de transferência para outras cepas de *E. coli* ou outros microrganismos. Isso faz com que *E. coli* seja considerada um biomarcador de monitoramento de RAM o que a torna um microrganismo de importância no contexto da Saúde Única (Brisola, 2018; Barillia et al., 2019; Kaesbohrer et al., 2012; Fernandes, et al., 2016).

## 2.4 TIPOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência bacteriana pode ser natural (intrínseca) ou adquirida. A resistência natural indica que alguns microrganismos sempre foram resistentes a certos antibióticos. Essas bactérias não possuem processo metabólico local-alvo que seja afetado pelo antibiótico, ou seja, os mecanismos celulares necessários para a sensibilidade antibiótica estão ausentes na célula se tornando resistente naturalmente (Silva, 2012; Vaz, 2009).

Já a resistência adquirida, ocorre em bactérias que eram anteriormente sensíveis, logo assume ser um mecanismo de grande importância na RAM. A resistência adquirida ocorre através de alguns mecanismos relacionadas à determinantes genéticos de resistência aos antibióticos (Silva, 2012; Vaz, 2009).

Segundo Rang et al. (2007), Silva (2012) e Vaz (2009), existem três modalidades para a transferência de genes entre as bactérias:

*Conjugação*: envolve o contato entre células, onde o DNA plasmidial é transferido de uma bactéria para outra, sendo considerado o principal mecanismo de disseminação de resistência bacteriana. A conjugação é codificada por plasmídeos conjugativos que contêm genes de transferência. Esses plasmídeos passam de uma bactéria para outra, em geral da mesma espécie. A conjugação é significativa em populações de bactérias que são encontradas em elevadas densidades, como no intestino animal e humano.

*Transformação*: bactérias captam o DNA puro no ambiente e o incorporam ao genoma por recombinação homóloga normal. A transformação não é importante nos problemas clínicos de resistência bacteriana aos antibióticos.

*Transdução*: processo pelo qual o DNA dos plasmídeos é incluído em um fago e transferido para outra bactéria da mesma espécie.

Uma vez adquirida a resistência, por qualquer dos mecanismos citados, ela se torna prevalente devido à pressão seletiva de um antibiótico largamente usado. A presença de um antibiótico proporciona oportunidade para que a subpopulação resistente se desenvolva (Silva, 2012).

Ainda, segundo Rang et al. (2007) e Vaz (2009), a resistência entre os elementos genéticos na bactéria ocorrem através de:

*Mutação*: através de eventos espontâneos, envolvendo sequências de DNA cromossômico pela presença de antibióticos que afetam os componentes das estruturas bacterianas impedindo o acúmulo dos fármacos.

*Transposição*: alguns segmentos de DNA são transpostos, ou seja, transferidos de um plasmídeo para outro e também de plasmídeo para o cromossomo e vice-versa. Os transposons podem transportar um ou mais genes de resistência e podem, junto com um plasmídeo, alcançar uma nova espécie de bactéria.

## 2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS

### 2.5.1 Alteração de permeabilidade da membrana

A penetração do fármaco na bactéria, depende das características físico-químicas das moléculas do antibiótico. Dessa forma, os fármacos podem penetrar na membrana celular de três maneiras: *self promoted uptake*; difusão simples, por bicamada fosfolipídica; ou difusão facilitada, medida por porinas. As porinas são proteínas de membrana externa de bactérias que formam canais hidrofílicos específicos que estabelecem a passagem das substâncias para o espaço periplasmático e assim para o interior da célula. Alterações estruturais em número ou seletividade podem levar alterações na permeabilidade e por consequência a redução da concentração do fármaco intracelular (Baptista, 2013; Costa & Silva Júnior, 2017; Franco et al., 2015).

### 2.5.2 Alteração do local de ação do antibiótico

Os antibióticos, em sua maioria, têm alvos específicos de ligação com alta

afinidade. Alterações da estrutura do peptidoglicano, interferência na síntese de proteínas ou na síntese de DNA, podem levar a diminuição ou ausência da afinidade do antibiótico com o seu local de ligação (Baptista, 2013; Costa & Silva Júnior, 2017; Franco et al., 2015).

### **2.5.3 Bomba de efluxo**

As bombas de efluxo são proteínas de membrana que fazem o transporte ativo dos antibióticos para o meio extracelular, mantendo as concentrações intracelulares em baixos níveis. Elas se categorizam em cinco classes de transportadores: *major facilitator family* (MFS), *multidrug and toxic efflux* (MATE), *resistance-nodulation-division family* (RND), *small multidrug resistance* (SMR), *adenosine triphosphate binding cassette* (ABC) que atuam por transporte ativo, com exceção da ABC que atua por transporte ativo secundário através da hidrólise de ATP (Baptista, 2013; Costa & Silva Júnior, 2017; Franco et al., 2015).

### **2.5.4 Mecanismo enzimático**

A degradação ou inativação de fármacos por enzimas bacterianas é o mecanismo bioquímico de resistência mais importante e comum. Isso pode ocorrer por hidrólise, transferência de um grupo químico ou processo de oxidorredução. O mais clássico exemplo são as enzimas beta-lactamases que hidrolisam o anel beta-lactâmico de fármacos da classe dos beta-lactâmicos (Baptista, 2013; Costa & Silva Júnior, 2017; Franco et al., 2015).

## **2.6 MECANISMO DE AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA**

### **2.6.1 Aminoglicosídeos**

Os antibióticos aminoglicosídeos, devido seu amplo espectro, exercem importante papel desde a década de 1940, quando foi descoberta a estreptomicina em 1944. Essa classe inclui os antibióticos estreptomicina, neomicina, canamicina, netilmicina, paromomicina, gentamicina, tobramicina e amicacina, sendo, os três

últimos mais empregados em virtude da menor toxicidade e cobertura mais ampla contra os microrganismos alvo (Rang et al., 2007; Quentin et al., 2014). Estudos têm demonstrado que esses antibióticos, em sinergia com outros agentes antibacterianos, como os beta-lactâmicos, que inibem a síntese da parede celular, são comumente utilizados em combinação gerando melhores resultados no tratamento de infecções bacterianas graves (Quentin et al., 2014; Silva, 2012).

As bactérias apresentam basicamente três mecanismos gerais de resistência aos aminoglicosídeos. O primeiro consiste na produção codificada por plasmídeos de uma enzima transferase ou enzimas que inativam aminoglicosídeos por adenilação, acetilação ou fosforilação. Outro é a possibilidade da entrada ser dificultada por alteração ou eliminação de porinas ou outras proteínas envolvidas no transporte do fármaco. No terceiro mecanismo, o alvo do fármaco na subunidade 30S do ribossomo pode tornar-se resistente à sua ligação pela mutação ou atividade de enzima codificada por plasmídeo (Quentin et al., 2014; Silva, 2012).

### **2.6.2 Anfenicóis**

Os anfenicóis são antibióticos de amplo espectro, sendo seu principal representante o cloranfenicol. O cloranfenicol é um antibiótico bacteriostático assim como seus análogos que inibem a síntese proteica dos microrganismos sensíveis, ligando-se à subunidade 50S dos ribossomos. Dessa forma, interfere na formação do peptídeo, ao bloquearem a enzima peptidiltransferase e impedirem o alongamento da cadeia polipeptídica, característica dos antibióticos bacteriostáticos (Spinosa, et al., 1999; Rang et al., 2007).

Os microrganismos desenvolveram resistência ao cloranfenicol mediante dois mecanismos principais. A resistência de baixo nível em grandes populações sensíveis ao cloranfenicol por meio da seleção de mutantes com permeabilidade diminuída ao fármaco e o tipo de resistência, mais significativo clinicamente, desenvolveu-se em decorrência da disseminação de cloranfenicol acetiltransferases (CAT) codificadas por plasmídeos. Essa enzima impede a interação do cloranfenicol com os ribossomos bacterianos, anulando a atividade antibacteriana e inativando o fármaco (Hird & Knifton, 1986; Ryou & Coen, 2014).

Logo após o início do uso do cloranfenicol, relatos passaram a ligar esse agente antimicrobiano a casos de anemia aplásica em humanos (Silva, 2012). Relacionado

aos seus efeitos adversos, em alguns países, o uso do cloranfenicol, foi reduzido à terapia alternativa em casos de infecções graves, nas quais outros antibióticos menos tóxicos são ineficazes ou contraindicados, como para febre tifóide, sendo seu uso profilático não apropriado (Silva, 2012; Ryou & Coen, 2014). Em 1994 foi proibida a utilização em animais de produção na União Europeia. Entretanto, o florfenicol, derivado florado do cloranfenicol, foi licenciado para tratamento de infecções respiratórias em bovinos e suínos em 1995 e 2000, respectivamente por não demonstrar efeitos adversos nos animais, sendo este não utilizado na medicina humana atualmente (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001; Schwarz et al., 2004;). No Brasil o uso de cloranfenicol na produção animal foi proibido e a classe anfenicóis proibida como promotor de crescimento (Brasil, 2003; Brasil, 2009).

### **2.6.3 Inibidores de Folato**

As sulfonamidas passaram a ser muito utilizadas nas medicinas humana e veterinária o que levou ao grande número de microrganismos resistentes a esses agentes. Seu espectro de ação é amplo, abrangendo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e diversos protozoários (Paes, 2012).

Muitas sulfonamidas foram desenvolvidas embora sua importância tenha declinado em face ao aumento da resistência sendo sulfadiazina, sulfadimidina, sulfametoxazol, sulfametopirazina, sulfassalazina, sulfanilamida e o sulfa memetoxazol em combinação a trimetoprima (Rang et al., 2007). As sulfanilamidas são fármacos com ação seletiva e bacteriostáticas, inibindo o crescimento bacteriano. São análogos estruturais do ácido paraminobenzóico (PABA), que é precursor do ácido fólico nas bactérias. O folato é necessário para a síntese dos precursores de DNA das bactérias, assim como nos mamíferos, porém as bactérias precisam sintetizar o ácido fólico, já os mamíferos podem obtê-lo por fontes dietéticas (Paes, 2012; Rang et al., 2007).

As sulfonamidas competem com o PABA pela enzima diidropteroato sintase (DHPS), causando seu efeito bacteriostático. A trimetoprima inibe a mesma via de ação bacteriana, inibindo a enzima dihidrofolato redutase (DHFR), ligando competitivamente ao seu sítio de ação o que é potencializado quando usado em associação a sulfonamida (Paes, 2012; Rang et al., 2007).

A resistência das bactérias às sulfonamidas ocorre através de alterações de

genes cromossômicos, mecanismos mediados por plasmídeos e transposons e envolvem alterações no metabolismo dos folatos, alterações na constituição enzimática da célula bacteriana e alterações na permeabilidade das membranas celulares. Os principais mecanismos de resistência mediados por genes cromossômicos são: diminuição da permeabilidade da membrana bacteriana para o afluxo das sulfonamidas impedindo que penetrem no interior das bactérias para exercerem seus efeitos que pode ser obtida por transferência bacteriana de um plasmídeo de resistência; a hiperprodução de ácido paraminobenzóico (PABA), o que anula o efeito da competição com as sulfonamidas; ou mutação no sítio de ligação PABA na di-hidropteroato sintase (DHPS) levando a diminuição da afinidade da enzima por sulfonamidas (Paes, 2012; Quentin, et al., 2014).

#### **2.6.4 Macrolídeos**

Os macrolídeos são denominados dessa forma por seus anéis de lactona com muitos membros aos quais um ou mais desoxiaçúcares estão conectados. Os mais importantes macrolídeos são eritromicina, roxitromicina, azitromicina e claritromicina tanto que utilizados nas medicina humana e veterinária, tendo ainda a estreptomicina e a telitromicina de menor utilidade (Rang et al., 2007; Ryou & Coen, 2014). São antibióticos bactericidas ou bacteriostáticos, com efeito dependendo da concentração e do tipo de microrganismo, eles bloqueiam a etapa de translocação da síntese proteica ao atuar sobre o alvo rRNA 23S da subunidade 50 S, sendo a mesma unidade 50S do ribossomo bacteriano que o cloranfenicol, podendo competir se administrados conjuntamente (Rang et al., 2007; Ryou & Coen, 2014).

A resistência das bactérias a esse grupo consiste na produção de esterases que hidrolisam os macrolídeos; modificação do sítio de ligação ribossômico por mutação cromossômica, redução da permeabilidade da membrana ou, mais comumente, aumentam o efluxo ativo do fármaco; e a produção de metilase que modifica o alvo cromossômico resultando na diminuição da ligação do fármaco (Rang et al., 2007; Ryou & Coen, 2014).

#### **2.6.5 Quinolonas**

Uma das primeiras quinolonas de uso clínico foi o ácido nalidíxico. A síntese de

outros compostos por modificações na estrutura química levou a obtenção de novas quinolonas que contém um átomo de flúor, sendo o norfloxacino a primeira fluorquinolona sintetizada para o uso em humanos. As quinolonas fluoradas possuem maior atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-negativas. Logo, são agentes antibacterianos utilizados na medicina humana e veterinária para tratamento de grande número de infecções e enfermidades infecciosas. Exemplos de quinolonas utilizadas na medicina humana e veterinária, são algumas quinolonas de segunda geração (norfloxacino, ciprofloxacino, danofloxacino e enrofloxacino) e terceira geração, utilizadas em situações específicas na medicina veterinária (levofloxacino e gatifloxacino) (Paes, 2012; Rang et al., 2007).

O mecanismo de ação das quinolonas é bactericida, resultado da inibição de uma ou ambas topoisomerase tipo II, DNA-girase (topoisomerase II) e topoisomerase IV, inibindo principalmente DNA girase em microrganismos Gram-negativos e topoisomerase IV em Gram-positivos (Paes, 2012; Ryou & Coen, 2014).

A resistência bacteriana às quinolonas ocorre por meio de mutações cromossômicas nos genes que codificam topoisomerasas tipo II ou alterações na expressão de porinas e bombas de efluxo das membranas que determinam a concentração de fármaco no interior das células (Ryou & Coen, 2014). Mecanismos de resistência bacteriana às fluorquinolonas por plasmídeos foram pouco observados e são insignificantes (Paes, 2012).

### **2.6.6 Tetraciclínas**

As tetraciclínas são antibióticos de amplo espectro. Esses compostos são de grande interesse na medicina veterinária especialmente a tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina e minociclina (Paes, 2012; Rang et al., 2007).

Agem promovendo a inibição da síntese proteica ao se ligarem à fração 30S do ribossomo bacteriano impedindo a fixação do RNA aminoacil transferase impossibilitando o aporte de aminoácidos absorvidos pela célula e assim inibindo a síntese de proteínas (Paes, 2012; Silva, 2012). Penetram nas bactérias Gram-negativas por canais de porinas, também pelo mecanismo de transporte ativo, impulsionando todas tetraciclínas através da membrana citoplasmática (Paes, 2012).

Com o uso disseminado desses fármacos, a resistência tem aumentado, até mesmo em espécies bacterianas antes consideradas sensíveis (Silva, 2012). A

resistência bacteriana às tetraciclinas é muito frequente. Bactérias que se tornam resistentes a uma tetraciclina, geralmente, se tornam resistentes à todas. Isso ocorre pela resistência ser mediada por plasmídeos e transposons, ocorrendo também por mutação cromossômica (Paes, 2012). O mais disseminado mecanismo de resistência ocorre através de bombas de efluxo codificadas por plasmídeos com o aumento do efluxo ou redução do influxo do fármaco. Outras formas de resistência é a produção de proteínas que interferem na ligação do fármaco ao ribossomo bacteriano impedindo a ação na fração 30S, onde exercem seus efeitos e a inativação enzimática das tetraciclinas (Paes, 2012; Ryou; Coen, 2014).

### **2.6.7 Beta-lactâmicos**

O grupo dos beta-lactâmicos é definido pela presença do anel beta-lactâmico, essencial para atividade antimicrobiana, cujo rompimento em qualquer local, promove a inativação do fármaco. São antimicrobianos de elevada importância devido à sua excelente eficácia terapêutica e baixa toxicidade. O grupo é formado principalmente pelas penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e ácido clavulânico (Paes, 2012; Silva, 2012). Apesar de todos possuírem o anel beta-lactâmico, os diferentes agentes pertencentes a esse grupo variam em sua estrutura química contendo diferentes tipos de cadeias lineares, o que diferencia suas características, espectros de ação e resistência às beta-lactamases (Azevedo, 2014; Lupoli et al., 2014). Entretanto, todos antibióticos beta-lactâmicos interferem na síntese da parede celular bacteriana (Silva; 2012).

#### *Penicilinas*

A penicilina foi o primeiro antibiótico a ser desenvolvido e utilizado clinicamente em 1941 (Azevedo, 2014; Silva, 2012). As penicilinas têm como núcleo formador o ácido penicilânico (6-APA). As modificações realizadas nessa molécula, permitiram a classificação das penicilinas em diferentes grupos: Grupo 1, sensíveis à penicilinase ou penicilinas naturais (penicilina G e penicilina v); Grupo 2, resistentes à penicilinase ou beta-lactamases (meticilina, nafcilina, oxacilina e cloxacilina); Grupo 3, de amplo espectro (ampicilina e seus análogos como amoxicilina); Grupo 4, antipseudomonas ou de terceira geração (carbenicilina, ticarcilina e piperacilina);

Grupo 5 e outros tipos (monobactâmicos) (Paes, 2012; Silva, 2012).

As penicilinas são suscetíveis à ação das beta-lactamases e são rapidamente eliminadas pelo organismo (Azevedo, 2014) exercem ação bactericida inibindo a síntese da parede celular das bactérias em processo de divisão, provocando a lise osmótica e morte por interferência direta na síntese do peptidoglicano (Paes, 2012).

As bactérias adquirem resistência às penicilinas através de quatro mecanismos: inativação enzimática das penicilinas pelas beta-lactamases; redução da permeabilidade da parede celular às penicilinas que não conseguem alcançar seus locais de ligação, representados por proteínas específicas (PLP); alterações conformacionais nas proteínas de ligação de penicilinas, bloqueando a atividade antibiótica; e aparecimento do fenômeno de tolerância (Silva, 2012).

### *Carbapenêmicos*

Os carbapenêmicos e monobactâmicos foram desenvolvidos para o uso contra microrganismos Gram-negativos produtores de beta-lactamase resistentes à penicilina (Rang et al., 2007). A classe dos carbapenêmicos é tida como a última linha contra bactérias resistentes, possuem maior espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e negativas e estabilidade às beta-lactamases, incluindo as de espectro estendido (Azevedo, 2014; Ribeiro, 2013). São utilizados na prática clínica: imipenem, meropenem, doripenem e ertapenem (Lupoli et al., 2014).

O imipenem era originalmente resistente a todas as beta-lactamases, porém alguns microrganismos possuem agora genes cromossômicos que codificam beta-lactamases que hidrolisam o imipenem (Rang et al., 2007). Exerce seu efeito antibacteriano ligando-se a proteínas específicas que acoplam às penicilinas, produzindo eferoplastos, forma de degradação das bactérias; combina-se com proteínas específicas do tipo I levando rapidamente ao efeito letal; e penetração através da membrana externa dos Gram-negativos. O imipenem é resistente a quase todos os tipos de beta-lactamases (com exceção às produzidas por *Pseudomonas multophila* e *Bacteroides fragiles*), sendo a resistência ao imipenem por beta-lactamases muito rara (Silva, 2012).

### *Monobactâmicos*

Quimicamente, os monobactâmicos caracterizam-se por serem monocíclicos, diferentemente das cefalosporinas e carbapenêmicos, que são bicíclicos. Possuem como núcleo o ácido 3-aminomonobactâmico (3-AMA) (Silva, 2012). O aztreonam, único antibiótico monobactâmico comercializado, possui grande e específica atividade contra bactérias Gram-negativas e elevada estabilidade para a maioria das beta-lactamases (Lupoli, 2014; Rang et al., 2007; Silva, 2012).

O aztreonam interfere na biossíntese da parede celular bacteriana, também é capaz de atravessar facilmente a membrana das bactérias Gram-negativas e tem afinidade pelo tipo 3 das proteínas específicas que se ligam às penicilinas fazendo com que as bactérias se tornem filamentosas, percam sua capacidade reprodutora e ocorrendo sua lise. Embora seja resistente à maioria das beta-lactamases mediadas por plasmídeos e cromossomos, pode ocorrer resistência a certos bacilos Gram-negativos (como *Enterobacter* e *Serratia*) pela presença de beta-lactamases induzíveis do tipo I mediadas por cromossomos que se ligam ao antibiótico e o inativam (Silva, 2012).

### *Cefalosporinas*

As cefalosporinas representam, sem dúvida, uma importante classe de antibióticos na medicina atual. O isolamento do ácido 7-aminocefalosporânico foi um passo essencial para produção semissintética desses produtos já que as cefalosporinas naturais apresentam baixo poder antimicrobiano. Apesar de serem ativas de modo geral contra bactérias Gram-positivas e negativas, os espectros antimicrobianos das cefalosporinas variam de acordo com cada uma delas (Silva, 2012).

As cefalosporinas de primeira geração (cefazolina e cefalexina), mostram-se mais ativas contra espécies Gram-positivas e bacilos Gram-negativos. As cefalosporinas de segunda geração (cefuroxima, cefotetana e ceftiofur) exibem, em geral, resistência a maior quantidade beta-lactamases que as de primeira geração. As cefalosporinas de terceira geração (ceftiofur, ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima) possuem ampla e potente ação antibacteriana, são resistentes a muitas beta-lactamases mostram-se altamente ativas contra enterobactérias incluindo *E. coli*,

porém são menos ativas contra microrganismos Gram-positivos do que os fármacos de primeira geração. As bactérias Gram-negativas que adquirem atividade beta-lactamase de espectro estendido mostram-se resistentes a cefalosporinas de terceira geração. A cefepima, única cefalosporina de quarta geração atualmente disponível, apresenta-se altamente ativa contra bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Ainda, as cefalosporinas de quinta geração (ceftarolina e ceftobiprol), diferenciam das outras cefalosporinas por serem fármacos potentes contra microrganismos como *Staphylococcus aureus* resistentes a múltiplos fármacos (Lupoli et al., 2014).

O mecanismo de ação das cefalosporinas é semelhante ao das penicilinas, que, por meio da ligação irreversível às proteínas de ligação à penicilina provocam a inibição da enzima transpeptidase entre cadeias peptídicas do peptidoglicano da parede celular bacteriana em formação inibindo a formação da parede celular na bactéria, levando à sua lise (Lupoli et al., 2014). O mecanismo de resistência bacteriana às cefalosporinas são mediados por mutação cromossômica ou por plasmídeos e transposons e se manifestam por produção de beta-lactamases ou cefalosporinases ou por impermeabilidade da membrana celular à penetração das cefalosporinas (Paes, 2012).

#### *Inibidores de beta-lactamases*

Os inibidores das beta-lactamases, como o ácido clavulânico, também são considerados beta-lactâmicos pois possuem a mesma estrutura base (Azevedo, 2014). O ácido clavulânico é um derivado beta-lactâmico de baixa atividade bacteriana, mas com alta capacidade inibitória de muitas beta-lactamases. Muito empregado em associação à amoxicilina, se liga irreversivelmente às beta-lactamases protegendo os antibióticos contra ação dessas enzimas (Silva, 2012).

## 2.7 PRODUÇÃO DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL)

As beta-lactamases são enzimas cromossômicas ou plasmáticas capazes de hidrolizar o anel beta-lactâmico na sua ligação CO-N e transformam em ácido penicilóico promovendo a inativação do fármaco (Paes, 2012; Azevedo, 2014).

Esse foi um dos primeiros e mais efetivos mecanismos de resistência bacteriana. Foram descritas pela primeira vez em 1940 por Abraham & Chain em

cepas de *E. coli* capazes de destruir a penicilina (Zeba, 2004). Em 1983 foi detectado um novo grupo de enzimas nomeadas beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs – *Extended Spectrum Beta-Lactamases*) em cepas de *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* (Dalmarco et al., 2006). Como as beta-lactamases são codificadas por plasmídeos, elas podem disseminar por populações bacterianas e humanas com grande velocidade (Lupoli et al., 2014). Existem mais de 180 ESBLs identificadas. É observada, principalmente em *Staphylococcus* spp. e bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* e outros membros da família *Enterobacteriaceae* (Baptista, 2013; Paes, 2012).

As enzimas foram denominadas de ESBL devido ao fato de serem codificadas por genes plasmidiais que, geralmente, carregam genes de resistência a outros antimicrobianos. Dessa forma, as cepas produtoras de ESBL são em sua maioria multidroga resistente (MDR) (Giuriatti, 2017). Essas enzimas são capazes de conferir resistência às penicilinas, cefalosporinas e ao aztreonam, porém são neutralizadas pelos inibidores de beta-lactamases (Cantón et al., 2012; Dalmarco et al., 2006). Além disso, em patógenos multirresistentes, a produção de ESBL está frequentemente associada à resistência a outros antimicrobianos, como aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclinas e sulfas (Cornaglia et al., 2008) e representam um importante problema de saúde pública, pois bactérias produtoras de ESBL são a maior causa de falha terapêutica com cefalosporinas (Bradford, 2001; Bush, 2001). Atualmente, bactérias produtoras de ESBLs têm sido frequentemente isoladas de animais de produção, o que pode caracterizar um risco para a saúde humana, já que estas podem colonizar ou provocar doenças em humanos, além de servir como reservatórios de genes de ESBLs que transitam entre humanos e animais (Smet et al., 2009).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a frequência de resistência, perfil fenotípico e multirresistência aos antimicrobianos e produção de ESBL em isolados de *Escherichia coli* obtidos a partir de amostras de carcaças e fezes suínas, água tratada e de processamento, ambiente, fezes de funcionários e alimentos de um abatedouro suíno contemplando uma abordagem em Saúde Única (*One Health*).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**(1)** Determinar a frequência de *Escherichia coli* em amostras de carcaça suína de diferentes pontos do abate, fezes suínas, ambiente, fezes de funcionários, água tratada e de processamento e alimentos (cortes comerciais) de um abatedouro de suínos;

**(2)** Verificar o perfil fenotípico de resistência, multirresistência aos antimicrobianos e produção de ESBL em isolados de *Escherichia coli* provenientes das amostras coletadas;

**(3)** Comparar perfil fenotípico de resistência dos isolados de *Escherichia coli* entre os diferentes tipos de amostras e classes de antimicrobianos.

# CAPÍTULO 2

***Escherichia coli* occurrence and antimicrobial resistance in a swine slaughtering process**

Artigo a ser enviado para a revista Food Control – ISSN: 0956-7135

## ***Escherichia coli* occurrence and antimicrobial resistance in a swine slaughtering process**

Aryele Nunes da Cruz Encide Sampaio<sup>1\*</sup>, Evelyn Fernanda Flores Caron<sup>1</sup>, Lára Cristina Bastos Juliano<sup>1</sup>, Leonardo Ereno Tadielo<sup>1</sup>, Camila Koutsodontis Cerqueira-Cezar<sup>1</sup>, Janaína Prieto de Oliveira<sup>1</sup>, Luciano dos Santos Bersot<sup>3</sup>, Ricardo Seiti Yamatogi<sup>4</sup>, Wladimir Padilha da Silva<sup>5</sup>, Marcus Vinicius Coutinho Cossi<sup>6</sup>, Luís Augusto Nero<sup>4</sup>, José Carlos de Figueiredo Pantoja<sup>1</sup>, Fábio Sossai Possebon<sup>1,2</sup>, Juliano Gonçalves Pereira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> São Paulo State University (UNESP). School of Veterinary Medicine and Animal Science. Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine. Prof. Dr. Walter Mauricio Correa Street, Unnumbered. Botucatu City, São Paulo State. Brazil.

<sup>2</sup> São Paulo State University (UNESP). Institute for Biotechnology. Tecomarias av, Unnumbered. Botucatu City, São Paulo State. Brazil.

<sup>3</sup>Paraná Federal University (UFPR). Department of Veterinary Sciences, Setor Palotina. Pioneiro Street, 2153. Palotina City, Paraná State. Brazil.

<sup>4</sup> Viçosa Federal University (UFV). Department of Veterinary Medicine. PH Rolls av, Unnumbered. Viçosa City, Minas Gerais State. Brazil.

<sup>5</sup> Pelotas Federal University (UFPEL). Department of Agroindustrial Science and Technology. University Campus – Pelotas Federal University, Unnumbered. Pelotas City. Rio Grande do Sul State. Brazil.

<sup>6</sup> Uberlândia Federal University (UFU).

\* corresponding author. E-mail address: aryele.sampaio@unesp.br

### **ABSTRACT**

The aim of the study was to determine the frequency, resistance and multiresistance to antimicrobials and the production of Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBLs) of *Escherichia coli* isolates from the swine production chain, as well as the comparison of the resistance profile of the isolates among different types of samples. For this purpose, a total of 622 samples of swine carcasses from different points of slaughter process (n=400), swine feces (n=100), commercial cuts (n=45), environment (n=67) and feces from employees (n=10) of a pig slaughterhouse certified by the Federal Inspection Service, located in São Paulo state, Brazil, were collected. 73,6 % of samples were positive and 1260 *E. coli* isolates were obtained from samples. No isolates were obtained from water samples. The agar disk diffusion test, with 12 antimicrobials: amoxicillin, ceftiofur, ceftazidime, cefotaxime, imipenem, aztreonam, gentamicin, tetracycline, ciprofloxacin, sulfamethoxazole with trimethoprim, chloramphenicol and azithromycin was used. To confirm the production of ESBLs, the *E. coli* isolates were submitted to a double-disk synergism test using cefotaxime, ceftazidime and amoxicillin with clavulanic acid. There was a high resistance frequency for five classes of antimicrobials (amoxicillin, gentamicin, tetracycline sulfamethoxazole with trimethoprim and chloramphenicol). Of the total isolates, 80.71 % were multidrug-resistant (MDR). All ESBL producing isolates were MDR and resistant to amoxicillin, tetracycline and chloramphenicol. Isolates from human feces samples had less chances of being MDR than samples from other sources. A diversity of resistance profiles was verified in the samples, not clustering according to the sources, except for human feces isolates that clustered, evidencing lower antimicrobial resistance (MDR) variability of this samples. In this study, high rates of multidrug resistance and ESBL-producing strains were observed in *Escherichia coli*. AMR is present in an expressive way on pork production chain, and a broad multidisciplinary approach is essential for reducing risks in the one health context.

Keywords: Enterobacteria; ESBL; MDR; pigs.

## 1. Introduction

To meet the growing demand for animal protein, swine industry seeks higher productivity. Initially, subtherapeutic doses of antibiotics, called growth promoters, were used to modulate microorganisms in the gastrointestinal tract and improve production parameters but soon their use became continuous and intensified, surpassing prophylactic and therapeutic purposes. This selective pressure on microorganisms may have boosted the development of drug-resistant bacteria in pork products and other animal origin food (Aarestrup, 2005; Founou et al., 2016; Lancini, 1994; Moreno et al., 2000; Scott et al., 2018; Shobrak & Abo-Amer, 2014).

Swine production chain has also been mentioned as a potential reservoir of antimicrobial resistance (AMR) *Escherichia coli*, due to strains that harbor mobile genetic material, such as plasmids, which can transfer these resistance genes to other *E. coli* strains or other species, in addition to acquisition of genes from other microorganisms by conjugation. All factors mentioned makes these bacteria a biomarker for AMR, being an important microorganism in the context of One Health (Barilli et al., 2019; BRISOLA, 2018; Ewers et al., 2012; Haenni et al., 2016; Zheng et al., 2012).

AMR is one of the biggest challenges for public health in present and future, and must be recognized as an emerging global problem, which can affect human and animal health and impose social, economic and environmental damages. So, a broad multidisciplinary approach is needed to reduce the risks to One Health (Nguyen-Viet et al., 2017; Queenan et al., 2016). Thus, this work aimed to characterize, compare the resistance profile, and confirm the production of extended spectrum beta-lactamase enzymes (ESBL) from *Escherichia coli* isolates from samples of humans, animals, pork products and the environment of a swine slaughterhouse, contemplating a One Health approach.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sampling

Samples were collected from one swine slaughterhouse located in São Paulo state, Brazil, with capacity of 1.500 animals per day and certified by Federal Inspection Service. A total of 622 samples were collected from 10 batches raised in different

farms. From each batch, animals (carcasses and feces), environment (equipment surface and water), handlers with direct contact with the animals and final products (commercial meat cuts) were sampled, as shown in Table 1.

**Table 1** - Sample types, sampling stages and methods for *Escherichia coli* screening in a pig slaughterhouse.

Sample types	Sampling point	Method	Analytical unit	Total
Animal	Carcass – After bleeding	Swab	400 cm <sup>2</sup>	100
	Carcass – After scalding	Swab	400 cm <sup>2</sup>	100
	Carcass – After evisceration	Swab	400 cm <sup>2</sup>	100
	Carcass – After final wash	Swab	400 cm <sup>2</sup>	100
	Feces	Swab	Unity	100
Environment	Water (Residual and potable)	Flask	100 mL	20
	Equipment and utensils surface	Swab	400 cm <sup>2</sup>	47
Human	Employee feces	Swab	Unity	10
Food (final products)	Rump, rib, loin cup, shoulder and shank	Swab	400 cm <sup>2</sup>	45
<b>Total</b>				<b>622</b>

The samples of carcasses, equipment surfaces and final products were obtained by swab technique with Nasco® Whirl-Pak® sponges previously hydrated with NaCl saline 0.85 % (m/v). During sampling, sterile molds of 100 cm<sup>2</sup> (10 cm x 10 cm) were used to delimit the area to be sampled. From each surface (internal and external carcass, equipment and final products), four distinct and representative points were evaluated, totaling 400 cm<sup>2</sup>. After collection, the sponges were placed in sterile containers and kept under refrigeration.

Animal feces were obtained by rectal swab technique. These samples were stored in Cary Blair transport medium, kept refrigerated and sent to the laboratory for processing. The water samples were collected with the aid of a sterile flask containing sodium thiosulphate solution, kept under refrigeration and sent to the laboratory for processing.

The collection of human feces was carried out with the consent of the collaborators. Sterile containers, a swab in Cary Blair transport and a manual with collection guidelines and recommendations were made available. The feces were placed in a sterile vial and the samples were transferred to a sterile tube containing the transport medium with a swab. These samples were identified and stored in isothermal boxes to be sent to the laboratory.

## 2.2 *Escherichia coli* isolation

Sponges of swab samples from carcasses, environment (equipment and utensils) and final products were processed by adding 180 mL of Buffered Peptone Water (APT, Oxoid®) and homogenized in Stomacher at 185 rpm for 3 minutes and further incubated at 37°C for 18-24 h. Aliquots of the broth were streaked on MacConkey Agar (MC, Oxoid®) and incubated at 37°C for 18-24 h. From the water samples, 25 mL were aliquoted and 225 mL of APT were added, homogenized in Stomacher at 185 rpm for 3 minutes and incubated at 37°C for 18-24 h. Aliquots of the broth were streaked on MacConkey Agar and incubated at 37°C for 18-24h. Swab with samples of feces from animals and humans were plated directly on MacConkey Agar and incubated for 18-24 hours at 37°C. The plates were examined and five colonies with typical morphology for *E. coli* (pink colonies with bile precipitates) plus two lactose non-fermenters of each morphological type were selected per sample. All suspicious colonies selected were then streaked on Tryptone Soy Agar (TSA, Oxoid®) and incubated at 36°C for 18-24 h. Confirmation was obtained by IMViC test. Based on the biochemical characteristics of *E. coli*, the isolates were maintained in Nutrient Agar (Nutrient Agar, Oxoid®) and Brain and Heart Infusion broth (BHI, Oxoid®) with glycerol. Nutrient agar was kept under refrigeration (4°C) and BHI broth frozen (-18°C) for further analysis.

## 2.3. Antimicrobial resistance phenotypic profile

### 2.3.1. Antimicrobial sensitivity profile by disk-diffusion

*E. coli* isolates were tested for resistance to 10 antimicrobial classes using the agar disk-diffusion method (CLSI, 2020). The choice of antimicrobials and concentrations were based on the Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2020) and Clinical and Laboratory Standards Institute Veterinary - CLSIVET (CLSIVET, 2018) to determine the sensitivity profile of enterobacteria: Penicillins: Amoxicillin – AMO - 10 µg; Cephalosporins: Ceftiofur – CTF - 30 µg, Ceftazidime – CAZ - 10 µg, Cefotaxime – CTX - 5 µg; Carbapenems: Imipenem – IPM – 10 µg; Monobactams: Aztreonam – ATM - 30 µg; Aminoglycosides: Gentamicin – GEN - 10 µg; Tetracyclines: Tetracycline – TET - 30 µg; Quinolones: Ciprofloxacin – CIP - 5 µg; Folate Inhibitors: Sulfamethoxazole with Trimethoprim – SUT - 23.75/1.25 µg;

Phenicol: Chloramphenicol – CLO - 30 µg and Macrolides: Azithromycin – AZI - 15 µg. For this purpose, isolates were cultivated in BHI broth and incubated at 37°C for 18-24 h. The cultures were then diluted in sterile saline solution (NaCl 0.85 %) until a turbidity compatible with 0.5 degree of Mac Farland scale was achieved (approximately  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL). The suspension was later seeded on a plate containing Mueller-Hinton Agar with sterile swabs, and the antibiotic discs were added and incubated at 37°C for 18-24 h. The halo of inhibition was measured and the result was previously classified as resistant, intermediate or sensitive, based on the CSLI (2020) and CLSIVET (2018) recommendations. Control was done with a pan-susceptible strain of *Escherichia coli* ATCC® 25922. For all analysis (except for the dendrogram) isolates with an intermediate resistance profile were considered resistant. Strains with resistance to three or more classes simultaneously were considered multidrug-resistant (MDR) (Magiorakos et al., 2011).

### *2.3.2. Detection and confirmation of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing E. coli*

Following the EUCAST (2017) screening methodology for ESBL enterobacteria, isolates that presented inhibition halos smaller than 22 mm for CAZ - 10 µg and 21 mm for CTX - 5 µg were submitted to the Double Disc Synergism Test. They were first cultivated in BHI broth and incubated at 37°C for 18-24 h. The cultures were then diluted in sterile saline solution (NaCl 0.85 %) until a turbidity compatible with level 0.5 of the Mac Farland scale was achieved (approximately  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL). The suspension was seeded on a plate containing Mueller-Hinton Agar with sterile swab and the antibiotic discs were added: third generation cephalosporins (CTX and CAZ 30 µg) placed 20 mm from center to center of a disc containing an inhibitor of beta-lactamase (amoxicillin with clavulanic acid 20/10 µg) and incubated at 37°C for 24 h. The control was done with a pan-susceptible strain of *Escherichia coli* ATCC® 25922. Isolates that had a widening of the inhibition halo of at least one cephalosporin towards amoxicillin with clavulanic acid were established as positive for ESBL production.

### *2.4. Statistical analysis*

The prevalence at each collection stage, as well as the resistance to different

antibiotics evaluated, occurrence of MDR and ESBL were calculated with Microsoft Excel. The odds ratio of isolates being MDR in relation to the collection point was evaluated with the aid of the Statistical Analysis Software - (*SAS University Edition*). The most resistant isolate from each positive sample was selected to set a dendrogram in order to observe the distance of different resistance profiles and indicate differences among sampling groups, through application of Antibiotic Resistance Profiling from Bionumerics Software – version 8.1 with the Neighbor Joining method for clustering.

### 3 Results

#### 3.1 Isolation of *Escherichia coli*

Of the 622 samples, 458 were positive for *E. coli*. Out of the 1.260 isolates, 1.178 were from animals (n=258 after bleeding carcasses, n=163 after scalding carcasses, n=175 after evisceration carcasses, n=165 after washing carcasses and n=346 feces), 71 from final products; 44 from equipment and 41 from human feces. No isolates were obtained from water (Table 2).

**Table 2** - Number of samples, positive samples, *Escherichia coli* isolates and multidrug resistant isolates per collection point, obtained from a swine slaughterhouse in São Paulo state, Brazil.

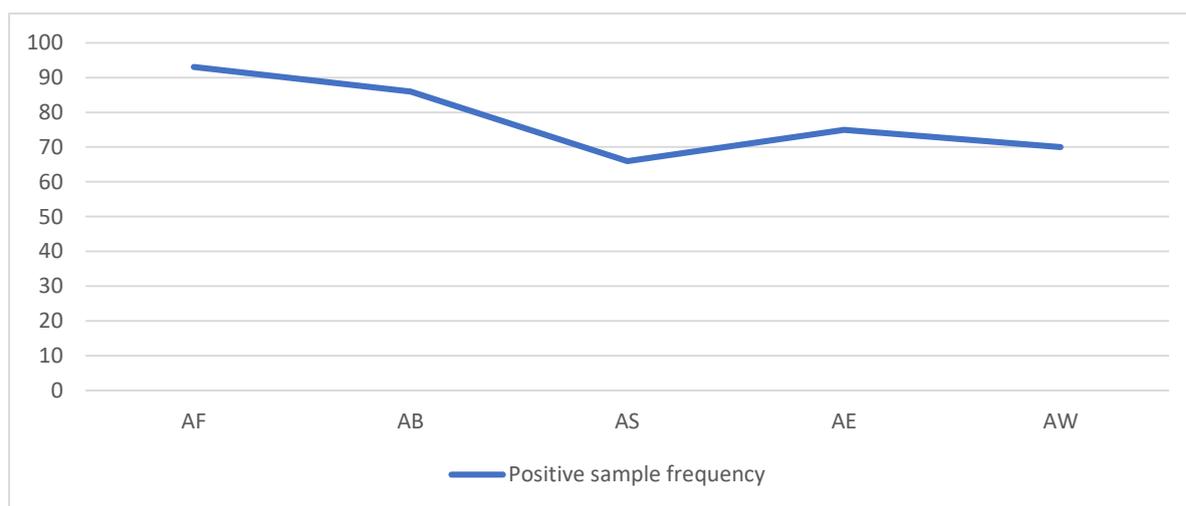
Origin	Sampling point	n of samples	positive samples - n(%)	Isolates - n(%)	MDR - n(%)
Animals	AF	100	93 (93)	346 (27,46)	319 (92,19)
	AB	100	86 (86)	258 (20,47)	242 (93,79)
	AS	100	66 (66)	163 (12,93)	150 (92,02)
	AE	100	75 (75)	175 (13,88)	128 (73,14)
	AW	100	70 (70)	164 (13,01)	118 (71,95)
Pork product	FP	45	32 (71)	70	39 (54,92)
Environment	PW and RW	20	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	EQ	47	27 (57,4)	43 (3,41)	16 (37,20)
Human	HF	10	9 (90)	41 (3,25)	5 (12,19)
<b>Total</b>		622	458 (73,6)	1260 (100)	1017 (80,71)

AB – after bleeding, AS – after scalding, AE – after evisceration, AW – after final washing, AF – animal feces, FP – final products, PW – potable water, RW – residual water, EQ – equipment, HF – human feces.

The frequency of positive samples and isolates decreased through the slaughter

process, with its peak in the animal feces and decreasing after bleeding and scalding, with a slight increase after evisceration point and a further decrease in the final washing of pig carcasses point (Graph 1).

**Figure 1** - Frequency of positive samples for *Escherichia coli* by collection points in a pig slaughterhouse in São Paulo state, Brazil.



AF – animal feces, AB – after bleeding, AS – after scalding, AE – after evisceration, AW – after final washing

### 3.2 Antimicrobial resistance profile

Figure 2 shows the observed resistance to different antibiotics in different collection points. High resistance to tetracycline (84.1 %), chloramphenicol (78.3 %), amoxicillin (73 %), sulfamethoxazole with trimethoprim (48.8 %) and ciprofloxacin (48.3 %) was observed. However, isolates were less resistant for aztreonam (1.3%), imipenem (3.3 %), cefotaxime (2.3 %), ceftazidime (3.1 %) and ceftiofur (4.9 %).

Isolates from human faces were resistant to tetracycline (26.8 %), amoxicillin (24.4 %), chloramphenicol (7.3 %), sulfamethoxazole with trimethoprim (7.3 %), ciprofloxacin (9.8 %), but had lower resistance rates to gentamicin (2.4 %), ceftiofur (2.4 %), imipenem (2.4 %), ceftazidime (2.4 %) and sensitivity to others antimicrobials tested. The isolates from environmental samples had a similar profile to animal samples, with a higher frequency of resistance to amoxicillin (74.4 %), tetracycline (44.2 %) and chloramphenicol (30.2 %). The isolates obtained from animal carcasses, feces and final products had high resistance to tetracycline (61,4 to 95.7 %), chloramphenicol (57.1 to 92.2 %), amoxicillin (69.4 to 81.4 %), ciprofloxacin (44 to 58.4 %) and sulfamethoxazole with trimethoprim (5.7 to 69.1 %).

Sample	Tetracycline	Chloramphenicol	Amoxicillin	Sulfamethoxazole with Trimethoprim	Ciprofloxacin	Gentamicin	Ceftiofur	Imipenem	Ceftazidime	Azithromycin	Cefotaxime	Aztreonam
HF (n=41)	26,8%	7,3%	24,4%	7,3%	9,8%	2,4%	2,4%	2,4%	2,4%	0,0%	0,0%	0,0%
EN (n=43)	44,2%	30,2%	74,4%	14,0%	11,6%	7,0%	2,3%	2,3%	2,3%	4,7%	2,3%	0,0%
AF (n=346)	95,1%	90,2%	69,4%	69,1%	58,4%	17,6%	3,2%	2,0%	1,4%	2,9%	0,0%	0,9%
AB (n=258)	95,7%	92,2%	81,4%	50,8%	48,4%	8,1%	7,4%	2,7%	4,7%	2,7%	5,4%	3,1%
ES (n=163)	92,0%	87,1%	79,8%	61,3%	53,4%	12,3%	9,2%	5,5%	7,4%	3,1%	3,1%	3,1%
AV (n=175)	80,0%	70,3%	70,3%	46,9%	44,0%	10,3%	4,6%	5,7%	3,4%	1,1%	4,0%	0,0%
AW (n=164)	73,8%	70,7%	73,2%	30,5%	47,0%	5,5%	3,0%	1,8%	1,2%	4,9%	1,2%	0,0%
FP (n=70)	61,4%	57,1%	78,6%	5,7%	44,3%	5,7%	2,9%	5,7%	0,0%	1,4%	0,0%	1,4%
Total	84,1%	78,3%	73,0%	48,8%	48,3%	10,9%	4,9%	3,3%	3,1%	2,8%	2,3%	1,3%

EN: environment; AF: animal feces; HF: human feces; AS: after scalding carcass; FP: final product; AW: after final wash carcass; AB: after bleeding carcass; AE: after evisceration carcass.

**Figure 2** - Percentage of resistance to different antibiotics of *Escherichia coli* isolates obtained from different collection points in a swine slaughterhouse in São Paulo state, Brazil.

### 3.3 Multidrug resistance profiles

Out of the 1.260 isolates, 88.66 % (1.117) had multidrug resistance and only 8.01 % (101) were susceptible to all drugs. Being resistance to four classes of antibiotics was the most frequent scenario (32.06 %), followed by five (21.26 %) and six classes (6.42 %). Fewer than 1% were resistant to 10 classes (0.15%), nine classes (0.23 %), eight classes (0.39 %) and seven classes (0.63 %). MDR isolates were obtained from all collection points, except water. There was a high frequency of multidrug resistance in isolates obtained from pigs after bleeding (93.79 %), followed by isolates from swine feces (92.19 %), carcass after scalding (92.02 %), carcass after evisceration (73.14 %), carcass after the final wash (71.95 %) and final products (54.92 %). 37.20 % of the isolates from equipment surfaces (environment) were MDR. Contrary to what was observed in animal, environment and food samples, *E. coli* isolates from human feces had a lower frequency of MDR. In these samples, 12.19 % of the isolates were resistant to three or more classes of antimicrobials (Table 2). One hundred and twelve MDR profiles were obtained, of which 15 most prevalent are shown in Table 3. There was a high frequency of five classes of antimicrobials represented (amoxicillin, gentamicin, tetracycline, ciprofloxacin, sulfamethoxazole with trimethoprim and chloramphenicol), with emphasis on amoxicillin and tetracycline as the most frequent drugs. The AMO-TET-CIP-CLO profile was the most frequent, corresponding to 14.21 % (179/1260), present in samples from all origins and collected points (EN, AF, HF, AS, FP, AW, AB, AE).

**Table 3** - The most frequent MDR profiles among samples, origin of *Escherichia coli* isolates, multidrug resistance, frequency and frequency of the profiles.

Profile	Origins of isolates	Frequency (%)
<b>AMO-TET-CIP-CLO</b>	EN, AF, HF, AS, FP, AW, AB, AE	179 (14,21)
<b>AMO-TET-CIP-SUT-CLO</b>	EN, AF, AS, AW, AB, AE	158 (12,54)
<b>AMO-TET-CLO</b>	EN, AF, HF, AS, FP, AW, AB, AE	129 (10,24)
<b>AMO-TET-SUT-CLO</b>	EN, AF, AS, AW, AB, AE	114 (9,05)
<b>TET-CIP-SUT-CLO</b>	EN, AF, AS, FP, AW, AB, AE	70 (5,56)
<b>TET-SUT-CLO</b>	AF, AS, AW, AB, AE	58 (4,60)
<b>AMO-GEN-TET-CIP-SUT-CLO</b>	EN, AF, AS, AW, AB, AE	47 (3,73)
<b>AMO-GEN-TET-SUT-CLO</b>	EN, AF, AS, AW, AB, AE	45 (3,57)
<b>AMO-TET-CIP</b>	AF, AS, AB, AE	18 (1,43)
<b>TET-CIP-CLO</b>	AF, AW, AB, FP	14 (1,11)
<b>GEN-TET-SUT-CLO</b>	AF, AS, AW, AB, AE	10 (0,79)

EN – environmental; AF – animal feces; AS – after scalding carcass; AW – after final wash carcass; AB – after bleeding carcass; AE – after evisceration carcass; FP – final products; HF - human feces; AMO – amoxicillin; CIP – ciprofloxacin; CLO – chloramphenicol; GEN - gentamicin; MDR – resistant multidrug; SUT – sulfamethoxazole with trimethoprim; TET – tetracycline.

Table 4 shows the odds ratios for being MDR among the sampling point. Isolates from human feces had lower chances of being MDR when compared to other collection points, with no statistical difference, except when compared to isolates obtained from environmental samples which had 6.67 times more chances of being MDR (CI 0.78 – 50.00) and after evisceration with 3.0 times (CI 0.36 - 24.98). The chances of isolates from animal fecal samples being MDR were 10 times higher when compared to environmental isolates (CI 3.70 - 25.00), as well as greater were the chances of being MDR when compared to isolates from different collection points such as after scalding (6.84), final product (5.40), after final wash (5.69) and after evisceration (4.43). Isolates from samples at after-bleeding point are more likely to be MDR compared to isolates from after scalding point (3.13), final product (2.50) and after final wash point (2.63). The other sample variables (samples x references) had no statistical differences.

**Table 4** - Calculation of odds ratio of isolates obtained from samples from different collection points to be MDR with reference to isolates from different points and their respective 95 % confidence intervals.

Sample	Reference	Odds ratio	Confidence interval 95 %		Statistical difference
EN	AS	1,43	0,70	2,94	No
EN	FP	1,82	0,76	4,35	No
EN	AW	1,72	0,84	3,57	No
AS	FP	1,27	0,59	2,70	No
AS	AW	1,20	0,66	2,17	No
AS	AE	1,54	0,83	2,86	No
FP	AE	1,22	0,55	2,70	No
AW	AE	1,28	0,69	2,38	No
HF	AF	1,48	0,16	13,44	No
AB	AF	2,16	0,83	5,62	No
AS	HF	4,64	0,56	38,29	No
FP	HF	3,66	0,42	31,98	No
AW	HF	3,86	0,47	31,95	No
AB	HF	1,47	0,17	12,53	No
AW	FP	1,05	0,49	2,29	No
AE	AB	2,05	0,99	4,23	No
<b>HF</b>	<b>AE</b>	<b>3,00</b>	<b>0,36</b>	<b>24,98</b>	<b>Yes</b>
<b>AF</b>	<b>EN</b>	<b>10,00</b>	<b>3,70</b>	<b>25,00</b>	<b>Yes</b>
<b>HF</b>	<b>EN</b>	<b>6,67</b>	<b>0,78</b>	<b>50,00</b>	<b>Yes</b>
<b>AB</b>	<b>EN</b>	<b>4,55</b>	<b>2,04</b>	<b>10,00</b>	<b>Yes</b>
<b>AE</b>	<b>EN</b>	<b>2,22</b>	<b>1,06</b>	<b>4,55</b>	<b>Yes</b>
<b>AB</b>	<b>AS</b>	<b>3,13</b>	<b>1,56</b>	<b>6,25</b>	<b>Yes</b>
<b>AB</b>	<b>FP</b>	<b>2,50</b>	<b>1,05</b>	<b>5,88</b>	<b>Yes</b>
<b>AB</b>	<b>AW</b>	<b>2,63</b>	<b>1,30</b>	<b>5,26</b>	<b>Yes</b>
<b>AF</b>	<b>AS</b>	<b>6,84</b>	<b>2,86</b>	<b>16,41</b>	<b>Yes</b>
<b>AF</b>	<b>FP</b>	<b>5,40</b>	<b>1,98</b>	<b>14,74</b>	<b>Yes</b>
<b>AF</b>	<b>AW</b>	<b>5,69</b>	<b>2,36</b>	<b>13,74</b>	<b>Yes</b>
<b>AF</b>	<b>AE</b>	<b>4,43</b>	<b>1,81</b>	<b>10,82</b>	<b>Yes</b>

AS: after scalding carcass; EN: environment; AF: animal feces; HF: human feces; FP: final product; AW: after final wash carcass; AB: after bleeding carcass; AE: after evisceration carcass.

### 3.4 Comparison of bacterial resistance profile to antimicrobials at different collection points

The dendrogram presented in the supplementary material compares the resistance profiles of the isolates. It was observed that the different sampled groups were distributed along the clusters, not evidencing a grouping in the resistance profiles regarding the origin of the sample, and showing the diversity of the resistance profiles. However, isolates from human feces appeared grouped together. Moreover, they had less resistance compared to isolates from other sample sources.

### 3.5 Bacterial resistance profile of ESBL producing strings

Out of the 1260 isolates, 20 (1.58 %) were positive for ESBL production, of which 11 (55 %) were from carcasses after bleeding, four (20 %) from carcasses after scalding, three (15 %) from carcasses after evisceration and two (10 %) from carcasses after final washing.

All 20 ESBL isolates had MDR profile and were resistant to amoxicillin, tetracycline and chloramphenicol. Only one isolate (5 %) was not resistant to ceftiofur and sulfamethoxazole with trimethoprim. There was a high frequency of resistant isolates to ceftazidime (65 %), cefotaxime (90 %) and ciprofloxacin (60 %). It was observed that only 3 % of the isolates were resistant to imipenem, aztreonam and azithromycin, and only one isolate (5 %) was sensitive to gentamicin (Table 5).

**Table 5** - Resistance profile of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from a swine slaughterhouse in São Paulo state, Brazil.

Isolate	Multiresistance profile
1	AMO-CTZ-TET-CIP-CLO
2	AMO-CTF-CTZ-IPM-GEN-TET-CIP-SUT-CLO-AZI
3	AMO-CTF-CTZ-CTX-TET-CIP-SUT-CLO
4	AMO-CTF-CTX-TET-CIP-SUT-CLO
5	AMO-CTF-CTX-TET-CIP-SUT-CLO
6	AMO-CTF-CTZ-CTX-TET-CIP-SUT-CLO
7	AMO-CTF-CTZ-CTX-TET-CIP-SUT-CLO-AZI
8	AMO-CTF-CTX-TET-SUT-CLO
9	AMO-CTF-CTZ-CTX-TET-SUT-CLO
10	AMO-CTF-CTZ-CTX-IPM-ATM-TET-CIP-SUT-CLO
11	AMO-CTF-CTZ-CTX-TET-CIP-SUT-CLO
12	AMO-CTF-CTZ-CTX-ATM-TET-CIP-SUT-CLO
13	AMO-CTF-CTZ-CTX-TET-SUT-CLO
14	AMO-CTF-CTX-TET-SUT-CLO
15	AMO-CTF-CTZ-CTX-TET-SUT-CLO
16	AMO-CTF-CTX-TET-SUT-CLO
17	AMO-CTF-CTX-TET-SUT-CLO-AZI
18	AMO-CTF-CTZ-CTX-TET-CIP-SUT-CLO
19	AMO-CTF-CTZ-CTX-IPM-ATM-TET-CIP-SUT-CLO
20	AMO-CTF-CTX-TET-SUT-CLO

AMO: amoxicillin; ATM: aztreonam; AZI: azithromycin; CIP: ciprofloxacin; CTF: ceftiofur; CTX: cefotaxime; CTZ: Ceftazidime; GEN: gentamicin; IPM: imipenem; TET: tetracycline.

## 4 Discussion

*E. coli* isolates were obtained from samples from all collected points except from water. The highest percentages obtained, 93 and 90 % of *E. coli* isolates from swine and human feces, respectively, are due to the fact that *E. coli* is a commensal bacterium of intestinal microbiota of warm-blooded animals (Brenner et al., 2005; Feng et al., 2002; Jay, 2005; Tenaillon et al., 2010). The first collection point was after bleeding, and the isolation of *E. coli* can be associated to the previous stages of slaughter (transport and rest), since there is the possibility of contamination when pigs are lying on the ground and the fact that the carcasses are all on the same conveyor belt without prior decontamination of each batch, which can lead to cross contamination.

Scalding consists in the immersion of the carcasses in high temperature water (62 to 63°C), to achieve technical benefits when processing the carcasses (Brasil, 1995; Brasil, 2018). Although this step is considered important for the reduction of enterobacteria (Bunci & Sofos, 2012), there was a high prevalence at later sampling points.

It was observed that after evisceration, the frequency of *E. coli* isolates was higher when compared to after scalding. This can be related to cross-contamination of carcasses by contaminated equipment, recovery of non-cultivable cells or technological processing failure in evisceration. Such facts can justify the positivity of samples collected from the surface of equipment and utensils, where more than half (57.4 %) were positive for the presence of *E. coli*, which demonstrates an important source of cross contamination for food (Brasil, 2004; Bunci & Sofos, 2012; Terra & Fries, 2000). Arguello et al. (2012) and Seixas (2009) also reported increased contamination after evisceration.

No significant decrease in contamination was observed even after the final wash. These results corroborate the study carried out in a swine slaughterhouse in Ireland, where there was an increase in contamination at this stage of the slaughter (Mannion et al., 2012) which may have directly reflected in the contamination of the final products (71 %) by *E. coli* strains.

Regarding the sensitivity profile of the isolates to antimicrobials, there was a high general resistance to drugs used in human and veterinary medicine (tetracycline, amoxicillin, chloramphenicol and sulfamethoxazole with trimethoprim), a worrying

result when it is already known that the use of antimicrobials with similar active principles in humans and animals can lead to selection of the same resistance genes together with lower drug efficacy, reduced antibiotic life and longer hospitalizations (Moreno et al., 2000; OMS, 2020; van Breda et al., 2018). Other studies with *E. coli* isolates from meat, swine and human feces obtained similar sensitivity profiles to those in the present study (Abed et al., 2021; Franco et al., 2015). Isolates from human feces were also resistant to antimicrobials commonly used in human and veterinary medicine. However, less frequently, as they had sensitivity to other seven antimicrobials tested, indicating that, so far, they are not phenotypically resistant to as many classes of antimicrobials as *E. coli* isolates from swine.

Isolates from environmental samples had similar sensitivity profiles to those from animal isolates, which may indicate that contamination persists during the production stages until the final product. According to Terra & Fries (2000), when the carcass goes through the slaughter room, it can contaminate the entire line due to its direct contact with equipment, employees and utensils. Therefore, adequate sanitation is essential, as the greater the number of animals slaughtered per day, the greater the risk of cross-contamination.

The highest percentage of resistance was to tetracycline (84.1 %), in agreement with the findings in the studies by Costa et al. (2016) and Franco et al. (Brasilica et al., 2010) in swine *E. coli* isolates. In a study by Jakobsen et al. (2010) in Denmark, where tetracycline is used mainly in pig farming, the tetracycline resistance profile was more pronounced among food isolates than in clinical samples (Vieira et al., 2009). Resistance to amoxicillin had the second highest frequency, accounting for 73 % of total isolates. A similar result was described by Abed et al. (2021) in a study performed with *E. coli* isolates from humans, food and water from Saudi Arabia where 70.8 % of the isolates were resistant to amoxicillin. Resistance to sulfamethoxazole with trimethoprim also occurred in most of the isolates (48,8 %). The constant use of these antimicrobials in swine production, in which the resistance gene is located in plasmids, which can further encode resistance to tetracyclines, sulfonamides and penicillins (Dunlop et al., 1999) may justify the fact that these profiles are often found in *E. coli* isolates as well as in this study (Abed et al., 2021; Brasilica et al., 2010; Costa, 2016; Dunlop et al., 1999).

Although chloramphenicol was forbidden in Brazil for veterinary use (Brasil, 2003), the presence of 78,3 % of isolates resistant to this antibiotic is a concern since

all isolates came from commercial farms. This might be explained by the maintenance through co-selection of resistance genes to this antibiotic with other resistance genes (Rosengren et al., 2009), and the fact that the use of florfenicol, a flowering derivative of chloramphenicol, is being increasingly reported, which may be contributing to the cross-resistance of the two drugs that frequently occur between antimicrobial agents belonging to the same class and acting by the same mechanism of action (Arcangioli et al., 2000; Bolton et al., 1999).

A high rate of MDR isolates was observed, which is similar to the results of Silva et al. (2008) and Costa et al. (2016). These results can be associated by the large-scale use of antimicrobials in prevention and as growth promoters in industrial pig farming (Wang et al., 2010).

The appearance of *E. coli* MDR strains, of different origins, has been reported in several countries (Sáenz et al., 2004). In this study, the most frequent profile (AMO-TET-CIP-CLO) occurred in all sampling points (Table 3). In Iceland, although antimicrobials are strictly prohibited as growth promoters, there are reports of MDR *E. coli* strains isolated from animals (Thorsteinsdottir et al., 2010). However, in this study, isolates from human feces had a low frequency of multidrug resistance when compared to other sample sources, corroborating Thorsteinsdottir, et al. (2010).

Although the *E. coli* isolates had different resistance rates in different sampling points, there were different resistance profiles among samples that were not clustered according to the sample origin, evidencing a diversity of resistance profiles. The fact that *E. coli* isolates from human feces (HF) were grouped into close clusters supports the results obtained, in which HF isolates were less resistant than isolates from other sources and with lower variability.

All 20 ESBL-producing isolates were resistant to more than five classes of antimicrobials, being MDR. There was a high frequency of resistance to drugs from the class of penicillins, cephalosporins, tetracyclines, quinolones, folate inhibitors and phenolics. This result may rely on the fact that these enzymes are encoded by multiresistance plasmids. Thus, ESBL-producing strains are mostly MDR (Giuriatti, 2017). No positive isolate for ESBL production came from a human fecal sample, a result similar to Doregiraee et al., (2018) in a study conducted in Tehran, Iran.

## 5 Conclusions

The study showed high general resistance of *E. coli* isolates to drugs used in human and veterinary medicine, as well as multi-resistance in 80.71 % of isolates and ESBL-producing strains (1.58 %). Isolates from human feces had a lower frequency of antimicrobial resistance. The isolates had a diversity of resistance profiles in the sampling points, not clustering according to the origins of the samples, except for human feces isolates, evidencing the lower resistance and diversity of these strains. The results demonstrate the importance of the swine production chain as a reservoir of MDR strains.

### Declaration of competing interest

There are no conflicts of interest.

### CRedit authorship contribution statement

**Aryele Nunes da Cruz Encide Sampaio** Term, Methodology, Investigation, Validation, Data curation, Formal analysis, Writing – original draft. **Evelyn Fernanda Flores Caron**: Methodology, Validation. **Lára Cristina Bastos Juliano**: Formal analysis. **Leoardo Ereo Tadielo**: Methodology. **Camila Koutsodontis Cerqueira-Cezar**: Methodology. **Janaína Prieto de Oliveira**: Methodology. **Luciano dos Santos Bersot**: Writing – review. **Ricardo Seiti Yamatogy**: Writing – review. **Wladimir Padilha da Silva**: Writing – review. **Marcus Vinicius Coutinho Cossi**: Writing – review. **Luís Augusto Nero**: Writing – review. **José Carlos de Figueiredo Pantoja**: Formal analysis. **Fábio Sossai Possebon**: Formal analysis, Writing – review & editing, Supervision. **Juliano Gonçalves Pereira**: Term, Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing, Supervision.

### Acknowledgements

We thank Coordination for the Financial Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the master's scholarship granted and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support to the project.

## Ethics in publishing

The study was approved by the Human Research Ethics Committee with a Certificate of Presentation for Ethical Appreciation - 04536218.6.3006.5411 and approval 3.489.847 from UNESP – Botucatu, by Ethics Committee in the Use of Animals – protocol CEUA 0010/2021 of FMVZ, UNESP – Botucatu.

## REFERENCES

- Aabed, K., Moubayed, N., & Alzahrani, S. (2021). Antimicrobial resistance patterns among different *Escherichia coli* isolates in the Kingdom of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(7), 3776–3782. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.03.047>
- Aarestrup, F. M. (2005). Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 96(4), 271–281. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto960401.x>
- Arcangioli, M. A., Leroy-Setrin, S., Martel, J. L., & Chaslus-Dancla, E. (2000). Evolution of chloramphenicol resistance, with emergence of cross-resistance to florfenicol, in bovine *Salmonella Typhimurium* strains implicates definitive phage type (DT) 104. *Journal of Medical Microbiology*, 49(1), 103–110. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-1-103>
- Arguello, H., Carvajal, A., Collazos, J. A., García-Feliz, C., & Rubio, P. (2012). Prevalence and serovars of *Salmonella enterica* on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. *Food Research International*, 45(2), 905–912.
- Barilli, E., Vismarra, A., Villa, Z., Bonilauri, P., & Bacci, C. (2019). ESβL *E. coli* isolated in pig's chain: Genetic analysis associated to the phenotype and biofilm synthesis evaluation. *International Journal of Food Microbiology*, 289(September 2018), 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.012>
- Bolton, L. F., Kelley, L. C., Lee, M. D., Fedorka-Cray, P. J., & Maurer, J. J. (1999). *Detection of Multidrug-Resistant*. 37(5), 1348–1351.
- Brasil. (2004). *Resolução nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação*. [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0216\\_15\\_09\\_2004.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0216_15_09_2004.html)
- Brasil. (2018). Plano de ação nacional de prevenção e controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única 2018-2022. *Diário Da República*, 1.<sup>a</sup> Série — N.º 96 de 18 de Maio de 2018, 23. <https://data.dre.pt/eli/port/141/2018/05/18/p/dre/pt/htm>
- BRASIL. (1995). MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 711, de 1º de novembro de 1995. *MAPA - Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*.
- Brasilica, A. V., Franco, R. M., Pirola, S., & Mantilla, S. (2010). Resistência

- antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de carne e dejetos suínos. *Acta Veterinaria Brasilica*, 4(1), 31–36. <https://doi.org/10.21708/avb.2010.4.1.1511>
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Staley, J. R. (2005). *Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed.).
- Brisola, m. c. (2018). *Antimicrobianos utilizando a escherichia coli como biomarcadora*. Universidade do Estado de Santa Catarina.
- Bunci, S., Sofos, J. (2012). Interventions to control Salmonella contamination during poultry, cattle and pig slaughter. *Food Research International*, 45, 641–655.
- CLSI. (2020). In *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (p. 332). <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
- Costa, A. L. P. (2016). *Resistência Bacteriana aos Antibióticos: uma perspectiva do fenômeno biológico, suas consequências e estratégias de contenção*. UNIFAP.
- Doregirae, F., Alebouyeh, M., Nayeri Fasaee, B., Charkhkar, S., Tajeddin, E., & Zali, M. R. (2018). 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. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1415703>
- Dunlop, R. H., McEwen, S. A., Meek, A. H., Friendship, R. M., Black, W. D., & Clarke, R. C. (1999). Sampling considerations for herd-level measurement of faecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in finisher pigs. *Epidemiology and Infection*, 122(3), 485–496. <https://doi.org/10.1017/S0950268899002411>
- EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility. (2013\_ Testing Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Sweden.
- Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S., & Wieler, L. H. (2012). 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*, 18(7), 646–655. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03850.x>
- Feng, P., Weagant, S. D., Grant, M. A., & Burkhardt, W. (2002). *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. Bacteriological Analytical Manual (8th Ed.). FDA/Center for Food Safety & Applied Nutrition. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>
- Founou, L. L., Founou, R. C., & Essack, S. Y. (2016). Antibiotic resistance in the food chain: A developing country-perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>
- Franco, J. M. P. L., Mendes, R. de C., Cabral, F. R. F., & Menezes, C. D. A. (2015). O papel do farmacêutico frente à resistência bacteriana ocasionada pelo uso irracional de antimicrobianos. *Semana Acadêmica*, 1(72), 1–17. [https://semanaacademica.org.br/system/files/artigos/o\\_papel\\_do\\_farmacutico\\_f](https://semanaacademica.org.br/system/files/artigos/o_papel_do_farmacutico_f)

rente\_a\_resistencia\_bacteriana\_0.pdf

- Giuriatti, J. (2017). *Detecção De Beta-Lactamases De Espectro Estendido (Esbls) Em Isolados De Salmonella Provenientes De Carnes De Frango*.
- Haenni, M., Poirel, L., Kieffer, N., Châtre, P., Saras, E., Métayer, V., Dumoulin, R., Nordmann, P., & Madec, J. Y. (2016). Co-occurrence of extended spectrum  $\beta$  lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(3), 281–282. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00007-4)
- Jakobsen, L., Spangholm, D. J., Pedersen, K., Jensen, L. B., Emborg, H. D., Agersø, Y., Aarestrup, F. M., Hammerum, A. M., & Frimodt-Møller, N. (2010). Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. *International Journal of Food Microbiology*, *142*(1–2), 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.025>
- Jay, J. M. (2005). *Microbiologia de alimentos* (6th ed.). Artmed.
- Lancini, J. C. (1994). Fatores exógenos na função gastrintestinal. *Fisiologia Da Digestão e Absorção Das Aves*, 99–126.
- Lupoli, A., Hooper, D. C., Arnaout, R. A., Kahne, A., & Walker, S. (2014). Farmacologia das infecções bacterianas e micobacterianas: Síntese da parede celular. In *Princípios da farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia* (pp. 608–625). Guanabara Koogan.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2011). 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), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mannion, C., Fanning, J., McLernon, J., Lendrum, L., Gutierrez, M., Duggan, S., & Egan, J. (2012). The role of transport, lairage and slaughter processes in the dissemination of *Salmonella* spp. in pigs in Ireland. *Food Research International*, *45*, 871–879.
- Moreno, M. A., Domínguez, L., Teshager, T., Herrero, I. A., & Porrero, M. C. (2000). Antibiotic resistance monitoring: the Spanish programme. The VAV Network. Red de Vigilancia de Resistencias Antibióticas en Bacterias de Origen Veterinario. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *14*(4), 285–290. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794948>
- Nguyen-Viet, H., Chotinun, S., Schelling, E., Widyastuti, W., Khong, N. V., Kakkar, M., Beeche, A., Jing, F., Khamlome, B., Tum, S., & Adisasmito, W. (2017). Reduction of antimicrobial use and resistance needs sectoral-collaborations with a One Health approach: perspectives from Asia. *International Journal of Public Health*, *62*(s1), 3–5. <https://doi.org/10.1007/s00038-016-0933-6>
- OMS. (2020). *Resistência antimicrobiana*. Organização Mundial da Saúde. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Queenan, K., Häsler, B., & Rushton, J. (2016). A One Health approach to antimicrobial resistance surveillance: is there a business case for it? *International Journal of*

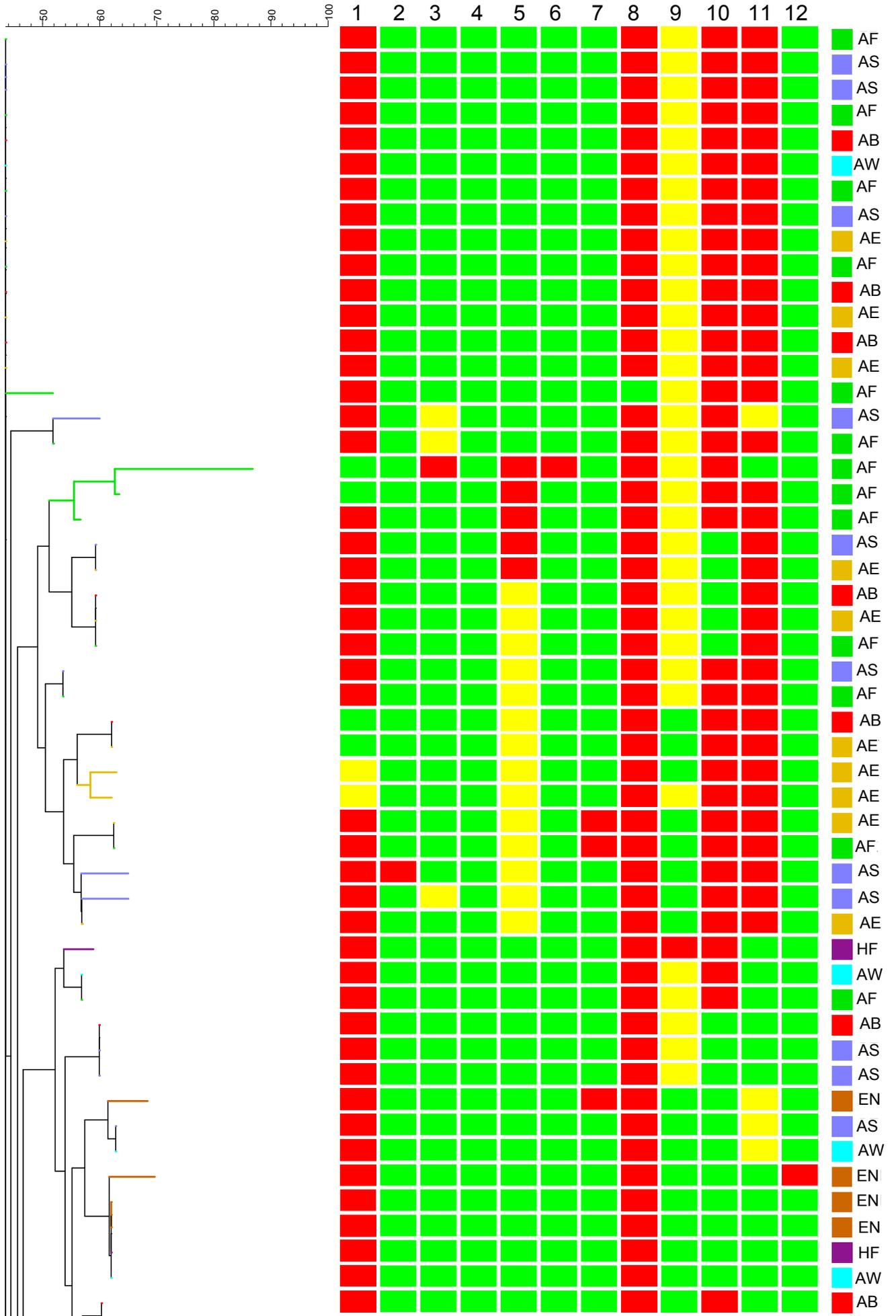
- Antimicrobial Agents*, 48(4), 422–427.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.014>
- Rosengren, L. B., Waldner, C. L., & Reid-Smith, R. J. (2009). Associations between antimicrobial resistance phenotypes, antimicrobial resistance genes, and virulence genes of fecal *Escherichia coli* isolates from healthy grow-finish pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1373–1380. <https://doi.org/10.1128/AEM.01253-08>
- Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., & Torres, C. (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3996–4001. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3996-4001.2004>
- Scott, A. M., Beller, E., Glasziou, P., Clark, J., Ranakusuma, R. W., Byambasuren, O., Bakhit, M., Page, S. W., Trott, D., & Mar, C. Del. (2018). Is antimicrobial administration to food animals a direct threat to human health? A rapid systematic review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(3), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.04.005>
- Seixas, F. N., Tochetto, R., & Ferraz, S. M. (2009). Presença de Salmonella sp. em carcaças suínas amostradas em diferentes pontos da linha de processamento. *Ciência Animal Brasileira*, 10(2), 634–640. <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewArticle/3996>
- Shobrak, M. Y., & Abo-Amer, A. E. (2014). Role of wild birds as carriers of multi-drug resistant *Escherichia coli* and *Escherichia vulneris*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1199–1209. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400010>
- Silva, F. F. P., Santos, M. A. A., & Schmidt, V. (2008). Resistência a antimicrobianos de *Escherichia coli* isolada de dejetos suínos em esterqueiras. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(3), 762–765. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000300035>
- Silva, P. (2012). *Farmacologia*. Guanabara Koogan.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207–217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>
- Terra, N. N., & Fries, L. L. M. (2000). A qualidade da carne suína e sua industrialização. *I Conferência Virtual Internacional Sobre Qualidade de Carne Suína*, 1–5. [http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/anais00cv\\_terra\\_pt.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais00cv_terra_pt.pdf)
- Thorsteinsdottir, T. R., Haraldsson, G., Fridriksdottir, V., Kristinsson, K. G., & Gunnarsson, E. (2010). Prevalence and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from animals, foods and humans in Iceland. *Zoonoses and Public Health*, 57(3), 189–196. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01256.x>
- van Breda, L. K., Dhungyel, O. P., & Ward, M. P. (2018). Antibiotic resistant *Escherichia coli* in southeastern Australian pig herds and implications for surveillance. *Zoonoses and Public Health*, 65(1), e1–e7. <https://doi.org/10.1111/zph.12402>

- Vieira, A. R., Houe, H., Wegener, H. C., Wong, D. M. A. L. F., & Emborg, H. D. (2009). Association between tetracycline consumption and tetracycline resistance in *Escherichia coli* from healthy Danish slaughter pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(1), 99–109. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0152>
- Wang, X. M., Jiang, H. X., Liao, X. P., Liu, J. H., Zhang, W. J., Zhang, H., Jiang, Z. G., Lü, D. H., Xiang, R., & Liu, Y. H. (2010). Antimicrobial resistance, virulence genes, and phylogenetic background in *Escherichia coli* isolates from diseased pigs. *FEMS Microbiology Letters*, 306(1), 15–21. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01917.x>
- Zheng, H., Zeng, Z., Chen, S., Liu, Y., Yao, Q., Deng, Y., Chen, X., Lv, L., Zhuo, C., Chen, Z., & Liu, J. H. (2012). Prevalence and characterisation of CTX-M  $\beta$ -lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(4), 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.12.001>

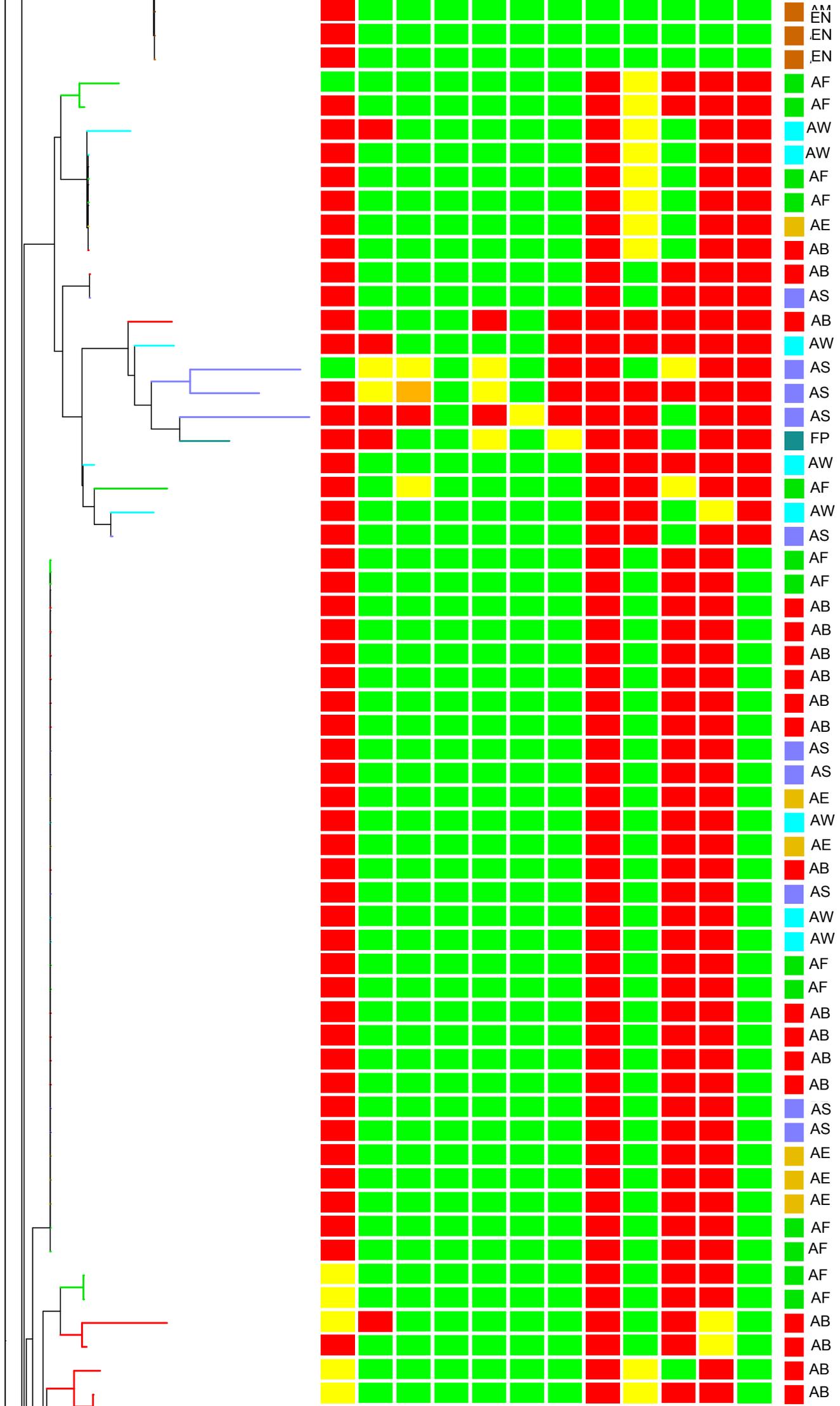
**APPENDIX 1 – DENDROGRAM OBTAINED FROM THE COMPARISON OF THE PROFILE OF BACTERIAL RESISTANCE TO ANTIMICROBANS OF *Escherichia coli* ISOLATES DETAILED**

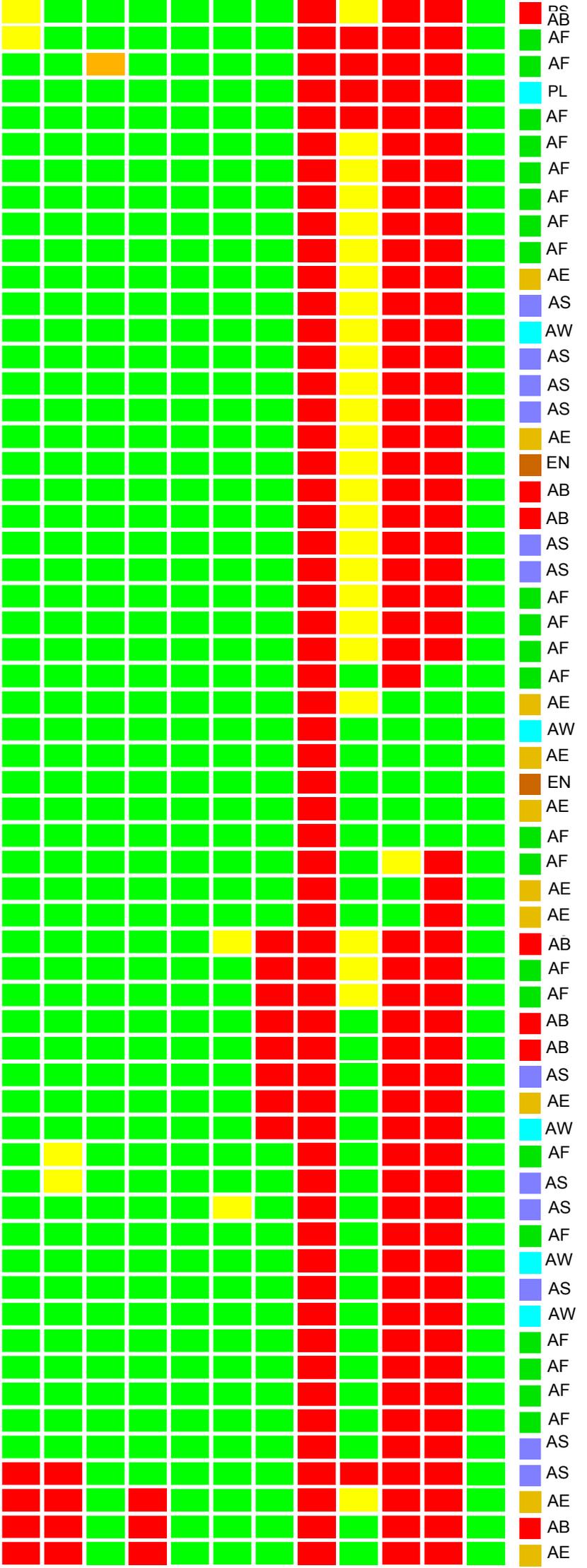
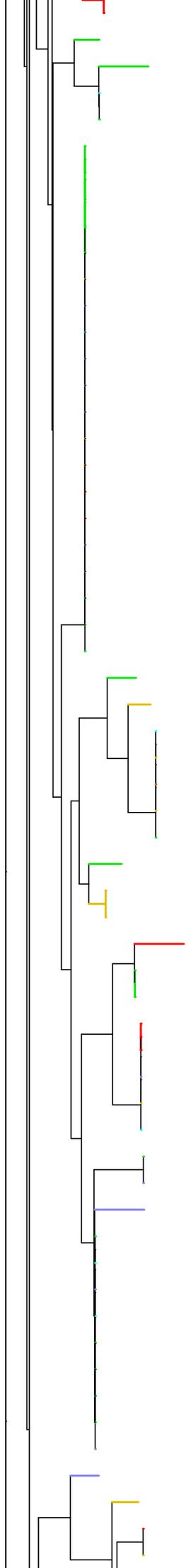
- 1 - Amoxicillin
- 2 - Ceftiofur
- 3 - Ceftazidime
- 4 - Cefotaxime
- 5 - Imipenem
- 6 - aztreonam
- 7 - Gentamicin
- 8 - Tetracycline
- 9 - Ciprofloxacin
- 10 - Sulfamethoxazole with trimethoprim
- 11 - Chloramphenicol
- 12 - Azithromycin

- AF
- AS
- AB
- AW
- AE
- HF
- EN
- FP

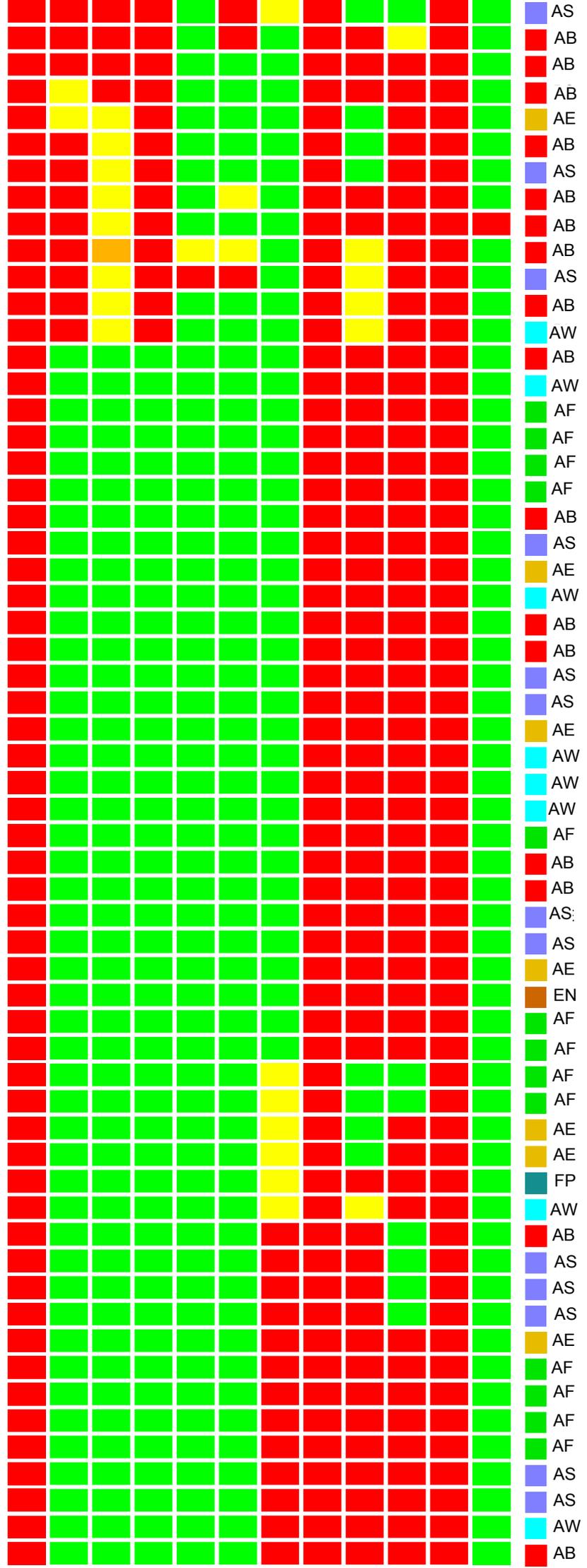
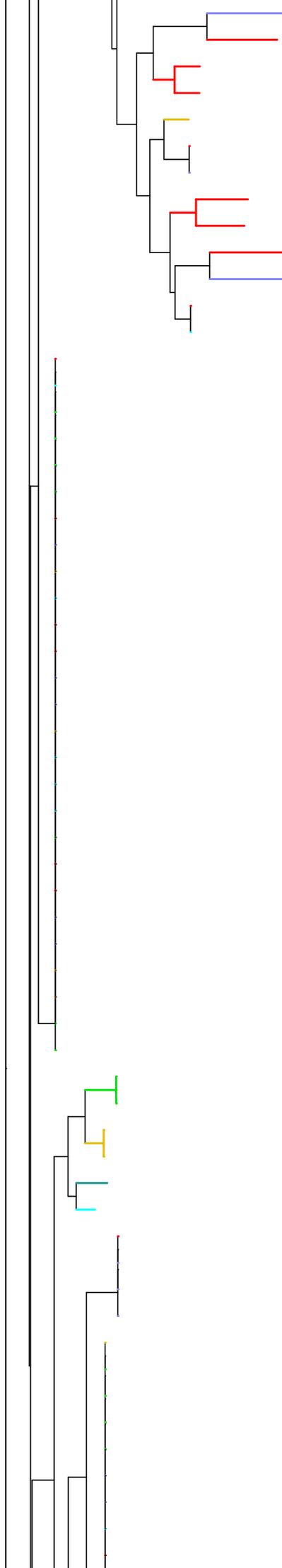








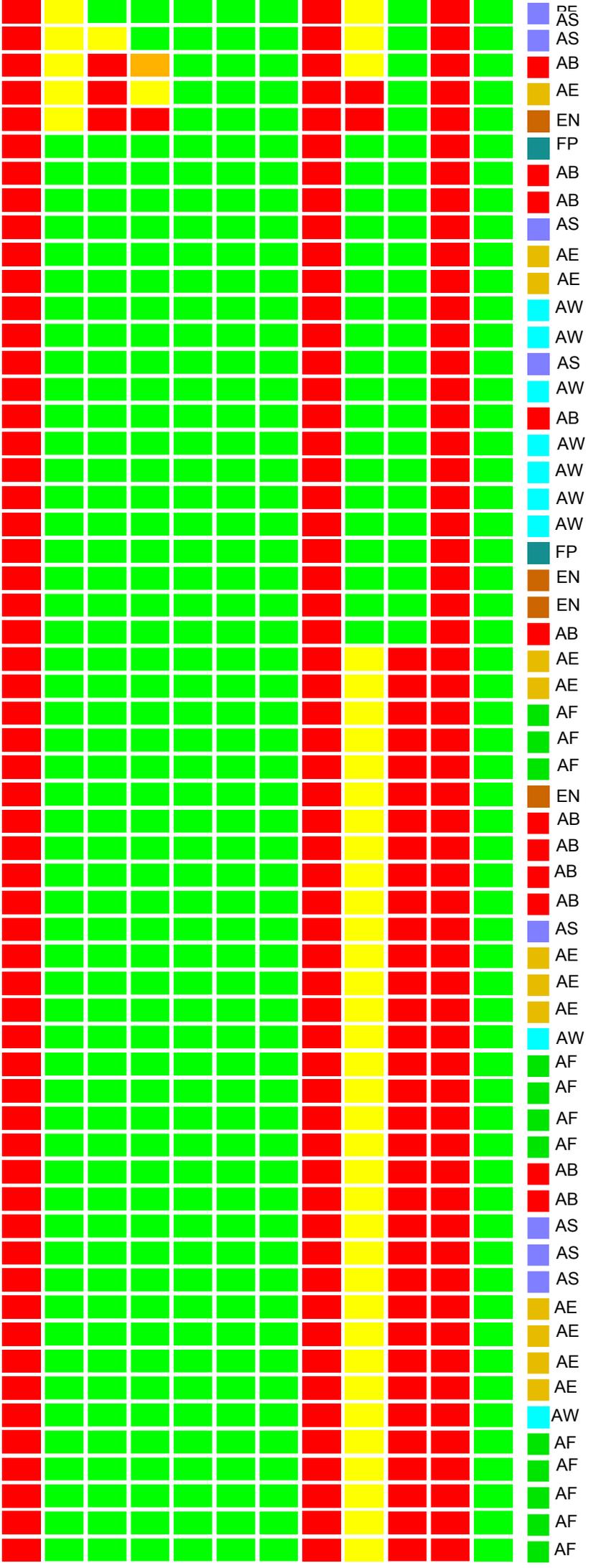
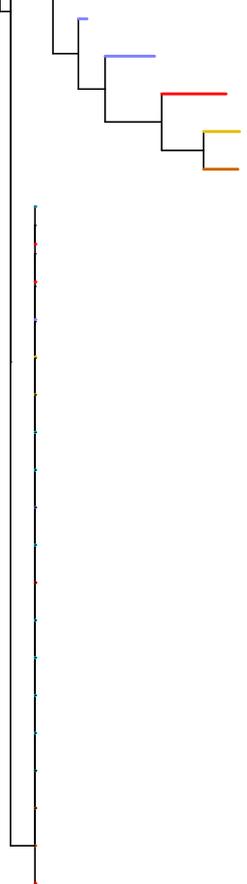
- AB
- AF
- AF
- PL
- AF
- AE
- AS
- AW
- AS
- AS
- AS
- AE
- EN
- AB
- AB
- AS
- AS
- AF
- AF
- AF
- AF
- AE
- AW
- AE
- EN
- AE
- AF
- AF
- AE
- AE
- AB
- AF
- AF
- AB
- AB
- AS
- AE
- AW
- AF
- AS
- AS
- AF
- AW
- AS
- AW
- AF
- AF
- AF
- AF
- AF
- AS
- AS
- AE
- AB
- AE



- AS
- AB
- AB
- AB
- AE
- AB
- AS
- AB
- AB
- AB
- AS
- AB
- AW
- AB
- AW
- AF
- AF
- AF
- AF
- AB
- AS
- AE
- AW
- AB
- AB
- AS
- AS
- AE
- AW
- AW
- AW
- AF
- AB
- AB
- AS
- AS
- AE
- EN
- AF
- AF
- AF
- AF
- AE
- AE
- FP
- AW
- AB
- AS
- AS
- AS
- AE
- AF
- AF
- AF
- AS
- AS
- AW
- AB







# **CAPÍTULO 3**

## 1 CONCLUSÕES GERAIS

Altas frequências de *E. coli* foram observadas neste estudo, sendo isoladas de todos os diferentes tipos de amostras (73,6 %), com exceção da água. Houve uma alta resistência geral aos antimicrobianos: tetraciclina, amoxicilina, cloranfenicol e sulfametoxazol com trimetoprima, antibióticos utilizados na medicina humana e veterinária, o que demonstra ser uma preocupação à saúde pública servindo de alerta para a importância que a exposição no decorrer dos anos aos antimicrobianos de forma não controlada poderá agravar o crítico cenário existente. O que torna o problema ainda mais alarmante, foi a positividade de isolados produtores de enzimas beta-lactamases de espectro estendido obtidos de amostras de carcaças suínas durante os procedimentos de abate na indústria. Apenas 19,36 % dos isolados não apresentaram perfil multidroga resistente. Entretanto, isolados de fezes humanas apresentaram baixa frequência de resistência aos antimicrobianos indicando que mesmo com toda a pressão e seleção de cepas resistentes pela exposição aos antimicrobianos, os isolados de *E. coli* advindos dessas amostras ainda não apresentam perfil de multirresistência, exprimindo a ideia de que ainda há tempo para conter a resistência antimicrobiana e evitar a indisponibilidade de antimicrobianos efetivos no tratamento de humanos e animais. Os isolados de *Escherichia coli* apresentaram uma diversidade dos perfis de resistência nas variáveis amostrais não ocorrendo um agrupamento em clusters segundo as origens das amostras, com exceção dos isolados de fezes humanas que tenderam a se agrupar, evidenciando a menor resistência dessa variável amostral em relação as demais. Novos estudos devem ser realizados possibilitando a identificação completa dos genes e mecanismos de resistência presentes nos isolados.

## REFERÊNCIAS

- AABED, K.; MOUBAYED, N.; ALZHRANI, S. Antimicrobial resistance patterns among different *Escherichia coli* isolates in the Kingdom of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 28, p. 3776–3782, 2021.
- AARESTRUP, F.M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 96, p. 271-281, 2005.
- 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.
- ACURCIO, F. A. Medicamentos: políticas, Assistência Farmacêutica, Farmacoepidemiologia e Farmacoeconomia. 1ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2013. 319 p.
- ARCANGIOLI, M. A.; LEROY-SETRIN, S.; MARTEL, J. L.; CHASLUS-DANCLA, E. Evolution of chloramphenicol resistance, with emergence of cross-resistance to florfenicol, in bovine *Salmonella Typhimurium* strains implicates definitive phage type (DT). *Journal of Medical Microbiology*, v. 49, p. 103-110, 2000.
- ARGUELLO, H.; CARVAJAL, A.; COLLAZOS, J.A.; GARCÍA-FELIZ, C.; RUBIO, P. Prevalence and serovars of *Salmonella enterica* on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. *Food Research International*, v. 45, p. 905-912, 2012.
- ARUTYUNOV, D.; FROST, L. S. F conjugation: back to the beginning. *Plasmid*, v. 70, p. 18–32, 2013.
- AZEVEDO, S. M. M. *Farmacologia dos antibióticos beta-lactâmicos*. 2014. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.
- BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; CORRÊA, A.; FERREIRA, A. J. P.; CALDERARO, F. F. resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.69, n. 2, p.15-18, 2002.
- BAPTISTA, M. G. F. M. *Mecanismos de Resistência aos Antibióticos*. 2013. 42 f. monografia (Dissertação de Mestrado) - Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.
- BARILLIA, E., VISMARRAA, A., VILLAA, Z., BONILAUER, P., BACCIA, C. ESBL *E. coli* isolated in pig's chain: Genetic analysis associated to the phenotype and biofilm synthesis evaluation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 289, 162–167, 2019.

BARTON, M. D. Impact of antibiotic use in the swine industry. *Current Opinion Microbiology* v. 19, p. 9-15, 2014.

BOERLIN, P.; TRAVIS, R.; GYLES, C. L.; REID-SMITH, R. J.; ANECKO, N.; LIM, H.; NICHOLSON, V.; MCEWEN, S. A.; FRIENDSHIP, R.; ARCHAMBAULT, M. Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of *Escherichia coli* Isolates from Swine in Ontario. *Applied Environmental Microbiology*, v. 71, p. 6753-6761, 2005.

BOLTON, L. F.; KELLEY, L. C.; LEE, M. D.; FEDORKA-CRAY, P. J.; MAURER, J. J. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n: 5, p.1348-1351,1999.

BORCH, E.; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in red meat and ready to eat meat products, as well as control measures. *Meat Science*, v.62, n. 3, 2002.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 711, de 1/ de novembro de 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 9, 27 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 26, de 9 de julho de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Brasília: MS, 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR) / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed. vol.2. New York: Spring Science + Business Media Inc., 2005.

BRISOLA, M. C. *Disseminação ambiental em propriedades suínolas da resistência a antimicrobianos utilizando a Escherichia coli como biomarcadora*. 2018. 67 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina. 2018.

BUNCIC, S.; SOFOS, J. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. *Food Research International*, v. 45, p. 641-655, 2012.

BUSH, K. New beta-lactamases en Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clinical Infectious Disease*, v. 32, n. 7, p. 1085-1089, 2001.

CANTÓN, R.; GONZALES-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M Enzymes: Origin and diffusion. *Frontiers in microbiology*, v. 3, p. 110, 2012.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 1220 30th Edition. Wayne, PA, 2020.

CLSI. M100 - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - 28<sup>th</sup> Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2018.

CORNAGLIA, G.; GARAU, J.; LIVERMORE, D. M. Living with ESBLs. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 14, p. 1-2, 2008.

COSTA M. M.; SILVA M. S.; SPRICIGO D. A.; WITT, N. M.; MARCHIORO, S. B.; KOLLING, L.; VARGAS, A. P. C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 26, p. 5-8, 2006.

COSTA, A. L. P. Resistência Bacteriana aos Antibióticos: uma perspectiva do fenômeno biológico, suas consequências e estratégias de contenção. 2016. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP, Macapá, 2016.

COSTA, A. L. P.; SILVA JÚNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica (UNIFAP)*, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

DALMARCO, E. M.; BLATT, S. L.; CÓRDOVA, C. M. M. Identificação Laboratorial de  $\beta$ -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) – Revisão. *RBAC*, vol. 38, p. 171-177, 2006.

DAVIES, J., DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 74, p.417–433, 2010.

DOREGIRAE, 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*, v.17, n. 3, p. 815-824, 2018.

DUNLOP, R. H.; McEWEN, S. A.; MEEK, A. H.; FRIENDSHIP, R. M.; BLACK, W. D.; CLARKE, R. C. Sampling considerations for herd-level measurement of faecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in finisher pigs. *Epidemiology and Infection*, v.122, n.3, p.485-496, 1999.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Sweden, 2013.

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.

FENG, P.; WEAGANT, S.; GRANT, M. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. *Bacteriological Analytical Manual* (8th ed.). FDA/Center for Food Safety & Applied Nutrition, 2002.

FERNANDES, M. R.; MCCULLOCH, J. A.; VIANELLO, M. A.; MOURA, Q.; PÉREZ-CHAPARRO, P. J.; ESPOSITO, F.; SARTORI, L.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; LIRA, D. P. A.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. 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*, v. 60, p. 6415-6417, 2016.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development—the failure of success?. *Nature Biotechnol*, v. 24, p.1497–1503, 2006.

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

FRANCO, B. D. G; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. 2ª ed. São Paulo: Livraria Atheneu, 2003.

FRANCO, J. M. P. L.; MENDES, R. C.; CARBRAL, F. R. F.; MENEZES, C. D. 1262 A. Resistência bactéria e o papel do farmacêutico frente à resistência 1263 bacteriana ocasionada pelo uso irracional de antimicrobianos. *E-Ciência*, v. 3, n. 2, 2015.

FRANCO, R. M. *Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos no grande rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana. 2002. 144 f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de POA) – Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2002.

GIURIATTI, J. Detecção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) em isolados de *Salmonella* provenientes de carnes de frango. 2017. 42 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina, 2017.

Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2021. Geneva: World Health Organization, 2021.

GREISEN, K.; LOEFFELHOLZ, M.; PUROHIT, A.; LEONG, D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, p. 335-351,

1994.

HAENNI, M.; POIREL, L.; KIEFFER, N.; CHÂTRE, P.; SARAS, E.; MÉTAYER, V.; DUMOULIN, R.; NORDMANN, P.; MADEC, J.-Y. Co-occurrence of extended spectrum  $\beta$  lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, p. 281-282, 2016.

HIDAKA, T.; ARIKAWA, K.; FUJIHARA, S.; OGASAWARA, J.; HASE, A.; HARAKUDO, Y.; NISHIKAWA, Y. Multiplex real time PCR for exhaustive detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, n: 2, p. 410-420, 2009.

HILL, S. M.; PHILLIPS, A. D.; WALKER-SMITH, J. A. Antibiotics for *Escherichia coli* gastroenteritis. *Lancet*, v. 1, p. 771-772, 1988.

HIRD, J.F.; KNIFTON, A. Chloramphenicol in veterinary medicine. *Veterinary Record*, v. 119, p. 248-256, 1986.

JACOBY, G.A., 2009. AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, p. 161–182, 2009.

JAKOBSEN, L.; SPANGHOLM, D. J.; PEDERSEN, K.; JENSEN, L. B.; EMBORG, H.; AGERSO, Y.; AEERESTRUP, F. M.; HAMMERUM, A. A.; FRIMODT-MOLLER, N. Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. *International Journal of Food Microbiology*, v. 142 p. 264–272, 2010.

JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JENSEN, H. H.; HAYES, D. J. Impact of Denmark's ban on antimicrobials for growth promotion. *Current Opinion in Microbiology*, v. 19, p. 30-36, 2014.

JIANG, X.; SHI L. Distribution of tetracycline and trimethoprim sulfamethoxazole resistance genes in aerobic bacteria isolated from cooked meat products in Guangzhou, China. *Food Control*, v. 30, n: 1, p. 30-34, 2013.

JOUINI, A.; BEM, SLAMA, K.; SÁENZ, Y.; KLIBI, N.; COSTA, D.; VINUÉ, L.; ZARAZAGA, M.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C. Detection of multiple-ntimicrobial resistance and characterization of the implicated genes in *Escherichia coli* isolates from foods of animal origin in Tunis. *Journal of Food Protection*, v. 72, n: 5, p. 1082-1088, 2009.

KICH, J. D.; MARIN, G.B.; COLDEBELLA, A. Uso prudente de antimicrobianos na suinocultura: qual é nosso caminho? In: 13<sup>o</sup> Simpósio Brasil Sul de Suinocultura e 12<sup>o</sup> Brasil Sul Pig Fair 10 a 12 de agosto de 2021 - Chapecó, SC – Brasil.

LANCINI, J. B. Fatores exógenos na função gastrintestinal. *Fisiologia da digestão e absorção das aves*, Campinas, p. 99-126, 1994.

LERNER, H.; BERG, C. The concept of health in One Health and some practical implications for research and education: what is One Health? *Infection Ecology & Epidemiology*, v. 5, p. 25300, 2015.

LUPOLI, A.; HOOPER, D. C.; ARNAOUT, R. A.; KAHNE A.; WALKER, S. Farmacologia das infecções bacterianas e micobacterianas: Síntese da parede celular. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN JR, A.; ARMSTRONG, E. J. *Princípios da farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 608-625.

MACÊDO, N. R.; MENEZES, C. P. L.; LAGE, A. P.; RISTOW, L. E.; REIS, A.; GUEDES, R. M. C. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, p. 1117-1123, 2007.

MAGIORAKOS A., SRINIVASAN R. B., CAREY Y., CARMELI M. E., FALAGA C. G., GISKE S., HARBARTH J. F., HINDLER G., KAHLMEYER B., OLSSON- LILJEQUIST D. L., PATERSON L. B., RICE J., STELLING M. J., STRUELENS A., VATOPOULOS A., WEBER J.T., M. D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2011.

MANNION, C.; FANNING, J.; MCLERNON, J.; LENDRUM, L.; GUTIERREZ, M.; DUGGAN, S.; EGAN, J. The role of transport, lairage and slaughter processes in the dissemination of *Salmonella* spp. in pigs in Ireland. *Food Research International*, v. 45, p. 871-879, 2012.

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. 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical of Microbiology Reviews*, v. 24, p. 718–733, 2011.

MENG J.; ZHAO, S.; DOYLE, M. P.; JOSEPH, S. W. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food and humans. *Journal of Food Protection*, v. 61, p. 1511-1514, 1998.

MORENO, M.A.; DOMÍNGUEZ, L.; TESHOGER, T.; HERRERO, I. A.; PERRERE, M. E. Antibiotic resistances monitoring: the Spanish programme. *International Journal Antimicrobial Agents*, v. 14, p. 285–290, 2000.

NATARO, J. P.; KAPER, B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n: 1, p. 142-201, 1998.

NGUYEN-VIET, H.; CHOTINUN, S.; SCHELLING, E.; WIDYASTUTI, W.; KHONG, N. V.; KAKKAR, M.; BEECHE, A.; JING, F.; KHAMLOME, B.; TUM, S.; ADISASMITO, W. Reduction of antimicrobial use and resistance needs sectoral-collaborations with a One Health approach: perspectives from Asia. *International Journal of Public Health*, v. 62, p. 3-5, 2017.

OMS. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2017.

OMS. WHO list of Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/foodsafety/publications/WHO-CIA-list-6flyer-EN.pdf?ua=1>. Acesso em: 10/10/2021

OMS. Resistência antimicrobiana. Genebra: Organização Mundial da Saúde. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 10/10/2021

PAES, A. C. Fármacos antimicrobianos. In: Barros CM, Di Stasi LC. Farmacologia Veterinária. 1a ed. Editora Manole, 2012. p. 124-138.

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.

QUENTIN, J. B., COEN D. M.; GOLAN, D. E. Princípios de farmacologia antimicrobiana e antineoplásica. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN JR, A.; ARMSTRONG, E. J. *Princípios da farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 572-589.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas*. Porto Alegre: Artemed, 2005. 512 p.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. Farmacologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 6ª ed., 2016.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. *Revista Brasileira Ciências do Solo*, v. 34 p. 601-616. 2010.

RIBEIRO, V. B. Detecção de resistência aos carbapenêmicos e avaliação de *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) em isolados clínicos da família Enterobacteriaceae. 2013. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.

ROBINSON, T. P.; BU, D. P.; CARRIQUE-MAS, J.; FÈVRE, E. M.; GILBERT, M.; GRACE, D.; HAY, S. I.; JIWAKANON, J.; KAKKAR, M.; KARIUKI, S.; LAXMINARAYAN, R.; LUBROTH, J.; MAGNUSSON, U.; THI NGOC, P.; VAN BOECKEL, T. P.; WOOLHOUSE, M. E. J. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 110, n: 7, p. 377-380, 2016.

ROSENGREN, L. B.; WALDNER, C. L.; REID-SMITH, R. J. Associations between Antimicrobial Resistance Phenotypes, Antimicrobial Resistance Genes, and Virulence Genes of Fecal *Escherichia coli* Isolates from Healthy Grow-Finish Pigs. *Applied*

*Environmental Microbiology*, v.75, p.1373-1380, 2009.

ROSTAGNO, M. H.; HURD, H. S.; MCKEAN, J.D.; ZIEMER, C.J.; GAILEY, J.K.; LEITE, R.C. Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 4489-4494, 2003.

RYOU, M.; COEN, D. M. Farmacologia das infecções bacterianas: replicação, transcrições e translação do DNA. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN JR, A.; ARMSTRONG, E. J. *Princípios da farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 591-606.

SAENZ, Y.; BRIÑAS, L.; DOMÍNGUEZ, E.; RUIZ, J.; ZARAZAGA, M.; VILA, J.; TORRES, C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 10, p. 3996–4001, 2004.

SCHROEDER, C. M.; ZHAO, C.; DEBROY, C.; TORCOLINI, J.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; WAGNER, D. D.; MCDERMOTT, P. F. R.; WALKER, D.; MENG, J. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Applies and Environmental Microbiology Journal*, v 68, p. 576-58, 2002.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, v 32, 201–225, 2001.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS microbiology reviews*, v. 28, n: 5, p 519-542, 2004.

SCOTT, A.M.; BELLER, E.; GLASZIOU, P.; CLARK, J.; RANAKUSUMA, R.W.; BYAMBASUREN, O.; BAKHIT, M.; PAGE, S.W.; TROTT, D.; MAR, C.D. Is antimicrobial administration to food animals a direct threat to human health? A rapid systematic review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2018.

SEIXAS, F. N.; TOCHETTO, R.; FERRAZ, S. M. Presença de *Salmonella* spp. em carcaças suínas amostradas em diferentes pontos da linha de processamento. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, p. 634-640, 2009.

SHOBRAK, M. Y.; ABO-AMER, A. E. Role of wild birds as carriers of multi-drug resistant *Escherichia coli* and *Escherichia vulneris*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, p. 1199–1209, 2014.

SILVA, F. F. P.; SANTOS, M. A. A.; SCHMIDT, V. Resistência a antimicrobianos de *Escherichia coli* isolada de dejetos suínos em esterqueiras. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, p.762-765, 2008.

SILVA, P. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1325 p.

SINGER, A. C.; SHAW, H.; RHODES, V.; HART, A. Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Frontiers in*

*Microbiology*, v. 11, n:1, 2016.

SMET, A.; MARTEL, A.; PERSOONS, D.; DEWULF, J.; HEYNDRICKX, M.; HERMAN, L.; HAESEBROUCK, F.; BUTAYE, P. Broad-spectrum  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiology Reviews*, p. 1-22, 2009.

SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 391-395. 1999.

Tenaillon, O.; Skurnik, D.; Picard, B.; Denamur, E. A genética populacional de *Escherichia coli* comensal. *Natures Reviews Microbiology*, v. 8, p. 207–217, 2010.

TERRA N. N.; FRIES L. L. M. A qualidade da carne suína e sua industrialização. 1ª Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína. 2000.

THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review, v. 166 p. 145-167, 2003.

THORSTEINSDOTTIR, T. R.; HARALDSSON, G.; FRIDRIKSDOTTIR, V.; KRRISTINSSON, K.; GUNNARSSON, E. Prevalence and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from animals, foods and humans in Iceland. *Zoonoses and Public Health*, v. 57, n. 3, p. 189-196, 2010.

THRELFALL, E.J.; WARD, L.R.; FROST, J.A.; WILLSHAW, G.A. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v. 62, p. 1-5, 2000.

TIEDJE, J. M.; WANG, F.; MANAIA, C.; VIRTA, M.; SHENG, H.; MA, L. ZANG, T.; TOPP, E. Antibiotic Resistance Genes in the Human-Impacted Environment: A One Health Perspective. *Pedosphere*, v. 29, n: 3, p. 273–282, 2019.

VAN BREDA, L.K.; DHUNGYEL, O.P.; WARD, M.P. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in southeastern Australian pig herds and implications for surveillance. *Zoonoses Public Health*, v. 17, 2017.

VAZ, E. K. Antimicrobial resistance: how it appears and what it represents for swine Production. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, p. 147-150, 2009.

VIEIRA, A. R.; HOUE, H.; WEGENER, H. C.; WONG, D. M. A.; EMBORG, H. Association between tetracycline consumption and tetracycline resistance in *Escherichia coli* from healthy danish slaughter pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 6, n. 1, p. 99-109, 2009.

WANG, X.; JIANG, H.; LIAO, X. et al. Antimicrobial resistance, virulence genes, and phylogenetic background in *Escherichia coli* isolates from diseased pigs. *FEMS Microbiol Letters*, v. 306, p. 15-21, 2010.

ZEBA, B. Overview of  $\beta$ -lactamase incidence on bacterial drug resistance. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, v. 4, 2004.

ZECHNER, E. L.; LANG, S.; SCHILDBACH, J. F. Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. *Philosophical Transactions of Royal Society B Biological Sciences*, p. 367, p. 1073–1087, 2012.

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.